

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий  
институт  
Базовая кафедра биотехнологий  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние температуры культивирования на рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, синтез полимера и жирнокислотный состав липидов

06.04.01 Биология

06.04.0.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель  к. б.н., доцент Н.О. Жила

Выпускник  О. А. Богданова

Рецензент  к.б.н., с.н.с. М.Ю. Трусова

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Влияние температуры культивирования на рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, синтез полимера и жирнокислотный состав липидов» содержит 53 страницы, 24 иллюстрации, 1 таблицу, 64 источника литературы.

CUPRIVIDUSNECATOR, ПОЛИГИДРОКСИАЛКРАНОАТЫ,  
ТЕМПЕРАТУРА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ,  
СКОРОСТЬ СИНТЕЗА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Цель работы-оценить влияние температуры на культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, накопление полимера и состав жирных кислот внутриклеточных липидов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать рост клеток бактерий и накопление полимера при различных температурах (10°C-40°C)
2. Оценить молекулярно-массовые характеристики полимера
3. Определить жирнокислотный состав внутриклеточных липидов *Cupriavidus necator* В-10646
4. Оценить скорость синтеза основных жирных кислот внутриклеточных липидов

Температура является одним из основных факторов, влияющих на рост и метаболическую активность микроорганизмов и, таким образом, оказывают сильное влияние на накопление ПГА. Бактерии способны адаптироваться к повышенным и пониженным температурам, за счет изменения жирнокислотного состава липидов цитоплазматической мембраны.

Влияние температуры на синтез ПГА широко исследованы. Но, тем не менее, все результаты разобщены, что может быть связано с различными условиями культивирования, исследованием различных микробных сообществ, использованием различных субстратов. В нашей работе был исследован один из перспективных штаммов, продуцентов ПГА *Cupriavidus necator* В-1064.

## СОДЕРЖНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>7</b>
1.1 Структура и свойства полигидроксиалканоатов .....	7
1.2 Сферы использования полигидроксиалканоатов .....	11
1.3 Синтез поли-3-гидроксибутирата .....	12
1.4 Внутриклеточная деградация полигидроксиалканоатов .....	15
1.5 Штаммы - продуценты полигидроксиалканоатов.....	17
1.6 Липиды бактерий и их локализация в клетке .....	18
1.7 Жирнокислотный состав липидов бактериальной клетки.....	20
1.8 Влияние температуры на мембраны бактерий.....	22
1.9 Влияние температуры на рост бактерий .....	23
1.10 Влияние температуры на синтез ПГА .....	24
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>25</b>
2.1 Объект исследования.....	25
2.2 Культивирование и условия роста .....	26
2.3 Мониторинг параметров процесса.....	26
2.4 Экстракция внутриклеточных липидов .....	28
2.5 Приготовление метиловых эфиров жирных кислот для анализа на хромато-масс-спектрометре .....	28

2.6	Анализ метиловых эфиров жирных кислот липидов.....	29
-----	--	----

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....ERROR!**

BOOKMARK NOT DEFINED.

3.1	Характеристика культуры и накопленного полимера .....	<b>Error!</b>
-----	---	---------------

**Bookmark not defined.**

3.2	Молекулярно-массовые характеристики полимера.....	<b>Error!</b>
-----	---	---------------

**Bookmark not defined.**

3.3	Общее содержание липидов цитоплазматической мембраны	
-----	--	--

**Error! Bookmark not defined.**

3.4	Характеристика жирнокислотного состава липидов .....	<b>Error!</b>
-----	--	---------------

**Bookmark not defined.**

3.5	Скорость синтеза жирных кислот ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
-----	-------------------------------------	-------------------------------------

	<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>32</b>
--	--------------------	-----------

	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>33</b>
--	---	-----------

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время глобальной экологической проблемой стало возрастающее использование человеком синтетических пластмасс, главным образом, полиолефинов (полиэтиленов и полипропиленов). Её решением могло бы стать создание экологически чистых материалов, служащих аналогом полиолефинов и вписывающихся в биосферные круговоротные циклы [3].

В последние десятилетия растет интерес к природным полимерам (коллагену, альгинатам, желатину и др.) и полиэфирам бактериального происхождения-полигидроксиалканоатам (ПГА) [12]. ПГА - полимеры гидроксипроизводных жирных кислот. Они обладают рядом полезных для человека свойств, таких как биосовместимость и биodeградация.

Благодаря своим свойствам, ПГА перспективны для использования в сельском хозяйстве (обволакиватели семян, пестицидов, тара для тепличных хозяйств), пищевой промышленности (упаковочный материал) и в других сферах, таких как медицина и фармакология[4].

Микроорганизмы подвергаются воздействию ряда различных стрессовых факторов в окружающей среде, среди которых очень частые колебания температуры [39]. Бактерии способны адаптироваться к повышенным и пониженным температурам, за счет изменения жирнокислотного состава липидов цитоплазматической мембраны.

Температура является одним из основных факторов, влияющих на рост и метаболическую активность микроорганизмов и, таким образом, оказывают сильное влияние на накопление ПГА [26].

Влияние температуры на синтез ПГА широко исследованы. Но, тем не менее, все результаты разобщены, что может быть связано с различными условиями культивирования, исследованием различных микробных сообществ, использование различных субстратов и т.д.

Таким образом, целью данной работы является: оценить влияние температуры на культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, накопление полимера и состав жирных кислот внутриклеточных липидов.

Задачи:

1. Исследовать рост клеток бактерий и накопление полимера при различных температурах (10°C-40°C)
2. Оценить молекулярно-массовые характеристики полимера
3. Определить жирнокислотный состав внутриклеточных липидов *Cupriavidus necator* В-10646
4. Оценить скорость синтеза основных жирных кислот внутриклеточных липидов

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Структура и свойства полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой алифатические сложные полиэфиры, продуцируемые различными микроорганизмами как внутриклеточные резервные материалы углерода и энергии [60]. Впервые ПГА были обнаружены у *Bacillus megaterium* Бейеринком в 1888 году. В зависимости от входящих в их состав мономерных единиц, они имеют разные физико-химические свойства.

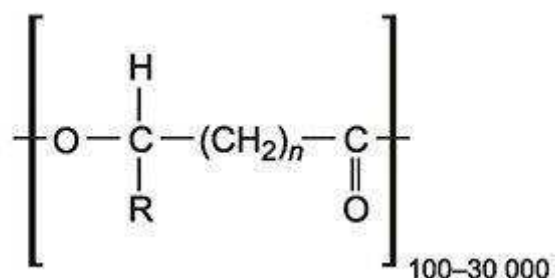


Рисунок 1-Структурная формула ПГА

Где:

$n = 1$ : R = водород - поли (3-гидроксипропионат), R = метил - поли (3-гидроксibuтират), R = этил - поли (3-гидроксивалерат), R = пропи́л - поли (3-гидроксигексаноат), R = пентил - поли (3-гидроксиоктаноат), R = нонил - поли (3-гидроксидодеканоат),

$n = 2$ : R = водород - поли (4-гидроксibuтират),

$n = 3$ : R = водород - поли (5-гидроксивалерат).

С биотехнологической точки зрения ПГА обладают двумя важными свойствами, придающими им значительное преимущество в отношении других синтетических продуктов. Это биоразлагаемость и биосовместимость. ПГА полностью деградируют до воды и двуокиси углерода в аэробных условиях, которые являются конечными продуктами окисления. Здесь необходимо подчеркнуть, что эти продукты являются

основными материалами для фотосинтетической регенерации углеводов зелеными растениями. Это демонстрирует то, что, в отличие от полипропилена, ПГА внедряются в естественный замкнутый цикл углерода [35]. Кроме того, 3-гидроксимасляная кислота (мономер ПЗГБ) является естественным продуктом обмена веществ высших животных и человека. Благодаря этому возможно создавать изделия для медицины. Их имплантация сопровождается образованием продуктов, которые не вызывают воспалительные и другие негативные реакции организма [3].

В зависимости от числа атомов углерода в мономерах, ПГА классифицируют как короткоцепочечные (3-5 атомов углерода) и среднецепочечные (6 и более атомов углерода) [30].

