

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

« 18» июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Особенности роста, липидного обмена и
аккумуляции резервных биомолекул в культуре
штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646, культивируемого на олеиновой
кислоте

Руководитель

подпись, дата

к.б.н., доцент

должность, ученая степень

Жила Н.О.

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Богданова О.А.

инициалы, фамилия

Красноярск 2018
СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Структура и свойства полигидроксиалканоатов	6
1.2 Сфера использования полигидроксиалканоатов	10
1.3 Синтез поли-3-гидроксибутират.....	11
1.4 Внутриклеточная деградация полигидроксиаканоатов	14
1.5 Штаммы - продуценты полигидроксиалканоатов	16
1.6 Липиды бактерий и их локализация в клетке	18
1.7 Жирнокислотный состав липидов бактериальной клетки.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Объект исследования.....	22
2.2 Культивирование и условия роста	23
2.3 Мониторинг параметров процесса.....	23
2.4 Экстракция липополисахаридов из бактериальной культуры	24
2.5 Экстракция липидов цитоплазматической мембранны	25
2.6 Приготовление метиловых эфиров жирных кислот для анализа на хромато-масс-спектрометре	25
2.7 Анализ метиловых эфиров жирных кислот липидов	26
2.8 Микроскопическое исследование клеток	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	Ошибка! Закладка не определена.

3.1	Характеристика культуры и накопленного полимера . Ошибка! Закладка не определена.
3.2	Жирнокислотный состав липидов цитоплазматической мембранны и прочносвязанных липидов Ошибка! Закладка не определена.
3.3	Микроскопическое исследование клеток <i>C. eutrophus</i> В-10646..... Ошибка! Закладка не определена.
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ 28
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ Ошибка! Закладка не определена.

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа на тему «Особенности роста, липидного обмена и аккумуляции резервных биомолекул в культуре штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646, культивируемого на олеиновой кислоте» содержит 42 страницы текстового документа, 57 использованных источников, 2 таблицы, 13 рисунков.

CUPRIAVIDUS EUTROPHUS, ОЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА,
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ,
ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ, ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ЛИПИДЫ,
МИКРОСКОПИЯ.

Цель работы: исследовать штамм бактерий *C. eutrophus* B-10646 в периодической культуре при росте на олеиновой кислоте. В задачи входило: 1) Исследовать рост клеток бактерий и накопление полимера; 2) Изучить размерные характеристики клеток; 3) Определить жирнокислотный состав липидов цитоплазматической мембранны и прочносвязанных липидов.

Актуальность работы заключается в следующем: на данный момент остро стоит вопрос о снижении стоимости полигидроксиалканоатов. Одним из факторов, влияющих на их стоимость, является субстрат. Таким перспективным, экономически более выгодным субстратом, по сравнению с сахарами, является олеиновая кислота. В целях использования того или иного субстрата для получения полигидроксиалканоатов в промышленных масштабах, необходимо сначала исследовать основные физиологобиохимические особенности штамма-продуцента полигидроксиалканоатов на исследуемом субстрате

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 непрерывно растет интерес к биодеградируемым природным полимерам (альгинатам, коллагену, желатину, хитозанам, фибронам шелка) и полиэфирам бактериального происхождения – полигидроксиалканоатам (ПГА), синтезируемых микроорганизмами [14]. ПГА - полимеры гидроксипроизводных жирных кислот. Они обладают рядом полезных свойств, таких как биодеградация и биосовместимость.

ПГА перспективны для применения в пищевой промышленности (упаковочный материал), сельском хозяйстве (обволакиватели семян, удобрений, пестицидов, разрушаемые пленки, тара для тепличных хозяйств) и других сферах, включая медицину и фармакологию [4].

ПГА достаточно дорогостоящие материалы и данные полимеры пока не применяются настолько широко, насколько это возможно. В целях снижения их стоимости ведутся постоянные работы в поисках недорогостоящего субстрата, при росте на котором, выходы полимера будут высокими, и его свойства будут удовлетворять требуемым.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура и свойства полигидроксиалкоатов

Полигидроксиалкоаты (ПГА) представляют собой алифатические сложные полиэфиры, производимые различными микроорганизмами как внутриклеточные резервные материалы углерода и энергии [52]. 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.

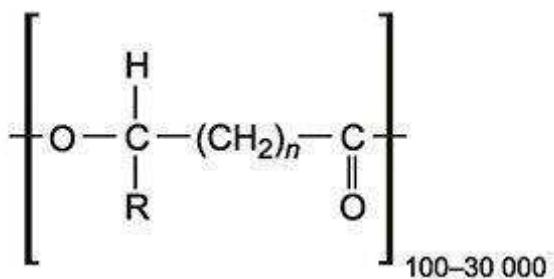


Рисунок 1-Структурная формула ПГА

Где:

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

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

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 [36]. Кроме того основной компонент ПГА – 3-гидроксимасляная кислота – является естественным продуктом обмена клеток и тканей. Это позволяет получать изделия для биомедицины высокой биосовместимости, имплантация которых сопровождается образованием продуктов, не изменяющих pH тканей и не вызывающих воспалительные или иные негативные реакции [3].

