

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова
« ____ » _____ 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Исследование накопления биомассы, полимера и липидов бактериями
Cupriavidus necator В-10646, культивируемыми на фруктозе

Руководитель _____ доцент, к.б.н., Н.О. Жила
подпись, дата

Выпускник _____ Я.В. Филиппова
подпись, дата

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа на тему «Исследование накопления биомассы, полимера и липидов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646, культивируемыми на фруктозе» содержит 48 страниц текстового документа, 61 использованный источник, 2 таблицы и 12 рисунков.

Ключевые слова: *Cupriavidus necator*, полимер, полигидроксиалканоаты, динамика накопления, липиды, жирные кислоты, бактериальная биомасса, фазы культивирования.

Целью работы являлось исследование динамики накопления биомассы клеток, ПГА и липидов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать динамику накопления биомассы, полимера и липидов у бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, выращиваемых на фруктозе;
2. Изучить изменения в жирнокислотном составе липидов на разных стадиях культивирования исследуемого штамма.

Актуальность данной работы заключается в нижеследующем.

Возможность замены нефтехимических пластмасс на полигидроксиалканоаты имеет важный промышленный потенциал в будущем, так как ПГА обладает многими уникальными характеристиками и разрушается в природной среде естественным путем, без вреда для неё. Поэтому, широкопрофильное исследование штамма способного поставлять ПГА и характеристика накапливаемого им полимера, является значимым этапом в получении промышленно значимых продуктов.

Оглавление

| | |
|--|----|
| РЕФЕРАТ | 2 |
| Введение | 5 |
| Глава 1. Обзор литературы | 8 |
| 1.1 Общая характеристика полигидроксиалканоатов | 8 |
| 1.2 Классификация и структура ПГА..... | 9 |
| 1.3 Синтез ПГА..... | 12 |
| 1.4 Продуценты ПГА | 13 |
| 1.5 Характеристика липидов бактерий | 15 |
| 1.6 Взаимосвязь между синтезом ПГА и жирнокислотным составом клетки | 17 |
| Глава 2. Материалы и методы | 18 |
| 2.1 Бактериальный штамм..... | 18 |
| 2.2 Культивирование, ход эксперимента и условия роста бактерий | 19 |
| 2.3 Подготовка инокулята | 20 |
| 2.4 Методы измерения параметров культивирования..... | 20 |
| 2.4.1 Определение оптической плотности бактериальной культуры | 20 |
| 2.4.2 Определение концентрации фруктозы в среде | 20 |
| 2.4.3 Определение концентрации биомассы бактерий..... | 21 |
| 2.4.4 Определение концентрации мочевины в среде..... | 21 |
| 2.5 Определение содержания полимера..... | 22 |
| 2.6 Экстракция липидов цитоплазматической мембраны и полимера..... | 22 |
| 2.7 Омыление липополисахаридов..... | 23 |
| 2.8 Метанолиз жирных кислот..... | 24 |
| 2.9 Определение содержания белка в клетке | 24 |
| 2.10 Анализ молекулярно-массовых характеристик полимера..... | 25 |

| | |
|--|----|
| Глава 3. Результаты | 26 |
| ЗаКЛЮЧЕНИЕ | 39 |
| Список сокращений | 41 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 42 |

Введение

Полимеры, полученные из нефтехимического сырья, очень популярны и востребованы благодаря своим разнообразным свойствам, таким как прочность, устойчивость к деградации, легкость, гибкость [1]. За счет своей практичности, разнообразию и всестороннему применению в домашнем, фармацевтическом и коммерческом секторах синтетические полимеры стали незаменимым товаром в современном обществе [2]. Сообщается, что ежегодный синтез пластмасс, полученных из нефти, составляет более 300 миллионов тонн, и ежегодно во всем мире потребляется около 150 миллионов тонн синтетических пластмасс и материалов на их основе [3, 4]. По оценкам, ежегодно в океан вымывается 10 миллионов тонн пластика, что оказывает пагубное воздействие на океаническую экосистему [5]. Спрос на пластмассы и изделия из них постоянно растет в связи с модернизацией и ростом населения [6], что в конечном итоге может привести к серьезным экологическим проблемам [7, 8]. Из-за медленной скорости разложения и образования токсичных побочных продуктов переработка пластика является наиболее подходящим способом обращения с данными отходами, но этот процесс чрезвычайно медленный и затруднен из-за разнообразных свойств различных пластиков. Пластиковые материалы имеют широкий спектр применения, поэтому сортировка выбрасываемых остатков весьма проблематична. Кроме того, наличие разнородных материалов и добавок, таких как покрытия, наполнители и красящие материалы, ограничивает их переработку [4]. В России объем полимерных отходов составляет около 750 тыс. т в год, при этом лишь 3–10 % из них используется вторично [9].

Поэтому переход на новые типы материалов, которые разрушаются в природной среде естественным путем до безвредных продуктов, становится насущной проблемой. Полимеры, получаемые из природного сырья или синтезируемые микроорганизмами (так называемые биополимеры, или биопластики), в отличие от нефтепродуктов, практически не вносят вклад в пополнение парниковых газов и глобальное потепление. Одно из преимуществ использования

биоразлагаемых полимеров на биологической основе – возможность помочь обновить «углеродный цикл», или «реинкарнацию углерода» [10].