Длина боковой цепи и функциональной группы имеет большое значение для физических свойств [58]. Короткоцепочечные ПГА обладают свойствами высококристалличности (обычно 55-80%), с высокой температурой плавления и низкой температурой стеклования. Сополимеры с короткой цепью, такие как Поли(ЗГБ-со-3ГВ), обладают лучшими свойствами, чем гомополимеры, потому что их точка плавления намного ниже, и они менее кристаллические. Среднецепочечные ПГА являются эластомерами. Температура плавления и стеклования делают их более эластичными материалами, чем короткоцепочечные ПГА [39].

В таблице 1 показаны характеристики репрезентативных ПГА с различным мономерным составом [35].

Молекулярная масса ПГА также является важным параметром, характеризующим физико-механические свойства полимера. Высокомолекулярные ПГА имеют улучшенные механические свойства (например, прочность на разрыв и растяжение на разрыв) пленок, полученных из ПЗГБ с такой молекулярной массой. На молекулярную массу ПГА влияют условия культивирования (источник углерода, температура, pH и др.) [15].



Таблица - 1. Характеристика репрезентативных ПГА (Khanna and Srivasta, 2005; Williams and Martin, 2002)

	ПГБ	Поли(ЗГБ-со-3%ЗГВ)	Поли(ЗГБ-со-20%ЗГВ)	Поли(4ГБ)	Поли(ЗГБ-со-3%-4ГБ)	Поли(ЗГБ-со-16%4ГБ)	Поли(ЗГБ-со-64%4ГБ)	Поли(ЗГО-со-12%ЗГГ)
Температура плавления (°C)	177	170	145	60	166	152	50	61
Температура стеклования (°C)	4	-	-1	-50	-	-8	-	-35
Предел прочности(МПа)	40	38	32	104	28	26	17	9
Модуль Юнга (ГПа)	3,5	2,9	1,2	149	-	НО	30	0,008
Удлинение при разрыве (%)	6		50	1	45	444	591	380

ПГБ: поли[( R )-3-гидроксибутират]; ЗГБ: 3-гидроксибутират; ЗГВ: 3-гидроксивалерат; 4ГБ: 4- гидроксibuтират;

ЗГГ: 3-гидроксигеканоат; ЗГО: 3-гидроксиоктаноат; НО-не определено

Наиболее изученным в настоящее время является, поли[(R)-3-гидроксибутират] (ПЗГБ) – полимер β-гидроксимасляной кислоты (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) и может составлять до 90% от сухой массы клетки [2].

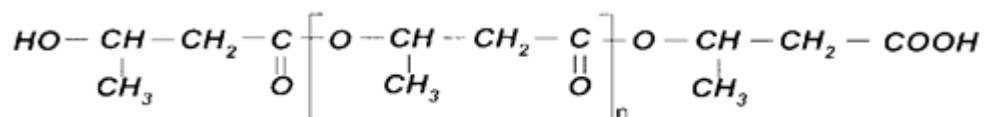


Рисунок 2- Структурная формула ПЗГБ

ПЗГБ - гомополимер, свойства которого не всегда удовлетворяют биоинженерным требованиям и для получения биоматериалов важно использовать полимер с разным мономерным составом. ПЗГБ характеризуется высокой степенью кристалличности и ограниченной технологичностью этого материала. ПЗГБ относится к короткоцепочечным ПГА и характеризуются термопластичностью. Небольшое различие между температурой разложения (обычно около 270°C) и температурой плавления (обычно около 180°C) обеспечивает довольно небольшое окно для технологии экструзии расплава. Это может быть изменено путем включения (R) - 3-гидроксивалерата (ЗГВ) или 4-гидроксибутирата (4ГБ) и 5-гидроксивалерата (5ГВ) [35].

Бактерии накапливают ПГА в цитоплазме в виде гранул размером от 0,2 до 0,5 мкм [63]. Размер и количество гранул могут сильно варьировать [37]. Недавние исследования показали, что ПГА накапливаются не только как источник энергии для микроорганизмов, полимер также повышает стрессоустойчивость и приспособленность микроорганизмов к различным неоптимальным условиям окружающей среды [43].

Доказано, что присутствие гранул ПГА увеличивает скорость транспорта воды из клеток во время замораживания, что впоследствии защищает бактериальные клетки от образования внутриклеточного льда; это существенно способствует криозащитному эффекту ПГА. Присутствие гранул ПГА, как оказалось, снижает уровень плазмолиза в зараженных

клетках. При анализе методом просвечивающей электронной микроскопии гранулы ПГА были даже способны стабилизировать мембраны бактериальных клеток, закрывая отверстия в цитоплазматической мембране. Клетки, способные накапливать ПГА более устойчивы к УФ-излучению, они способны эффективно рассеивать ультрафиолетовое излучение. Таким образом, присутствие гранул ПГА в цитоплазме может быть полезным для бактериальных клеток при воздействии стрессовых условий [54].

## **1.2 Сферы использования полигидроксиалканоатов**

ПГА- потенциальные полимеры для использования в различных сферах жизни человека. Именно поэтому их изучению уделяется большое внимание. В отличие от привычных пластиков, получаемых из нефти, они способны к биодegradации в аэробных и анаэробных условиях, что позволяет использовать их в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. А так же являются биосовместимыми, что позволяет использовать их в медицине [9].

Биосовместимость ПГА обосновывается тем, что  $\kappa$ - $\beta$ -гидроксимасляная кислота является естественным продуктом обмена человека и высших животных [1]. Поэтому медицина является одной из самых широких сфер использования ПГА. Они могут использоваться для изготовления медицинского инструментария и вспомогательных средств (нетканые и одноразовые изделия, шовные и перевязочные материалы), фармакологии (контролируемые системы доставки лекарств), восстановительной хирургии и трансплантологии [13].

Изменять свойства полимеров (механическая прочность, кристалличность, температурные характеристики) возможно изменяя условия культивирования. После экстракции полимера, его можно использовать в различных фазовых состояниях: гели, расплавы, порошки, растворы и др. [12].

Помимо медицины ПГА также может быть использован в других сферах. Например, для изготовления бутылок, ламинированной фольги, рыбных сетей, одноразовых стаканов, волокон в текстильных изделиях и др. [16].

Несмотря на то, что ПГА были признаны хорошими кандидатами на замену обычных нефтехимических пластмасс, их использование в широком спектре применений по-прежнему ограничено их дорогостоящей ценой на производство. Одним из основных факторов, влияющих на стоимость производства, является тип источника углерода [48]. К большинству источников углерода, которые используются для накопления биомассы и синтеза ПГА, относятся сахара, и их стоимость достаточно высокая. Поэтому последние годы активно ведутся исследования для поиска дешевых и возобновляемых субстратов, предпочтительно на биологической основе. Для использования в качестве таких перспективных субстратов были определены растительные масла (соевое, пальмовое, растительное, кукурузное, рапсовое, оливковое, подсолнечное)[55, 9].

### **1.3 Синтезполи-3-гидроксибутирата**

ПГА накапливаются в цитоплазме бактериальной клетки в виде включений (гранул), размер и количество которых могут сильно варьировать [40]. Они располагаются в цитоплазме не случайным образом, это контролируется клеткой при помощи специальных белков [63]. Среди белков, связанных с гранулами ПГА, присутствуют ПГА-синтазы, ПГА-деполимеразы и группа низкомолекулярных белков, известных как фазины [38]. Фазины – основной компонент гранул ПГА. Они прочно прикрепляются к гидрофобной поверхности гранул и способствуют биосинтезу ПГА [27]. Так же фазины определяют количество накопленного ПГА [40]. Первый фазин идентифицировали в 1994 году Pieper-Fürst и Steinbüchel, когда они обнаружили низкомолекулярный белок (GA14), связанный с гранулами ПГА

в *Rhodococcus ruber*. GA14 был преобладающим белком, присутствующим в гранулах, образуя слой на их поверхности. С тех пор на поверхности гранул всех изученных микроорганизмов, продуцирующих ПГА, были обнаружены фазины [38].

Биосинтез полигидроксиалканоатов это сложный процесс, включающий множество биохимических реакций. Каждый этап этого биосинтеза катализируется специфическими ферментами [1].