В зависимости от числа атомов углерода в мономерах, ПГА классифицируются как короткоцепочечные - длина цепи от 3 до 5 атомов углерода и среднекепочечные - 6 или более атомов углерода [32]. В таблице 1 показаны характеристики репрезентативных ПГА с различным мономерным составом [36].

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

	ПГБ	Поли(3ГБ- со-3%3ГВ)	Поли(3ГБ- со-20% 3ГВ)	Поли(4ГБ)	Поли(3ГБ- со-3%-4ГБ)	Поли(3ГБ- со-16%4ГБ)	Поли(3ГБ- со-64%4ГБ)	Поли(3ГО- со-12%3ГГ)
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]; 3ГБ: 3-гидроксибутират; 3ГВ: 3-гидроксивалерат; 4ГБ: 4- гидроксибутират;

3ГГ: 3-гидроксигеканоат; 3ГО: 3-гидроксиоктаноат; НО-не определено

Наиболее изученным в настоящее время является, полиполи[(R)-3-гидроксибутират] (ПЗГБ) – полимер β -гидроксимасляной кислоты ($C_4H_8O_2$) и может составлять до 90% от сухой массы клетки [2].

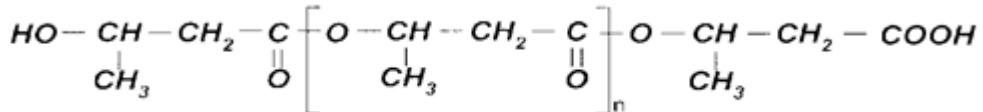


Рисунок 2- Структурная формула ПГБ

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 $270^{\circ}C$) и температурой плавления (обычно около $180^{\circ}C$) обеспечивает довольно небольшое окно для технологии экструзии расплава. Это может быть изменено путем включения (R) - 3 - гидроксивалерата (3ГВ) или 4 - гидроксибутират (4ГБ) и 5 - гидроксивалерата (5ГВ) [36].

Сополимеры 3 - гидроксибутирата и 3 - гидроксивалерата (3ГБ-со-3ГВ) в отличие от гомогенного ПЗГБ обладают сниженной степенью кристалличности, поэтому изделия, изготовленные из них, обладают большей эластичностью и механической прочностью [12]. Синтез многокомпонентных ПГА является очень сложной биотехнологической задачей. Чтобы справиться с этим, нужно учитывать ряд факторов. Во-первых, быстрорастущие бактериальные культуры не могут давать высокие выходы ПГА, и для достижения высоких выходов полимеров необходимо обеспечить особые условия роста, а также высокую общую выработку биомассы. Во-вторых, мономеры, отличающиеся количеством атомов углерода, не могут быть включены в полимер с одинаковой скоростью,

поэтому в культуре микроорганизмов фракции мономеров в ПГА нестабильны. В-третьих, углеводородные кислоты, которые используются в качестве сопутствующих субстратов, токсичны для большинства микробных культур, поэтому важно определить максимально допустимые концентрации каждой кислоты для каждого продуцента ПГА [53].

1.2 Сфера использования полигидроксиалканоатов

В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях – от сельского хозяйства до медицины, так как по сравнению с обычными пластиками, получаемыми из нефти, ПГА разрушаются в аэробных и в анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами [9].

Биосовместимость ПГА основывается на том, что мономер, образующий данный полимер, — R-β-гидроксимасляная кислота, является естественным продуктом обмена высших животных и человека и присутствует в крови последних [1]. Сфера применения этих полимеров в медицине потенциально широки и могут включать изготовление медицинского инструментария и вспомогательных средств (нетканые и одноразовые изделия, шовные и перевязочные материалы), фармакологию (контролируемые системы доставки лекарств), восстановительную хирургию и трансплантологию [16]. Кроме того, преимущество ПГА заключается в том, что такими свойствами как кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, так же можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру. А так же ПГА можно использовать в различных фазовых состояниях (порошки, растворы, гели, расплавы) [14].

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.

[18]

Хотя технология культивирования и процесс экстракции полимера с каждым годом совершенствуются, в промышленном масштабе производство ПГА пока не может соревноваться с синтетическими пластиками из-за высокой стоимости субстратов для культивирования. Многообещающее направление для получения ПГА – использование растительных масел или жирных кислот. В настоящее время потенциальными источниками углерода для получения ПГА считаются такие растительные масла, как оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, пальмовое, подсолнечное, а также жирные кислоты (главным образом олеиновая) и богатые липидами отходы пищевой промышленности [9].