Установлено, что этапы синтеза ПЗГБ практически одинаковы у различных микроорганизмов.

В благоприятных условиях пируват расходуется в основном в цикле Кребса на образование аминокислот и преобразование энергии в клетке. При этом сохраняется высокий уровень свободного ацетил-КоА, что является препятствием для синтеза ПЗГБ. При отсутствии азота в среде или дефиците кислорода, пируват не включается в цикл трикарбоновых кислот. Он подвергается карбоксилированию с образованием ацетил-КоА. При этом уровень свободного ацетил-КоА низкий. Благодаря этому и активизируются ферменты для синтеза поли-3-гидроксибутирата [5].

Биосинтез ПГА может осуществляться по восьми биосинтетическим путям. Многочисленные исследования показали, что биосинтез полимера у *C. necator* связан с метаболизмом липидов [9].

Образование ПГА катализируют 3 фермента:  $\beta$ -кетотиолаза, ацетоацетил-КоА редуктаза, ПГА-синтаза [20]. Считается, что  $\beta$ -кетотиолаза запускает синтез полимера, ацетоацетил-КоА редуктаза регулирует скорость синтеза ПЗГБ, а ПГА-синтаза отвечает за качественные характеристики полимера (молекулярную массу, мономерный состав) и конечный выход ПГА [57]. В последние годы было предпринято много усилий для увеличения производства ПГА в разных микроорганизмах с помощью метаболической инженерии, чтобы обеспечить больше предшественников 3-гидроксиацетил-КоА, полученных из цикла  $\beta$ -окисления жирных кислот.

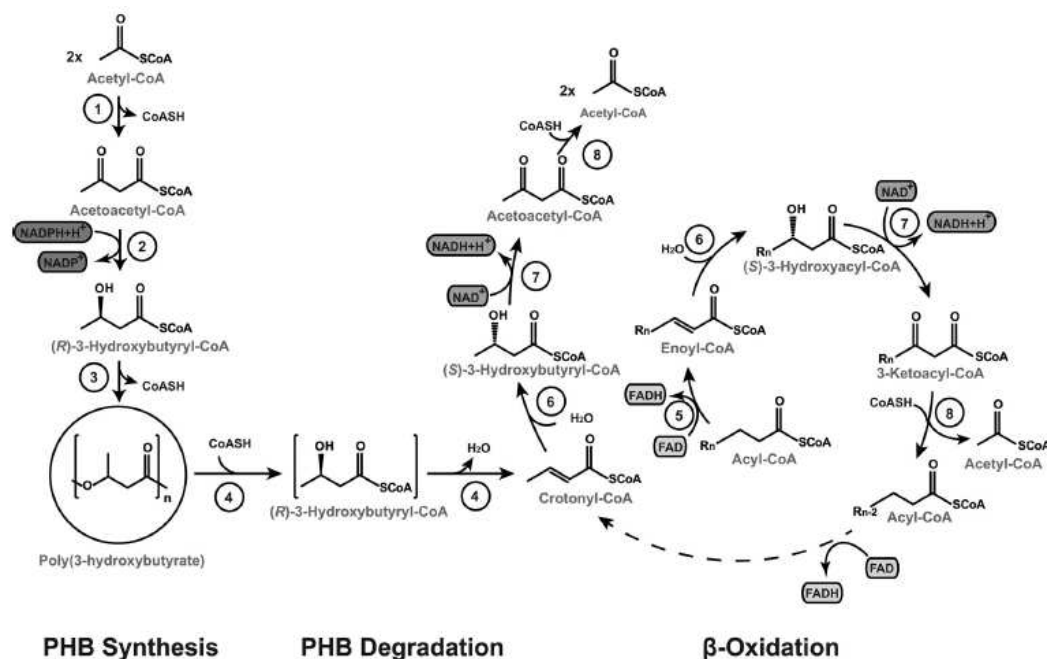


Рисунок 3- Синтез ПГБ, сопряженный с бета-окислением жирных кислот (EggersandSteinbüchel 2014)

ПЗГБ синтезируется путем конденсации двух молекул ацетил-КоА до ацетоацетил-КоА с помощью  $\beta$ -кетотиолазы. Далее происходит восстановление ацетоацетил-КоА-редуктазой в NADPH зависимой реакции из ацетоацетил-КоА до (R)-3-гидроксibuтирил-КоА. После чего, ПГА-синтаза включает мономеры в поли (R)-3-гидроксibuтират. ПЗГБ деградирует до кротонил-КоА через (R)-3-гидроксibuтирил-КоА с помощью ПГБ-деполимераз, хотя реакция возможна без высвобождения промежуточного соединения. Именно кротонил-КоА сочетает деградацию ПЗГБ с  $\beta$ -окислением. К ацил-КоА с помощью ацил-КоА-дегидрогеназы добавляется двойная связь и образуется еноил-КоА. В свою очередь еноил-КоА стереоспецифично превращается в (S)-3-гидроксиацил-КоА с помощью еноил-КоА-гидратазы. 3-кетоацил-КоА образуется в NAD-зависимой реакции с помощью 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы из (S)-3-гидроксиацил-КоА. 3-кетоацил-КоА-тиолаза расщепляет кетоацил-КоА и образуется одна молекула ацетил-КоАс образованием усеченного ацил-КоА.

Цикл окисления начинается снова с добавлением двойной связи с усеченным ацил-КоА [20].

ПГА-синтаза является ключевым ферментом синтеза ПЗГБ. Он катализирует полимеризацию 3-гидроксibuтирил-КоА до ПЗГБ [46]. В клетке ПГА-синтаза находится в двух формах- растворимой и связанной с гранулами полимера. Ряд данных свидетельствуют о конститутивном синтезе ПГА-синтазы. В условиях лимита углерода *S. necator* синтезирует преимущественно растворимую форму фермента, при переносе культуры в условия лимита по азоту активность растворимой ПГА-синтазы резко падает и в клетках в основном определяют гранулозависимую форму фермента. При этом суммарная активность фермента остается на одном и том же уровне [20].

#### **1.4 Внутриклеточная деградация полигидроксиалканоатов**

Внутриклеточная деградация гранул ПГА происходит в условиях лимитирования углеродного субстрата. Внутриклеточная деградация ПЗГБ приводит к высвобождению 3-гидроксимасляной кислоты, которая под воздействием НАД-зависимой  $\beta$ -3-гидроксibuтиратдегидрогеназы превращается в ацетоацетат, который в трансферазной реакции конвертирует в ацетоацетил-КоА. Он в свою очередь под действием кетотиалазы трансформируется в ацетил-КоА. Ацетил – КоА поступает на энергетические и анаболические нужды клетки [4].

Для объяснения изменения морфологии гранул при внутриклеточной деполимеризации были предложены две гипотезы.

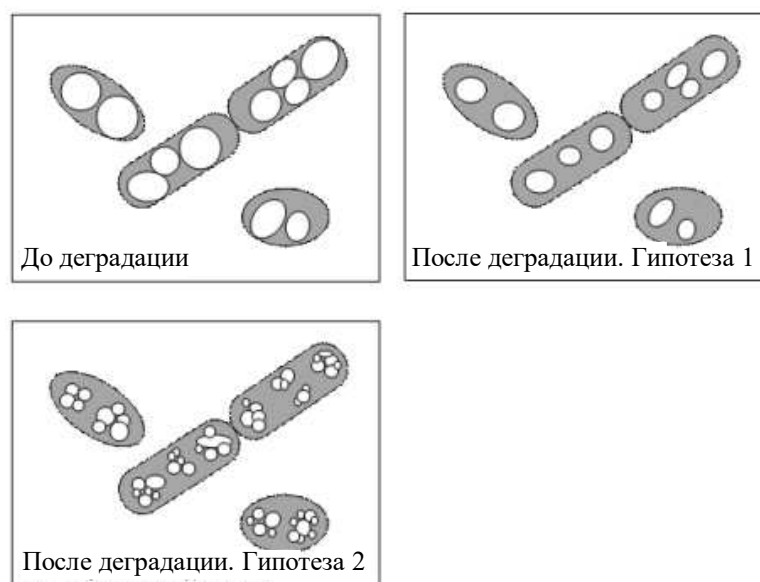


Рисунок 4 - Схема изменения морфологии гранул ПГА при деполимеризации (Ongetal 2017.)