1.3 Синтез поли-3-гидроксибутират

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 [56]. Среди белков, связанных с гранулами ПГА, присутствуют ПГА-синтазы, ПГА-деполимеразы и группа низкомолекулярных белков, известных как фазины [39]. Фазины – основной компонент ПГА. Они прочно прикрепляются к гидрофобной поверхности гранул и способствуют биосинтезу ПГА [30]. Так же фазины определяют количество накопленного ПГА [40]. Первый фазин был идентифицирован 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, производящих ПГА, были обнаружены фазины [39].

Биосинтез полигидроксиалканоатов — сложный многоступенчатый процесс, различные стадии которого катализируют специфические ферменты [1].

На примере наиболее изученного из полигидроксиалканоатов — полимера β -гидроксимасляной кислоты, установлено, что пути его синтеза практически одинаковы у различных микроорганизмов (*Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*). Условия, обеспечивающие изменение направления анabolизма клеток с белковой программы на синтез ПГА, определяются окислительно-восстановительным состоянием цитоплазмы, внутриклеточной концентрацией пирувата и КоA.

При оптимальных условиях роста пируват, а также восстановительные эквиваленты в виде НАДН и НАДФН расходуются в основном в цикле трикарбоновых кислот на образование аминокислот, а также преобразование энергии в клетке, при этом сохраняется высокий уровень свободного КоA, что является препятствием для синтеза ПЗГБ. При несбалансированном росте, например при отсутствии азота в среде или дефиците кислорода, пируват не включается в цикл трикарбоновых кислот, а подвергается карбоксилированию с образованием ацетил-КоА, уровень свободного КоA при этом низок, что является благоприятным условием для активизации ферментов цикла ПЗГБ [5].

Биосинтез ПГА может осуществляться по восьми биосинтетическим путям. В последние годы показано, что синтез ПГА у *C. eutrophus* тесно связан с метаболизмом липидов, особенно если в качестве субстратов используются или длинноцепочечные жирные кислоты, или растительные масла [9].

Образование ПГА катализируют 3 фермента: β -кетотиолаза, ацетоацетил-КоА редуктаза, ПГА-синтаза [23]. Факторы, регулирующие их активности на генетическом и молекулярном уровнях, интенсивно изучаются, и считается, что β -кетотиолаза запускает синтез полимера, редуктаза регулирует скорость синтеза ПЗГБ, а синтаза отвечает за

качественные характеристики полимера (молекулярный вес, мономерный состав) и конечный выход ПГА [49]. В последние годы было предпринято много усилий для увеличения производства ПГА в разных микроорганизмах с помощью метаболической инженерии, чтобы обеспечить больше предшественников 3-гидроксиацил-КоА, полученных из цикла β -окисления жирных кислот.

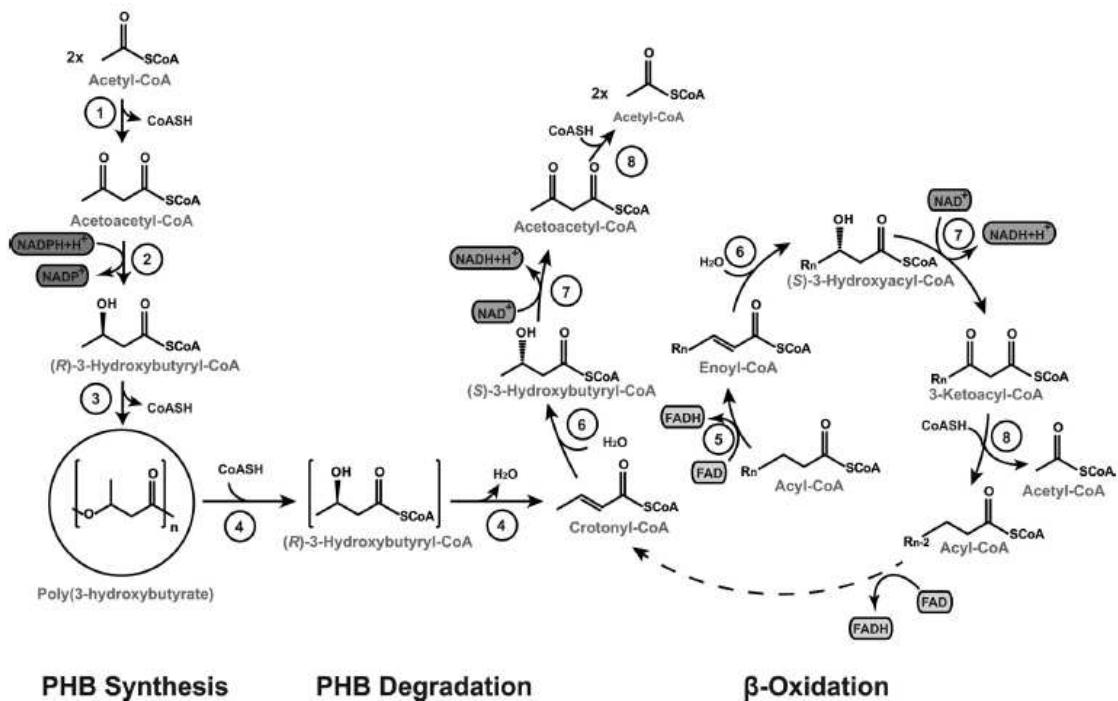


Рисунок 3- Синтез ПГБ, сопряженный с бета-окислением жирных кислот (Eggers and Steinbüchel 2014)