Первая гипотеза предполагает, что размеры гранул уменьшаются от первоначальных размеров, при этом количество гранул в одной клетке останется неизменным. Вторая гипотеза предполагает, что вариация будет иметь место, как по количеству, так и по размеру. В клетках *Delftiaacidovorans* помощью просвечивающей электронной микроскопии было показано уменьшение размеров и увеличение количества гранул. Объяснением этого наблюдения является то, что эти гранулы подвергались атаке ферментами внутриклеточной деполимеразы в случайных направлениях, заставляя гранулы разрываться на многочисленные мелкие гранулы. Меньшие гранулы будут иметь большую площадь поверхности для увеличения скорости деградации и использования ПГА. Также возможно, что меньшие гранулы, обнаруженные на более поздней стадии деградации, представляют собой новые гранулы ПГА, образованные ПГА -синтазами, которые остаются активными в клетках [44].

Многие исследования, посвященные изучению синтеза и деградации ПГА, показали, что эти два процесса могут происходить в клетки одновременно. Например, Uchinoc соавторами (Uchinoetal., 2007),



установили, что все ферменты деградации и синтеза локализируются в нативных гранулах полимера. Кроме того, они показали, что регуляция синтеза и деградации происходит на субстратном уровне. Если во время культивирования клетка не испытывает дефицита в углеродном субстрате, то уровень ацетил-КоА выше его потребления, активность ПГА - синтазы будет высокая, а ПГА-деполимеразы низкая, соответственно будет идти синтез полимера. Дефицит углерода приведет к снижению концентрации ацетил-КоА, и, следовательно, будет повышаться активность деполимераз. Данные исследования показывают, что оптимальные условия культивирования и подача углеродного субстрата помогут минимизировать гидролиз полимера *in vivo*, и соответственно повысить продукцию ПГА. [8].

### 1.5 Штаммы- продуценты полигидроксиалканоатов

Список микроорганизмов-продуцентов ПГА достаточно широкий и насчитывает свыше 300 организмов. В этот список входят как природные, так и генетически модифицированные микроорганизмы. По отношению к кислороду могут быть и аэробные и анаэробные микроорганизмы. По типу питания: гетеротрофы, хемоорганотрофы, хемоавтотрофы, фототрофы, и другие. Несмотря на такой широкий список бактерий, способных накапливать ПГА, для производства используют небольшое количество видов. При выборе продуцента учитывают следующие показатели: концентрацию клеток в культуре, выход полимера, затраты углеродного субстрата, продуктивность процесса [6].

Такими перспективными штаммами стали *Ralstonia eutropha* (переименованные в *Cupriavidus necator*); *Azohydromonas lata* (ранее *Alcaligenes latus*), *Aeromonas hydrophila*; *Pseudomonas oleovorans*. Все перечисленные выше штаммы являются природными [3].

Способность синтезировать ПГА без использования дорогостоящих органических сред, делает водородокисляющие бактерии перспективным

коммерческим производителем ПГА [61]. Бактериальные штаммы рода *Cupriavidus* относятся к числу хорошо известных продуцентов ПГА из водородокисляющих бактерий. Способность водородокисляющих бактерий синтезировать ПГА в автотрофных условиях с  $\text{CO}_2$  в качестве источника конструктивного метаболизма (анаболизма) и  $\text{H}_2$  в качестве источника энергетического метаболизма (катаболизма) делает их перспективными для производства ПГА [28,33,58]. Некоторые виды водородокисляющих бактерий устойчивы к  $\text{CO}$ . Благодаря этому, возможно их культивировать с использованием водородсодержащих продуктов природного газа и конверсии угля, древесных отходов, гидролизного лигнина и др. [57,62].

Известно, что клетки *Cupriavidus necator* способны расти на жирных кислотах и растительных маслах. Масло сначала гидролизуют внеклеточной липазой и в результате свободные жирные кислоты поглощаются клетками и перенаправляются в путь  $\beta$ -окисления для роста и синтеза ПГА [55].

## 1.6 Липиды бактерий и их локализация в клетке

Основная часть бактериальных липидов представлена фосфолипидами, гликолипидами, липополисахаридами и другими сложными соединениями.

Грамотрицательные бактерии обычно ограничены двумя мембранными структурами. Внутренняя плазматическая мембрана это структура, которая ограничивает бактериальную протоплазму и состоит преимущественно из фосфолипидов. Внешняя мембрана это структура с двумя электронными плотными слоями, внешними и внутренними и состоит из белков, включая порины, рецепторы и асимметричное распределение липидов. Внешний слой состоит в основном из липополисахарида (ЛПС), выступающего снаружи, а внутренний слой содержит фосфолипиды и липопротеины [18, 19].

Фосфолипиды, формирующие цитоплазматическую мембрану представлены в основном фосфатидилэтаноламинами (ФЭ), фосфатидилглицеринами (ФГ) и диацилфосфатидилглицеринами или

кардиолипинами (ДФГ) [10]. Для большинства грамотрицательных бактерий характерно высокое содержание фосфатидилэтаноламина. Он может составлять до 90% от общего содержания фосфолипидов. Содержание фосфатидилглицерина и кардиолипина колеблется от 5 до 15 %, и их количество зависит от возраста культуры и других факторов роста [11].

Липополисахарид (ЛПС) является основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Он состоит из трех областей: липида А, основного олигосахарида и полисахарида О. Липид А придает эндотоксичность ЛПС, полисахарид О придает серологическую специфичность и иммуногенность, а основной олигосахарид служит молекулярным мостиком и соединяет липид А с О - антигеном [14, 64].Слой ЛПС действует как барьер проницаемости, таким образом, необходимые питательные вещества и ионы могут проникать в клетку только через порины, которые встроены во внешнюю мембрану [14].Структура липополисахарида представлена на рисунке 5.

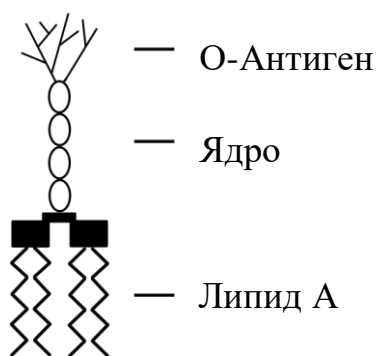


Рисунок 5-Структура липополисахарида

Липид А структурно представляет собой дисахарид глюкозамина, с добавлением фосфатных групп в положениях 1 и 4' и который имеет первичные производные жирных кислот в положениях 2, 3, 2' и 3' с возможно вторичными производными жирных кислот в положениях 2''b и 3''b [36]. Эти жирные кислоты принято называть прочносвязанными.

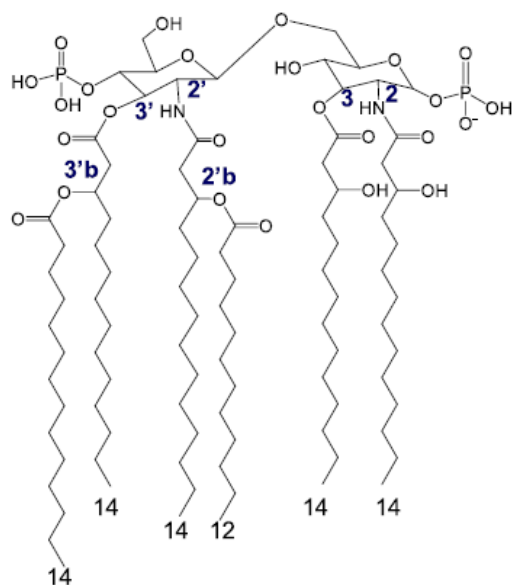


Рисунок 6-Структура липида *A.E.coli* (Li, Y et al.,2016)

### 1.7 Жирнокислотный состав липидов бактериальной клетки

Липидный профиль активно используется в хемотаксономии бактерий. А для быстрой идентификации видов используется анализ состава жирных кислот [17].