ПГБ синтезируется путем конденсации двух молекул ацетил-КоА до ацетоацетил-КоА с помощью β -кетотиолазы. Далее происходит восстановление ацетоацетил-КоА-редуктазой в NADPH зависимой реакции из ацетоацетил-КоА до (R)-3-гидроксибутирил-КоА. После чего, ПГА-синтаза включает мономеры в поли (R)-3-гидроксибутират. ПЗГБ деградирует до кротонил-КоА через (R)-3-гидроксибутирил-КоА с помощью ПГБ-деполимераз, хотя реакция возможна без высвобождения промежуточного соединения. Именно кротонил-КоА сочетает деградацию ПЗГБ с β -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-КоА с образованием усеченного ацил-КоА. Цикл окисления начинается снова с добавлением двойной связи с усеченным ацил-КоА [23].

ПГА-синтаза является ключевым ферментом синтеза ПЗГБ. Он катализирует полимеризацию 3-гидроксибутирил-КоА до ПЗГБ [44]. 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 по углероду *C. eutrophpha* 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 [23].

1.4 Внутриклеточная деградация полигидроксиаканоатов

Внутриклеточная деградация гранул ПГА происходит в условиях лимитирования углеродного субстрата. Внутриклеточная деградация ПЗГБ приводит к высвобождению 3-гидроксимасляной кислоты, которая под воздействием НАД-зависимой β -3-гидроксибутиратдегидрогеназы превращаются 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.

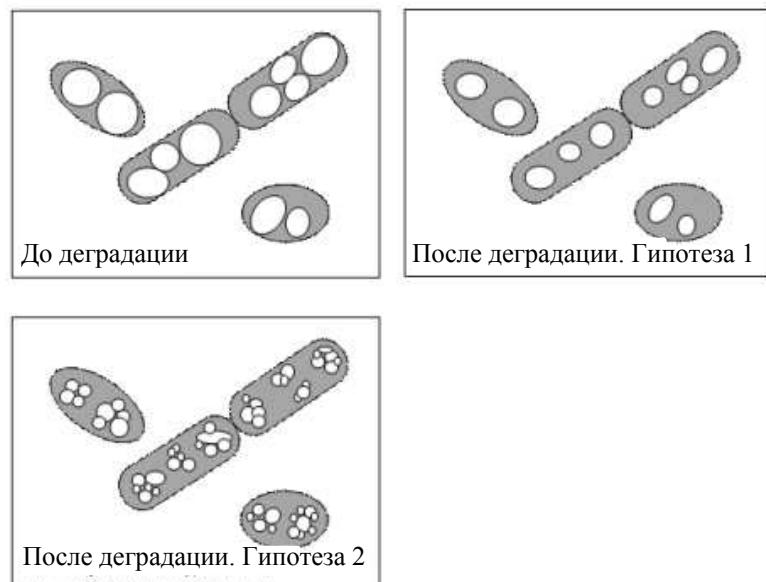


Рисунок 4 - Схема изменения морфологии гранул ПГА при деполимеризации (Ong et al 2017.)

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 *Delftia acidovorans* с 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 [42].

Существует достаточно много фактов, свидетельствующих о том, что синтез и деградация полимера в клетке происходят одновременно. Противоречивость данных разных авторов по данному вопросу была несколько разрешена работой Uchino с соавторами (Uchino et al., 2007), которые показали, что в нативных гранулах, во-первых, локализуются все ферменты синтеза и деградации полимера. Следовательно, деградация полимера может происходить одновременно с его синтезом. Во-вторых, баланс между синтезом и деградацией полимера регулируется внутриклеточными концентрациями ключевых метаболитов – КоA, ацетил-КоA, ЗНВ-КоA, НАД⁺ /НАД, т.е. на субстратном уровне. Если клетка при росте не испытывает дефицита в углероде, уровень ацетил - КоA выше его потребления, активность ПГА - синтазы будет высока, а активность деполимеразной ветви будет снижена, что стимулирует синтез полимера. Снижение поступления углеродного субстрата приведет к снижению концентрации ацетил-КоA, и, следовательно, будет повышаться активность деполимераз. Следовательно, чтобы максимизировать продукцию ПГА с минимальным гидролизом *in vivo*, важно использовать оптимальные условия культивирования [8].