Липиды бактериальных клеток представлены жирными кислотами с длиной C10-C20. Они могут быть объединены в четыре главных группы: насыщенные (не содержащие двойных связей), разветвленные (метилованные по предпоследнему атому углерода - изо-жирные кислоты и по третьему от конца цепи – анти - изо-жирные кислоты), ненасыщенные (содержащие двойные связи между атомами углерода) и циклопропановые (содержащие одно или больше трехчленных колец, присоединенных вдоль углеводородной цепи). Из насыщенных кислот нормального строения наиболее распространенными являются: лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0). Из ненасыщенных кислот в липидах бактерий преобладают пальмитолеиновая (C16:1 $\omega$ 7) с двойной связью между 9 и 10 атомами углерода и цис-вакценовая кислота (C18:1 $\omega$ 7) с двойной связью между 11 и 12 атомами углерода. Полиеновые кислоты (содержащие более одной

двойной связи между атомами углерода) в бактериальных клетках не найдены. Грамотрицательные бактерии обычно синтезируют насыщенные, моноеновые и циклопропановые кислоты. Соотношение насыщенных, моноеновых и циклопропановых кислот, хотя и меняется в различных условиях роста, может быть характерным для определенных представителей прокариот [17, 51]. Циклопропановые жирные кислоты образуются добавлением метильной группы с помощью кофермента S – аденозилметионина. Эти жирные кислоты связаны с процессом старения клеток, поскольку синтезируются в стационарной фазе роста.

Гидроксигирные кислоты, которые несут ОН-группу (2-ОН- или 3-ОН-жирные кислоты), встречаются у грамотрицательных бактерий. Они обычно являются компонентом липида А в их липополисахаридах. Таким образом, наличие β-гидроксикислот с длиной цепи 10, 12 и 14 атомов углерода указывает на то, что организм относится к грамотрицательным бактериям [41].

Жирные кислоты бактерий структурно довольно разнообразны. Изменение жирнокислотного состава является высокоэффективным механизмом адаптации и позволяет бактериям существовать в широком диапазоне условий среды.

Липиды бактерий входят в состав цитоплазматической мембраны и клеточной стенки [7]. Они определяют основные функции в жизни клетки. Причем резервная функция не является основной, как у эукариот [21, 34]. Жирные кислоты бактерий являются составляющими компонентами клеточных мембран [17]. Жирные кислоты бактериальных клеток в основном находятся в связанном виде в молекулах ацилсодержащих липидов. Свободные жирные кислоты встречаются в небольших количествах в грамположительных и грамотрицательных бактериях (от 2 до 10 % от суммы липидов) [25].

## 1.8 Влияние температуры на мембраны бактерий

Общепринято, что мембрана бактериальных клеток играет важную роль во время адаптации клеток к суровым условиям культивирования. Ранее сообщалось об изменениях в составе жирных кислот, влияющих на текучесть мембраны, в ответ на раздражители, вызванные рН, концентрацией кислорода, температурой, ионной силой, голодом и присутствием токсичных соединений[31]. Бактерии - это пойкилотермические организмы, и когда температура окружающей среды внезапно падает ниже физиологических условий, они должны адаптироваться к новой физической ситуации, чтобы выжить [37].

Мембрана клетки при холодном шоке становится жесткой и нарушаются связанные с мембраной функции, такие как транспорт, выработка энергии и деление клеток. Следовательно, для того, чтобы адаптироваться к низкой температуре, очень важно, чтобы бактерия могла восстановить мембранную функцию путем увеличения текучести мембраны. Бактерии модулируют текучесть мембран, используя различные стратегии, такие как изменение размера и заряда групп полярных головок, изменение соотношения жирных кислот с короткой и длинной цепью, изменение степени десатурации жирных кислот, изменение соотношения цис- и транс-конфигурации жирных кислот и изменение состава каротиноидов

Но исследования показали, что не все вышеперечисленные стратегии эффективны. Например, изменения в полярных головных группах менее часты и менее эффективны при модификации мембранной текучести, а изменения посредством изменения длины цепи возможны только в растущих клетках. По сравнению с вышеупомянутыми стратегиями изменения десатурации жирных кислот, изменения изомеризации жирных кислот и изменения состава каротиноидов, по-видимому, являются общими способами модификации мембранной текучести в клетках, подвергающихся воздействию низких температур.

Геометрические изомеры, такие как цис- и транс-жирные кислоты, также влияют на мембрану. Повышенные уровни цис-ненасыщенных жирных кислот увеличивают текучесть мембраны, поскольку она вызывает неподвижный излом 30°C в ацильной цепи, тогда как транс-ненасыщенные жирные кислоты уменьшают текучесть мембраны [53].

## **1.9 Влияние температуры на рост бактерий**

Микроорганизмы подвергаются воздействию ряда различных стрессовых факторов в окружающей среде, среди которых очень частые колебания температуры [42].

Микроорганизмы обычно имеют верхний и нижний пределы температуры для роста. С повышением температуры увеличивается скорость денатурации ключевых клеточных компонентов. При более низких температурах транспорт субстратов через клеточную мембрану ограничивает рост [32].

Таким образом, температура является критическим фактором, влияющим на рост микробов и обмен веществ.

Многие микроорганизмы разработали сложные стратегии, для адаптации к повышенным и пониженным температурам. Для защиты от воздействия низких температур микроорганизмы развили способность вырабатывать и накапливать криопротекторы. К ним относится множество низкомолекулярных растворенных веществ (например, аминокислот и их производных, сахаров, эктоинов и их производных и т. д.). А также высокомолекулярных веществ (например, белков и полисахаридов), которые вырабатываются бактериями и обладают криопротективными свойствами [42].

## 1.10 Влияние температуры на синтез ПГА

Температура является одним из основных факторов, влияющих на метаболическую активность микроорганизмов и, таким образом, оказывают сильное влияние на накопление ПГА [28].

Влияние температуры на синтез ПГА широко исследованы. Но тем не менее, все результаты разобщены, что может быть связано с различными условиями культивирования, исследованием различных микробных сообществ, использование различных субстратов и т.д.

Johnsonсоавторами (Johnsonetal., 2010) показали, что смешенная культура в реакторе периодического действия для очистки сточных вод синтезировала максимальное количество ПГА при 30°C [32].Perez с соавторами (Perezetal., 2019) зафиксировали наибольшее накопление ПГА метанотрофными бактериями при 25 °C [47].Исследования Gohс соавторами (Gohetal.,2012) показали накопление ПГА у антарктического штамма *Pseudomonasi* усталили максимальное накопление ПГА при 5 °C, которое уменьшалось с повышением температуры [23]. Кроме того, исследования Obruca с соавторами (Obrucaetal.,2016) показали, что ПГБ играют роль криопротектора. Так штамм-продуцент ПГБ *Cupriavidusnecator*Н16 продемонстрировал превосходную жизнеспособность по сравнению со своим неаккумулирующим штаммом ПГБ в течение всего испытания на замораживание-оттаивание клеток [42].

Изучение воздействия температуры на накопление ПГА показало, что ПГА являются не только резервным материалом для накопления углерода, но и обеспечивают множество дополнительных полезных функций, когда микроорганизм сталкивается с неблагоприятными условиями. Многочисленные экспериментальные данные показали, что способность к биосинтезу и деградации ПГА также существенно увеличивает выживаемость бактерий при воздействии различных физических нагрузок, включая высокиеи низкие температуры [50].



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объект исследования

Продуцентом ПГА служил штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646. Штамм был зарегистрирован в Российской Национальной Коллекции Промышленных Микроорганизмов. Культурально-морфологические особенности штамма: грамотрицателен, клетки-палочки (молодые - короткие, в стационарной фазе - разной длины, размеры 0.3-0.5×1.2-2.0 мк), слабоподвижные. Оптимум роста 30-31°C, рН 6,7-7,2. Облигатный аэроб. Факультативный хемолитоавтотроф. На агаризованной среде с пептоном (гетеротрофные условия роста) образуют морфологически однородные округлые колонии, светло-кремовые, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2-4 мм. На минеральной агаризованной среде (автотрофные условия роста) колонии мелкие (1,5-2,5 мм), светло-серые, полупрозрачные. В жидкой питательной среде представляет однородную суспензию при гетеротрофном и автотрофном росте. Обладает широким органотрофным потенциалом и способен в качестве источника углерода и энергии использовать: сахара (глюкоза, фруктоза), аминокислоты (аланин, серин, лейцин, гистидин, триптофан, глутаминовую, аспарагиновую, лизин), органические кислоты (щавелевую, лимонную, янтарную, фумаровую, уксусную, 3-ОН- и 4-ОН-масляную кислоту, пентапную, гексановую, октановую, нонановую), спирты (этанол, глицерин), 4-бутиролактон при гетеротрофном росте, и H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> и СО при автотрофном росте [22]. Штамму присущи следующие признаки: высокая активность ферментов, контролирующих синтез ПГА; способность к синтезу ПГА с высокими выходами; способность к синтезу гетерополимерных ПГА, способность к синтезу ПГА, имеющих степень кристалличности ниже 50%.

## 2.2 Культивирование и условия роста

Посевной материал получали ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «IncubatorShakerInnova» серии 44 («NewBrunswickScientific», США) в стеклянных колбах объемом 0,5 л с коэффициентом заполнения 0,5 при температуре 30°C и 200 об/мин в течение 24 ч. Клетки выращивали в периодической культуре. Для выращивания бактерий использовали минеральную среду Шлегеля. Состав среды:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -9,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,025,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -1,0 (г/л) и раствор микроэлементов ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ -0,288;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,030;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,008;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,008;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,176;  $\text{NaMoO}_4$ -0,050;  $\text{NiCl}_2$ -0,008 (г/л)).

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,5. Температурный режим изменялся в пределах 10°C - 37°C. Культивирование бактерий проводили в течение 72 ч. В качестве углеродного субстрата использовали фруктозу, начальная концентрация которой составляла 20 г/л. По ходу роста культуры и исчерпания субстрата делали добавки фруктозы в культуру в концентрациях, аналогичной исходной.

## 2.3 Мониторинг параметров процесса

В течение культивирования периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и  $\lambda=440$  нм (длина оптического пути 1 мм). Концентрацию биомассы бактерий в культуре регистрировали весовым способом. Для этого 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин на центрифуге («Eppendorf», Германия). Затем дважды отмывали клетки от солей

дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу Sanyo («SanyoElectricCo., Ltd.», Япония) в течение 24 ч, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах 4-го класса точности (MettlerToledo, Швейцария). Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом пустого бюкса.

Удельную скорость роста вычисляли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{\Delta t} \quad (\text{ч}^{-1}),$$

где  $X_1$  и  $X_2$  - вес сухой биомассы (г/л) в начале и в конце периода  $\Delta t$ .

Для определения концентрации фруктозы 1 мл культуры разводили в 25 мл дистиллированной воды. Из этого разведения 1мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 1000 мл 95% этилового спирта) и 3 мл смеси соляная кислота:дистиллированная вода(соотношение раствора 5:1). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали на водяную баню ( $t=80^\circ\text{C}$ ) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охлаждали до комнатной температуры. Измеряли оптическую плотность растворов на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 540 нм в кюветах с длиной поглощающего слоя 50 мм. Концентрацию фруктозы находили при помощи калибровочного графика.

Общее содержание полимера в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре (7890A/5975C, AgilentTechnologies, USA). Для этого к навеске (3,9 - 4,5 мг) сухой биомассы добавляли 1 мл внутреннего стандарта (раствор 50 мг бензойной кислоты в 100 мл хлороформа), добавляли 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Эту смесь ставили на водяную баню при температуре 80°C с обратным холодильником на 2 часа 40 минут. По истечении времени к пробе добавляли

1 мл воды и оставляли в холодильнике для расслоения фаз.

Молекулярную массу и молекулярно – весовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии AgilentTechnologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_w$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярные массы, а так же полидисперсность ( $PDI=M_w/M_n$ ).

#### **2.4 Экстракция внутриклеточных липидов**

Выделение липидов производили из сыройбиомассы бактерий смесью хлороформа с этанолом (2:1). Для этого экстракция проходила в течение 12 часов. Затем экстракт, содержащий липиды и полимер отделяли от биомассы фильтрованием через бумажный фильтр в стеклянные колбы. Растворитель отгоняли на роторном испарителе. Для экстракции полимера в колбы добавляли смесь хлороформа с гексаном (1:2). Затем отделяли осажденный полимер и экстракт липидов фильтрованием через бумажный фильтр. Растворитель отгоняли на роторном испарителе после чего добавляли гексан для перерастворения липидов. Полученные липиды пропускали через сернокислый натрия безводный во взвешенные колбы. Растворитель отгоняли на роторном испарителе и помещали в эксикатор. После доведения липидов до постоянного веса, взвешивали и по разности с весом колбы определяли их вес в сухой биомассе.

#### **2.5 Приготовление метиловых эфиров жирных кислот для анализа на хромато-масс-спектрометре**

Метанолиз жирных кислот липидов проводили в смеси 10 мл метанола и 0,2 мл серной кислоты при температуре 80°C в течение двух часов. По окончании процесса добавили 1 мл дистиллированной воды и 2 мл гексана.

Затем при помощи делительной воронки, отделили водный слой и гексан слили в отдельную колбу, а водную фазу обработали еще дважды гексаном для полноты извлечения метиловых эфиров жирных кислот. Объединенные гексановые экстракты промыли несколькими порциями дистиллированной воды до нейтральной реакции и пропустили через слой безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  в грушевидную колбу, затем испарили гексан на роторном испарителе. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали на хромато-масс-спектрометре.

## **2.6 Анализ метиловых эфиров жирных кислот липидов**

Метиловые эфиры жирных кислот анализировали на хромато-масс-спектрометре (7890A/5975C, Agilent Technologies, USA).

Подготовка газового хроматографа к анализу: установили режим ввода пробы «split», т.е. с делением потока газа при вводе пробы; заполнили данные о пробе при формировании файла, где будут храниться результаты анализа; в колбу с метиловыми эфирами с помощью микрошприца добавили 20-40 мкл гексана, смыли и сконцентрировали вещество на дне колбы, по окончании отобрали шприцом 1-3 мкл раствора. Далее мы запустили «анализ пробы» из компьютерной программы, дождались сигнала готовности прибора, ввести пробу в инжектор.

Условия хроматографирования: газ-носитель - гелий, скорость - 1 мл/мин; температура ввода пробы -  $220^\circ\text{C}$ ; начальная температура хроматографирования -  $120^\circ\text{C}$ , подъем температуры до  $230^\circ\text{C}$  со скоростью  $5^\circ\text{C}$  в минуту; колонка капиллярная HP-FFAP, длина 30 м, диаметр - 0.25 мм; температура трансферной линии  $250^\circ\text{C}$ , источника ионов -  $165^\circ\text{C}$ , режим электронного удара при 70 eV, режим сканирования фрагментов от 45 до 500 m/z при 0.5 с/сек. Идентификацию жирных кислот проводили сравнением их времен удерживания и масс-спектров с таковыми имеющимися стандартами; использовали насыщенные, моноеновые, диеновые, триеновые,

тетра- и пентаеновые кислоты с длиной цепи от 10 до 20, а также  $\beta$ -гидроксикислоты.

Процесс хроматографии происходил около 1 часа, за это время введенные метиловые эфиры жирных кислот разделялись на колонке, подавались в масс-спектрометрический детектор, где производилось регулярное сканирование спектров вещества, выходящего из колонки, спектры и общая ионная интенсивность записывалась в соответствующий файл.

Абсолютные концентрации жирных кислот определяли по внутреннему стандарту, в качестве которого использовали 100 мкл маргариновой кислоты в концентрации 1 мг на 1 мл гексана. Внутренний стандарт добавляли в анализируемые пробы перед экстракцией липидов.

Скорости образования индивидуальных жирных кислот рассчитывали по формуле, предложенной Клячко-Гурвич Г.Л. с соавторами, Прониной Н.А. с соавторами (Клячко-Гурвич и др., 1980, Пронина и др., 1998).

$$Vm = \frac{\Delta m}{\Delta t P_{cp}}, \text{ где}$$

$\Delta m$  – изменение содержания кислоты в единице объема за период  $\Delta t$ ,  
 $P_{cp}$  – средняя величина содержания сухого вещества в том же объеме суспензии за то же время.