1.5 Штаммы - продуценты полигидроксиалканоатов

Список микроорганизмов, способных аккумулировать ПГА, насчитывает свыше 300 организмов. Он включает природные и генетически модифицированные штаммы. Среди известных организмов - аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, хемоорганотрофы и хемоавтотрофы, фототрофные прокариоты, аэробные фотобактерии, архебактерии, анаэробные фототрофные бактерии и другие. При этом для применения рассматривают небольшое число видов. В качестве критериев для выбора потенциального продуцента ПГА принято рассматривать следующие показатели: химический состав, выход полимера, затраты углеродного

субстрата, концентрацию биомассы клеток в культуре, продуктивность процесса [6].

Для производства ПГА используются различные штаммы-продуценты и типы сырья. Это природные штаммы *Ralstonia eutrophus* (переименованные в *Cupriavidus eutrophus*); *Azohydromonas lata* (ранее *Alcaligenes latus*), *Aeromonas hydrophila*; *Pseudomonas oleovorans* [3].

Способность синтезировать ПГА без использования дорогостоящих органических сред, делает водородокисляющие бактерии перспективным коммерческим производителем ПГА [53]. Бактериальные штаммы рода *Cupriavidus* относятся к числу хорошо известных продуцентов ПГА из водородокисляющих бактерий. Способность водородокисляющих бактерий синтезировать ПГА в автотрофных условиях с CO₂ в качестве источника конструктивного метаболизма (анаболизма) и H₂ в качестве источника энергетического метаболизма (катаболизма) делает их перспективными для производства ПГА [31,33,50]. Тот факт, что некоторые из видов водородокисляющих бактерий являются устойчивыми к CO, указывает на возможность их культивирования с использованием таких исходных материалов, как промышленный водород (водородсодержащие продукты природного газа и конверсия угля, древесные отходы, гидролизный лигнин и т. д.) [49,54].

Как известно, многие штаммы *Cupriavidus eutrophus* растут на растительных маслах и жирных кислотах. Эти бактерии выделяют липазу, которая разрушает экзогенные масла, при этом свободные жирные кислоты активно переносятся через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану и активизируются коэнзимом А. Экзогенные жирные кислоты в виде ацил-КоА переправляются в β-окисление и через этот путь используются для метаболических нужд клетки. По всей вероятности, часть ацильных цепей с ацил-КоА непосредственно переносится в фосфолипиды клеточных мембран, в результате чего жирнокислотный состав модифицируется экзогенными жирными кислотами [9].

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 [20,21].

Фосфолипиды представлены фосфатидилэтаноламинами (ФЭ), фосфатидилглицеринами (ФГ) и диацилфосфатидилглицеринами или кардиолипинами (ДФГ), являющиеся основными липидными фракциями, формирующие бактериальную мембрану [12]. 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 [13].

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 [17, 57]. 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 [17]. Структура липополисахарида представлена на рисунке 5.

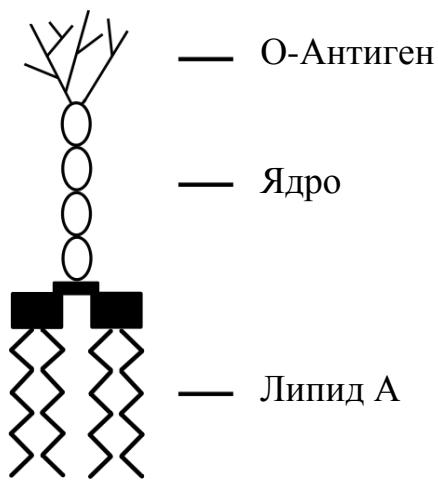


Рисунок 5-Структура липополисахарида

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 [38]. Эти жирные кислоты принято называть прочносвязанными.

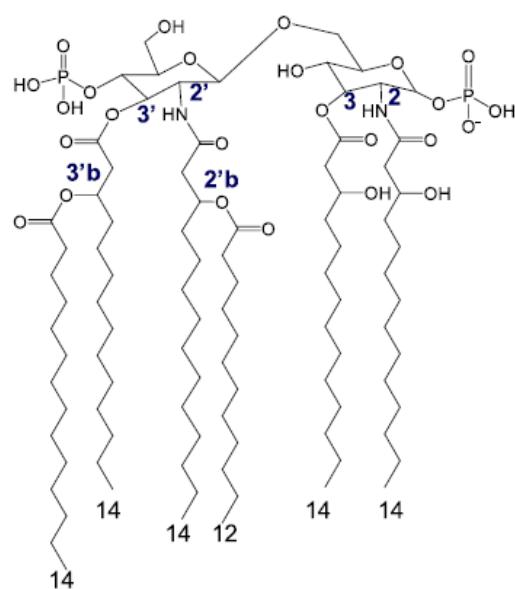


Рисунок 6-Структура липида А *E.coli* (Li, Y et al.,2016)

1.7 Жирнокислотный состав липидов бактериальной клетки

В последние годы липидный профиль интенсивно используется в хемотаксономии бактерий, а анализ состава жирных кислот является общепризнанным быстрым методом идентификации видов [19].