[изъято 15 страниц]

## ВЫВОДЫ

Установлено, что температура в диапазоне 25-37 °С не влияет на рост бактерий и содержание полимера. Концентрация биомассы составила 7,1-7,9 г/л, полимера 73,7-82%. При температуре 40°С рост бактерий прекращался. При температуре ниже 25°С происходило постепенное снижение концентрации биомассы и полимера.

Установлено, что снижение температуры привело к увеличению средневесовой и среднечисловой молекулярной массы полимера. Максимальную средневесовую массу (2013,3 кДа) и среднечисловую массу (861,3 кДа) наблюдали при температуре 10°С и 15°С.

Установлено, что содержание внутриклеточных липидов снижается, и к концу культивирования составило 1,8-2,4%.

Исследован жирнокислотный состав внутриклеточных липидов в ходе культивирования. Показано, что при температуре 30°С к концу культивирования происходит накопление 16:0 и С-17:0 жирных кислот и снижение 16:1 $\omega$ 7 и 18:1 $\omega$ 7. При температуре 35°С изменения аналогичные. Со снижением температуры происходит снижение насыщенных кислот и увеличение ненасыщенных жирных кислот.

Рассчитана скорость синтеза основных жирных кислот (пальмитиновой, пальмитолеиновой, вакценовой). При температуре 30°С клетки синтезировали 16:0 24-48ч со скоростью 146,4 нмоль/г белка в час. При 35°С на 48-72ч скорость синтеза 16:0 увеличилась до 1036,4 нмоль/г белка в час

При понижении температуры, клетки синтезируют 16:1 $\omega$ 7 и 18:1 $\omega$ 7 со скоростью 203,7 и 783,9 нмоль/г белка в час. Синтез происходит только экспоненциальной фазе роста



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Антонова, Л.В. Возможности использования полиоксисалканоатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии / Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С.// Бюллетень сибирской медицины.- 2012.-Том 11, №1- С.128-134.
2. Волова Т.Г Биотехнология: монография/ Т.Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
3. Волова Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксисалканоатов/ JournalofSiberianFederalUniversity. Biology 2.-2014.- С.103-133.
4. Волова Т.Г. Разрушаемые микробные полигидроксисалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов/ JournalofSiberianFederalUniversity. Biology 2.-2015.- С.131-151.
5. Волова, Т.Г. Биосинтез на водороде / Т. Г. Волова; под ред. И. И. Гительсона; Рос.акад. наук, Ин-т биофизики СО РАН. - Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2004. - 397 с.
6. Волова, Т.Г., Шишацкая Е.И./ Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение.- Красноярск, Издательство «Красноярский писатель», 2011.-392с.
7. Гусев, М.В. Микробиология: учебник для студ. Биол. Специальностей вузов/ М. В. Гусев, Л. А. Минеева.- 8-е изд., стер.- М.: Издательский центр «Академия», 2008.- 464с.
8. Жила, Н.О. К вопросу о внутриклеточной деградации полигидроксипутирата/ Калачева Г.С., Волова Т.Г. //JournalofSiberianFederalUniversityBiology 2.-2015.- P. 220-235.
9. Жила, Н.О. Характеристика культуры *Cupriaviduseutrophus* В-10646, синтезирующей полигидроксисалканоаты при росте на сахарах и липидных

субстратах/ Волова Т.Г., Калачева Г.С// Journal of Siberian Federal University. Biology 2.- 2014- С.161-173.

10. Калачева, Г.С. Синтез полиэфиров гидроксипроизводных жирных кислот (полигидроксиалканоатов) и характеристика состава липидов синезеленых, светящихся и водородокисляющих прокариот: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук :03.01.006/ Калачева Галина Сергеевна.- Красноярск, 2012.-74с.

11. Кеслер Т.Г., Вебер М.И., Войтович Я. В. Потребности водородных бактерий на различных источниках азота.//В кн.:Непрерывная культура водородокисляющих бактерий как средство биосинтеза белка. //- Красноярск//- 1974, С. 28-45.

12. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон.учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон.дан. (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – (Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии : УМКД № 1324– 2008 / рук.творч. коллектива Т. Г. Волова).

13. Шишацкая, Е.И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Гены и клетки.- 2007.- Том 2, №2.- С. 68-72.

14. Al-Sultany, S. J. Physiological and Immunological Effect of Lipopolysaccharide of Escherichia coli was Extracted by Hot Phenol-Water in Rabbits/ Jassim. Y.A.// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.-2016.-vol.7.- P.1530-1535.

15. Arikawa H., A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate)depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in Cupriavidus necator H16/ Sato S., Fujiki T., Matsumoto K.// Journal of Biotechnology.-2016.-Vol.94

16. Bugnicourt, E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging/ Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V.// Express Polymer Letters.-2014.- Vol.8, №11.- P. 791-808.

17. Buyer, J.S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis // *J. Microb. Meth.*-2002.- Vol. 48.- P. 259–265.
18. Chatterjee, S. N. Outer Membrane Vesicles of Bacteria/ Chaudhuri K.// *Springer Briefs in Microbiology.*-2012.
19. Clifton, L.A. Asymmetric phospholipid: lipopolysaccharide bilayers; a Gram-negative bacterial outer membrane mimic/ Skoda M. W. A., Daulton E. L., Hughes A.V., Brun A.P. L., Lakey J.H., Holt S.A.// *Journal of the royal society interface.*-2013.- Vol.10.- P. 1-11.
20. Eggers, J. Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in *Ralstonia eutropha* H16 Is Mediated Stereoselectively to (S)-3 Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA/ Steinbüchel A.// *Journal of Bacteriology.*- 2014.- Vol.195, №14.- P. 3213–3223.
21. Geiger, O. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria/ González-Silva N., López-Lara I. M., Sohlenkamp C.// *Progress in Lipid Research.*-2010.- Vol.49.- P.46-60.
22. Gobi, K. Aerobic dynamic feeding as a strategy for in situ accumulation of polyhydroxyalkanoate in aerobic granules/ Vadivelu V.M.// *Bioresource Technology.*- 2014.- Vol.161.- P.441-445.
23. Goh Y., Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island /Kit I., Tan P.// *Microbiological Research.*-2012.-Vol.167.-P.211-219.
24. Grigull V. H. Production and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Oleic Acid by *Ralstonia eutropha*/ Silva D. D., Garcia M. C. F., Furlan S. A., Pezzin A. P. T., Schneider A. L. S, Aragão G. F.// *Food Technol. Biotechnol.*-2008.-Vol.46, No 2.- P.223-228.
25. Grogan, D. W. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria / Cronan J.E.// *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*-1977.- Vol. 61.-P. 429-441.
26. Hartig, C. Formation of trans Fatty Acids Is Not Involved in Growth-Linked Membrane Adaptation of *Pseudomonas putida*/ Loffhagen N., Harms H.// *Applied and environmental microbiology.*-2005.-Vol. 71., №4.-P.1915-1922.

27. Hokamura, A. Characterization and identification of the proteins bound to two types of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas* sp. 61-3/ Fujino K., Isoda Y., Arizono K., Shiratsuchi H., Matsusaki H.// *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.- 2015.- Vol. 79, № 8.- P. 1369–1377.
28. Inoue D., Polyhydroxyalkanoate accumulation ability and associated microbial community in activated sludge-derived acetate-fed microbial cultures enriched under different temperature and pH conditions/ Suzuki Y., Sawada K., Sei K.// *Journal of Bioscience and Bioengineering*.-2018.- Vol.125., P. 339-345.
29. Ishizaki, A. Microbial production of poly-D-3- hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>/ Tanaka K., Taga N.// *Appl. Microbiol. Biotechnol.*-2001.-Vol. 57.- P. 6–12.
30. Jendrossek, D. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates/ Handrick, R.// *Annu. Rev. Microbiol.*-2012.-№56.-P.403-432.
31. Joao M.B.T. Cavaleiro, Adaptation of *Cupriavidus necator* to conditions favoring polyhydroxyalkanoate production/ M. Catarina M.D. de Almeida, M. Manuela R. da Fonseca, Carla C.C.R. de Carvalho// *Journal of Biotechnology*.- 2012.-Vol.164., P.309-317.
32. Johnson K., Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures/Geest J., Kleerebezem R., Loosdrecht M. // *Water reserch*.-2010.-Vol.44.,P. 1689-1700.
33. Khosravi-Darani K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources/ Mokhtari Z.B., Amai T., Tanaka K.// *Appl. Microbiol. Biotechnol.*- 2013.-Vol. 97.- P. 407–1424.
34. Kiran, M. D. Psychrophilic *Pseudomonas syringae* requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature/ Prakash J. S. S., Annapoorni S., Dube S., Kusano T., Okuyama H., Murata N., Shivaji S.// *Extremophiles*.-2004.-Vol.8.- P.401-410.
35. Koller, M. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials/ Atlic A., Dias M., Reiterer A., Braunegg G. // *Microbiology Monographs*.-2010.-Vol. 14.-P. 85-114.

36. Li, Y. Structural derivation of lipid A from *Cronobactersakazakii* using tandem mass spectrometry/ Yoon S.H., Wang X., Ernst R.K., Goodlett D. R.// Research Article.-2016.-Vol.30.- P. 2265–2270.
37. Mansilla M. C., Regulation of Membrane Lipid Homeostasis in Bacteria upon Temperature Change/D. de Mendoza// Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.-2016.-P.1-13.
38. Mezzina, M.P. Phasins, the multifacetic polyhydroxyalkanoate granule associated proteins/ Pettinari M.J.// Applied and environmental microbiology.-2016.-Vol.82, №17.- P. 5060-5067.
39. Mozejko-Ciesielska J., Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?/Kiewisz R.// Microbiological Research.-2016.-Vol. 192
40. Mravec, F. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy/ Obruca S., Krzyzanek V., Sedlacek P., Hrubanova K., Samek O., Kucera D., Benesova P., Nebesarova J.// FEMS Microbiology Letters.- 2016.- Vol.363, №10.- P.1-7.
41. Nuñez-Cardona, M.T. Fatty Acids Analysis of Photosynthetic Sulfur Bacteria by Gas Chromatography/intach.-2012.- P. 117-138.
42. Obruca S., Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) helps Bacterial Cells to Survive Freezing/ Sedlacek P., Krzyzanek V., Mravec F., Hrubanova K., Samek O., Kucera D., Benesova P., Marova I.//PLOS ONE.-2016.-Vol.11, №6
43. Obruca S., Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications/ Sedlacek P., Koller M., Kucera D., Pernicova I.// Biotechnology Advances.-2018.- Vol. 36
44. Ong, S. Y. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA) / Chee J. Y., Sudesh K. // Journal of Siberian Federal University. Biology.-2017.-Tom 10.- C. 211-225.
45. Pagliano G., Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes/ Ventorino V., Panico A., Pepe O.// Biotechnol Biofuels.-2017.- Vol.10

46. Pfeiffer, D. PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha* / Jendrossek D. // Applied and Environmental Microbiology.-2014.- Vol. 80, № 2.- P. 555–563.

47. Perez R., Polyhydroxyalkanoates production from methane emissions in Sphagnum mosses: Assessing the effect of temperature and phosphorus limitation/ Casal J., Muñoz R., Lebrero R. // Science of the Total Environment.-2019.- Vol.688.-P.684-690.

48. Raza Z., Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications / Abid S., Banat I. M. // International Biodeterioration & Biodegradation.-2017.-Vol. 126

49. Ren L., Synthesis of Polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*/H. Liu, Wang P. // Applied Mechanics and Materials.-2015.- Vol.768.-P.124-131.

50. Sedlacek P., What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments/ Slaninova E., Enev V., Koller M., Nebesarova J., Marova I., Hrubanova K., Krzyzanek V., Samek O., Obruca S. // Applied microbial and cell physiology.-2019.-Vol.103.- P.1905-1917.

51. Serrazanetti, D. Cell membrane fatty acid changes and desaturase expression of *Saccharomyces bayanus* exposed to high pressure homogenization in relation to the supplementation of exogenous unsaturated fatty acids/ Patrignani F., Russo A., Vannini L., Siroli L., Gardini F., Lanciotti R. // Frontiers in Microbiology.- 2015.-Vol.6.- P. 1-10.

52. Sheu, D. Cultivation temperature modulated the monomer composition and polymer properties of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Cupriavidus* sp. L7L from levulinate as sole carbon source / Chen Y., Jhuang W., Chen H., Jane W. // International Journal of Biological Macromolecules.-2018.-Vol.118.-P.1558-1564

53. Shivaji S., How do bacteria sense and respond to low temperature?/Jogadhenu S., Prakash S. // Archives of Microbiology.-2010.- Vol.192.,P.85-95.

54. Slaninova E., Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation Sedlacek P., Mravec F., Mullerova L., Samek O., Koller M., Hesko O., Kucer D., Marova I., Obruca S.// *Applied Microbiology and Biotechnology*.-2018.- Vol. 102

55. SudeshK., & Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications/ BhubalanK., Chuah J., Kek Y., Kamilah H., Sridewi N., Lee Y.// *ApplMicrobiol Biotechnol*.-2011.-Vol. 89.-P. 1373–1386

56. Tanadchangsaeng, N. Microbial Synthesis of Polyhydroxybutyrate From Glycerol: Gluconeogenesis, Molecular Weight and Material Properties of Biopolyester /J.Yu// *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 109, No. 11.- P. 2808-2818.

57. Tanaka, K. Cell growth and P(3HB) accumulation from CO<sub>2</sub> of a carbon monoxide-tolerant hydrogen-oxidizing bacterium, *Ideonella* sp. O-1/ Miyawaki K., Yamaguchi A., Khosravi-Darani K., Matsusaki H.// *Appl. Microbiol. Biotechnol*.-2011.- Vol. 92.- P. 1161–1169.

58. Tanaka, K. Production of poly(D-3- hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*/ Ishizaki A., Kanamaru, T., Kawano T.// *Biotechnol. Bioeng*.- 1995.- Vol.45.- P. 268–275.

59. Uchino, K. 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/ Saito T., Gebauer B., Jendrossek D. // *Journal of bacteriology*.-2007.- Vol. 189, No. 22.- P. 8250–8256.

60. Ushimaru ,K. New insights into activation and substrate recognition of polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*/ Sangiambut S., Thomson N., Sivaniah E., Tsuge T// *ApplMicrobiolBiotechnol*.- 2013.-№97.- P. 1175–1182.

61. Volova, T. G. Fundamental Basis of Production and Application of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates/ Shishatskaya E. I., Zhila N. O., Kiselev E. G., Mironov P. V., Vasiliev A.D., Peterson I. V., Sinsky A. J.// *Journal of Siberian Federal University. Biology* 3.- 2012.- P. 280-299.

62. Volova, T.G. Autotrophic synthesis of polyhydroxyalkanoates by the bacteria *Ralstonia eutropha* in the presence of carbon monoxide/ Kalacheva G.S., Altukhova O.V.// *Appl. Microbiol. Biotechnol.*- 2002.- Vol. 58.- P. 675–678.

63. Wahl, A. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha* / Schuth N., Pfeiffer D., Nussberger S., Jendrossek D.// *BMC Microbiology*.-2012.- Vol.12, №262.- P.1-11.


64. Zankharia, U. S. Extraction, Characterization and Determination of Immunoreactivity of Lipopolysaccharide of *Salmonella typhi*/ *vnsgu journal of science and technology*.-2015.- Vol.4, No.1.- P. 224 – 229.



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий  
институт  
Базовая кафедра биотехнологий  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова  
« 06 » июля 2020г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние температуры культивирования на рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, синтез полимера и жирнокислотный состав липидов

06.04.01 Биология

06.04.0.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель



к. б.н., доцент


Н.О. Жила

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

 09.07.2020

О.А. Богданова

подпись, дата

инициалы, фамилия

Рецензент



к.б.н., с.н.с.

М.Ю. Трусова

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Красноярск 2020