Жирные кислоты бактерий структурно довольно разнообразны. Изменение жирнокислотного состава является высокоэффективным механизмом адаптации и позволяет бактериям существовать в широком диапазоне условий среды. У прокариот липиды входят в состав клеточных мембран и клеточной стенки [7]. Они определяют основные функции в жизни клетки. Причем резервная функция не является основной, как у эукариот [25, 35]. Жирные кислоты бактерий являются составляющими компонентами клеточных мембран, которые в первую очередь контактируют и реагируют на все изменения в окружающей среде, поддерживая взаимосвязь между структурой и функцией мембранных, сохраняя оптимальную степень текучести липидных компонентов [19]. 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) [29].

Липиды бактериальных клеток представлены жирными кислотами с длиной цепи от 10 до 20 атомов углерода. Они могут быть объединены в четыре главные группы: насыщенные (не содержащие двойных связей), разветвленные (метилированные 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 распространеными являются: лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0).

Из ненасыщенных кислот в липидах бактерий преобладают пальмитолеиновая ($C16:1\omega7$) с двойной связью между 9 и 10 атомами углерода и цис-вакценовая кислота ($C18:1\omega7$) 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 [19, 46]. Циклопропановые жирные кислоты образуются добавлением метильной группы с помощью кофермента S – аденоцилметионина. Эти жирные кислоты являются частью фосфолипидов многих видов бактерий, и они связаны с процессом старения клеток, поскольку они производятся на стационарной стадии во время их культивирования.

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

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служил штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646. Этот штамм был зарегистрирован в Российской Национальной Коллекции Промышленных Микроорганизмов. Культурально-морфологические особенности штамма: грамотрицателен, клетки-палочки (молодые - короткие, в стационарной фазе - разной длины, размеры $0.3\text{-}0.5 \times 1.2\text{-}2.0$ мк), слабоподвижные. Оптимум роста $30\text{-}31^{\circ}\text{C}$, pH 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-OH- и 4-OH- масляную кислоту, пентапновую, гексановую, октановую, nonановую), спирты (этанол, глицерин), 4-бутиrolактон при гетеротрофном росте, и H₂, CO₂ и CO при автотрофном росте [26]. 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%.

Посевной материал исследуемого штамма получали ресуспендионием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде.

2.2 Культивирование и условия роста

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; KH_2PO_4 -1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,025, NH_4Cl -1,0 (г/л) и раствор микроэлементов (H_3BO_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; NaMoO_4 -0,050; NiCl_2 -0,008 (г/л)).

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,5 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 °С и 200 rpm. Культивирование бактерий проводили в течение 72 ч. В качестве углеродного субстрата использовали олеиновую кислоту. Начальная концентрация которой составляла 10-12 г/л. По ходу роста культуры и исчерпания субстрата делали добавки олеиновой кислоты в культуру в концентрации, аналогичной исходной. 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).

2.3 Мониторинг параметров процесса

Урожай биомассы бактерий в культуре регистрировали весовым способом. Для этого 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин на центрифуге Centrifuge с ротором 5810 R («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 («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) в течение 24 ч, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах 4-го класса точности (Mettler Toledo, Швейцария). Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом пустого бюкса.

Концентрацию олеиновой кислоты в культуре определяли после экстракции на хромато-масс-спектрометре (7890A/5975C, Agilent Technologies, USA). Для этого 5 мл культуры подкисляли серной кислоты до pH 2-3 и добавляли 3 мл хлороформа.

Общее содержание полимера в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре (7890A/5975C, Agilent Technologies, 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 Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_v) и среднечисловую (M_n) молекулярные массы, а так же полидисперсность ($\overline{P}D = M_v/M_n$).

2.4 Экстракция липополисахаридов из бактериальной культуры

Липополисахариды экстрагировали из клеток *C. eutrophus* B-10646

методом с использованием горячего фенола. Для этого 1,5 г биомассы поместили в 5 мл воды и суспензировали при температуре 68° С. После чего добавили 5 мл 90%-го водного раствора фенола и перемешивали в течение 1 часа при 68° С. Смесь охладили и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. В результате чего смесь разделилась на водную и фенольную фазу. Водную фазу диализировали в течении 24 часов (диаметр диализной мембранны 6-8 кДа), после чего проводили лиофилизацию ЛПС.

2.5 Экстракция липидов цитоплазматической мембранны

Выделение липидов производили через фильтр Шотта из сырой биомассы 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 фильтр Шотта во взвешенные колбы. Растворитель отгоняли на роторном испарителе. Колбы с экстрактом помещали в эксикатор для доведения до постоянного веса и взвешивали. По разности пустой и колбы с экстрактом определяли выход липидного экстракта (липиды и полимер). Далее полимер отделяли от липидов. Для этого экстракт растворяли в 2 мл хлороформа и добавляли двойной объем гексана. Полимер отделяли от липидов фильтрованием через фильтр Шотта. Растворитель отгоняли на роторном испарителе. Колбы с липидами помещали в эксикатор. После доведения липидов до постоянного веса, взвешивали и по разности определяли их содержание в сухой биомассе.

2.6 Приготовление метиловых эфиров жирных кислот для анализа на хромато-масс-спектрометре

Для получения жирных кислот, входящих в ЛПС, к лиофилизированным пробам добавляли по 2 мл 1N раствора KOH в 95%

этаноле. После чего смесь нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов.

Затем добавляли двойной объем воды, подкисляли серной кислотой до pH 2-3, экстрагировали жирные кислоты гексаном, пропускали через Na_2SO_4 . Жирные кислоты сушили на роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI).

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 Na_2SO_4 в грушевидную колбу, затем испарили гексан на роторном испарителе. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали на хромато-масс-спектрометре.

2.7 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 - 220⁰C; начальная температура хроматографирования - 120⁰C, подъем температуры до 230⁰C со скоростью 5⁰C в минуту; колонка капиллярная HP-FFAP, длина 30 м, диаметр - 0.25 мм; температура трансферной линии 250⁰C, источника ионов - 165⁰C, 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 β -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.

2.8 Микроскопическое исследование клеток

Образцы для просвечивающей электронной микроскопии готовились погружением медной ПЭМ сетки с перфорированной углеродной пленкой в водную суспензию бактерий, с последующим просушиванием на воздухе. Электронно-микроскопические исследования проводились на просвечивающем электронном микроскопе HT-7700, Hitachi при ускоряющем напряжении 60 кВ.

[изъято 7 стр.]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были исследованы физиолого-биохимические свойства бактерий *C. eutrophus* B-10646 в периодической культуре при росте на олеиновой кислоте.

Описаны характеристики роста бактерий, содержание и молекулярно – массовое распределение полимера, жирнокислотный состав липидов клеток, размерные параметры клеток. По итогам работы можно сказать, что олеиновая кислота является перспективным субстратом для синтеза ПГА по сравнению с культивированием на сахараах.

- 1) В течение 72 ч культивирования урожай биомассы составил 6,7 г/л с общим содержанием полимера 91%. Клетки синтезировали гетерополимер с включением 3-гидрокисвалерата 1,5-3%.
- 2) Основными жирными кислотами липидов цитоплазматической мембраны являлись: насыщенная 16:0, ненасыщенные 16:1 ω 7 и 18:1 ω 9. В жирнокислотном составе липополисахаридов преобладают α -ОН и β -ОН жирные кислоты с длиной цепи 14 и 16 атомов углерода.
- 3) На каждом этапе культивирования преобладали клетки длиной 1,1-2,5 мкм. В стационарной фазе роста встречались гигантские клетки длиной выше 20 мкм.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Антонова, Л.В. Возможности использования полиоксиалканоатов 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 полигидроксиалканоатов/ Journal of Siberian Federal University. Biology 2.-2014.- С.103-133.
4. Волова Т.Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов/ Journal of Siberian Federal University. Biology 2.-2015.- С.131-151.
5. Волова, Т.Г. Биосинтез на водороде / Т. Г. Волова; под ред. И. И. Гительзона; 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. Гусеев, 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 полигидроксибутират/ Калачева Г.С., Волова Т.Г. //Journal of Siberian Federal University Biology 2.-2015.- Р. 220-235.
9. Жила, Н.О. Характеристика культуры Cupriavidus eutrophus B-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахараах и

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

10. Захарова, Ю.В. Жирные кислоты клеточных стенок бифидобактерий с разной гидрофобностью/ Сухих А.С. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал).- 2015.- №3.- С. 1-12.

11. Калачева, Г. С. Состав жирных кислот липидов *Wautersia eutropha* в условиях активного синтеза полигидроксиалкоатов/ Волова Т.Г./Микробиология.- 2007.- Том 76, №5.- С. 608-614.

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

13. 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.

14. 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).

15. Трубачев, И.Н. Биохимический состав водородных бактерий в зависимости от условий роста/ Калачева Г.С., Андреева Р.И., Войтович Я.В./ Микробиология.-1971.-Том 40, № 3. -С.424-427.

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

17. 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.

18. 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.
19. Buyer, J.S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis // J. Microb. Meth.-2002.- Vol. 48.- P. 259–265.
20. Chatterjee, S. N. Outer Membrane Vesicles of Bacteria/ Chaudhuri K./ Springer Briefs in Microbiology.-2012.
21. Clifton, L.A. Asymmetric phospholipid: lipopolysaccharide bilayers; a Gram-negative bacterial outer membrane mimic/ Skoda M. W. A., Daulton E. L., HughesA.V., Brun A.P. L., Lakey J.H., Holt S.A./ Journal of the royal society interface.-2013.- Vol.10.- P. 1-11.
22. Dennis, W. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria/ Grogan, Cronan// Microbiology and molecular biology reviews.- 1997.- Vol. 61, No 4.- P. 429–441.
23. 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.
24. Galbraith, L. Lipids and fatty acids of Burkholderia and Ralstonia species/ Jonsson M.H., Rudhe L. C., Wilkinson S.G. // FEMS Microbiol. Lett.- 1999.- Vol. 173.- P. 359–364.
25. 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.
26. 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.

27. Goh, L. K. Enhancement of Stress Tolerance in the Polyhydroxyalkanoate Producers without Mobilization of the Accumulated Granules / Purama R.K., Sudesh K./*Applied Biochemistry and Biotechnology*.- 2014.- Vol.172.- P. 1585–1598.
28. 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.
29. Grogan, D. W. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria / Cronan J.E./*Microbiol. Mol. Biol. Rev.*-1977.- Vol. 61.-P. 429-441.
30. 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.
31. Ishizaki, A. Microbial production of poly-D-3- hydroxybutyrate from CO₂/ Tanaka K., Taga N./*Appl. Microbiol. Biotechnol.*-2001.-Vol. 57.- P. 6–12.
32. Jendrossek, D. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates/ Handrick, R./*Annu. Rev. Microbiol.*-2012.-№56.-P.403-432.
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. Kim, I. S, Alterations in fatty acidcomposition and fluidity of cell membranes affect the accumulation of PCB con-gener 2,2',5,5'-tetrachlorbiphenyl by *Ralstonia eutropha* H850// Beaudette L. A, Cassydy M. B, Lee H, Trevors J. T./*Chem TechnolBiotechnol.*- 2002.-Vol.77.- P. 793–799.
35. 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.

36. 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.

37. Lerch, T. Z Effect of glucose on the fatty acidcomposition of Cupriavidus necator JMP134 during 2,4-dichlorophenoxyaceticacid degradation: implications for lipid-based stable isotope probing methods/ Dignac M. F, Barriuso E., Mariotti A.// Appl Environ Microbiol.- 2011.- Vol. 77.- P. 296–306.

38. Li, Y. Structural derivation of lipid A from Cronobacter sakazakii using tandem mass spectrometry/ Yoon S.H., Wang X., Ernst R.K., Goodlett D. R.// Research Article.-2016.-Vol.30.- P. 2265–2270.

39. Mezzina, M.P. Phasins, the multifacetic polyhydroxyalkanoate granule associated proteins/ Pettinari M.J.// Applied and environmental microbiology.-2016.-Vol.82, №17.- P. 5060-5067.

40. Mravec, F. Accumulation of PHA granules in Cupriavidus necator as seen by confocal fluorescence microscopy/ Obruca S., Krzyzanek V., Sedlacek P., Hrabanova 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. Ong, S. Y. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA) / Chee J. Y., Sudesh K. // Journal of Siberian Federal University. Biology.-2017.- Tom 10.- C. 211-225.

43. Osterhout, G.J Phenotypic and genotypic of clinical strainsof CDC group IVc-2/ Valentine J. L, Dick J. D. J// Microbiol.- 1998.- Vol. 36.- P. 2618–22.

44. 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.

45. Rezania, S. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from Escherichia coli and Salmonella typhi/ Amirmozaffari N., Tabarraei B., Jeddi-Tehrani M., Zarei O., Alizadeh R., Masjedian F., Zarnani

A.H./ Avicenna Journal of Medical Biotechnology Avicenna Journal of Medical Biotechnology.-2011.- Vol. 3, No. 1.- P.3-9.

46. Serrazanett, 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.

47. Srivastava, S. K. Effect of saturated and unsaturated fatty acid supplementation on bio-plastic production under submerged fermentation/ Tripathi A. D./*Biotech*.- 2013.- Vol. 3.- P. 389–397.

48. Tanadchangsang, 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.

49. Tanaka, K. Cell growth and P(3HB) accumulation from CO₂ 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.

50. Tanaka, K. Production of poly(D-3- hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*/ Ishizaki A., Kanamaru, T., Kawano T./*Biotechnol. Bioeng.*- 1995.- Vol.45.- P. 268–275.

51. 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.

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

53. 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., Sinskey A. J./*Journal of Siberian Federal University. Biology* 3.- 2012.- P. 280-299.

54. 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.

55. Volova, T.G. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, Cupriavidus eutrophus B-10646/ 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./*Bioresource Technolog.* – 2013.-Vol.146.- P.215-222.

56. 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.

57. Zankharia, U. S. Extraction, Characterization and Determination of Immunoreactivity of Lipopolysaccharide of *Salmonella typhi*/ vnsru 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 биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Особенности роста, липидного обмена и
аккумуляции резервных биомолекул в культуре
штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646, культивируемого на олеиновой
кислоте

Руководитель	 подпись, дата	к.б.н., доцент	Жила Н.О.
Выпускник	 подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
			Богданова О.А.
			инициалы, фамилия

Красноярск 2018