Среди различных групп биополимеров (полилактиды, полигликолиды, полиэтиленгликоль, поликапролактан, полиуретаны и др.) наиболее известны полигидроксиалканоаты (ПГА). Это сложные полиэфиры, синтезируемые множеством бактерий в виде соединения углерода и энергии. Они накапливаются в виде внутриклеточных гранул при избытке субстрата (источников углерода) в условиях ограниченного содержания кислорода, азота, фосфора (питательных веществ) или даже при колебаниях pH питательной среды. Полимеры на основе ПГА являются полностью биоразлагаемыми, а их скорость разложения в природных условиях намного выше, чем у химического сырья. Оставшиеся отходы биополимера запросто могут быть выброшены или компостированы для использования в качестве углеродного сырья, таким образом, реализуя концепцию «от колыбели до колыбели» (Cradle-to-Cradle) [11,12,13, 15].

Наиболее перспективными продуцентами для биотехнологического производства биоразрушаемых пластиков являются водородокисляющие бактерии *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*, *Hydrogenomonas*, *Alcaligenes*, *Wautersia*), группа грамотрицательных факультативных хемолитоавтотрофных аэробных бактерий, способных накапливать полимер до 80-90% на сухое вещество. Прежде всего, перспективность водородокисляющих бактерий определяется их высоким органотрофным потенциалом.

Возможность замены пластмасс на полигидроксиалканоаты имеет большой промышленный потенциал в будущем, так как ПГА обладает многими уникальными характеристиками, такими как: высокая устойчивость к ультрафиолетовому излучению, антиоксидантные, газобарьерные свойства, оптическая проводимость, нетоксичность, а также термоэлектрические свойства, которые обычно применяются в медицине, тканевой инженерии и упаковочных материалах [14]. Тем не менее, высокая стоимость производства является одним из основных факторов, которые затрудняют реализацию ПГА на глобальном уровне. Кроме того, многие аспекты физиологии накопления и разрушения

ПГА остаются всё ещё не изученными. В связи с этим, широкопрофильное исследование штамма способного поставлять ПГА и характеристика накапливаемого им полимера, до сих пор являются актуальной научной работой для получения промышленно значимых продуктов.

Целью выпускной квалификационной работы являлось исследование динамики накопления биомассы клеток, ПГА и липидов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать динамику накопления биомассы, полимера и липидов у бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, выращиваемых на фруктозе;
2. Изучить изменения в жирнокислотном составе липидов на разных стадиях культивирования исследуемого штамма.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Общая характеристика полигидроксиалканоатов

История изучения класса полигидроксиалканоатов берет начало в 1900-х годах. Впервые ПГА были обнаружены в 1888 г. Бейеринком, однако, учёный не смог определить их химическую структуру и роль. В 1926 году французский исследователь Лемонг получил поли(3-гидроксibuтират) (П(ЗГБ)) из *Bacillus megaterium*. В 1958 г. Макрэй и Уилкинсон доказали, что ПГА в бактериальных клетках играют роль резерва углерода и энергии, и синтезируются клетками только в условиях ограниченного роста [15].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой нерастворимые в воде соединения запасной природы, которые синтезируются различными микроорганизмами в виде гранул, во время стрессовых ситуаций [15]. Они биосинтезируются при определенных условиях: избытке углерода (в качестве субстрата) и ограниченной концентрации основных питательных веществ для роста, таких как азот, фосфор, сера, кислород, магний и т.д. Когда источник углерода в среде исчерпан, накопленные ПГА деполимеризуются, и продукты их разложения могут использоваться в качестве источника углерода и энергии [16, 17]. Долгое время считалось, что ПГА накапливаются только в цитоплазме бактериальных клеток в виде гранул, имеющих диаметр от 0,2 до 0,5 мкм [18]. Однако в 2006 г. было обнаружено, что ПГА также могут выделяться во внеклеточную среду генетически модифицированным видом *Alcanivorax borkumensis* SK2 [19].

Свойства ПГА:

Физические и химические свойства полимеров ПГА отличаются друг от друга из-за различий в химическом и структурном составе мономерного звена ПГА. Полимеры ПГА нерастворимы в воде, что помогает противостоять гидролитическому воздействию, а их способность тонуть в воде ускоряет биodeградацию в отсутствие кислорода [20]. Более того, они очень биосовместимы, биоразлагаемы по своей природе [21]. Биоразлагаемость полимеров сильно за-

висит от природы и химического состава входящих в них компонентов, преобладающих условий окружающей среды и вида микроорганизмов [22, 23].

Полимер растворим в хлороформе и дихлорметане (ДХМ) и нерастворим в гексане (нехлорированных растворителях). Температура стеклования и температура плавления полимеров ПГА находятся в диапазоне от -50 до 4°С и 40–180°С соответственно [24].

Биоразлагаемость ПГА:

Высокая биоразлагаемость ПГА, обеспечивает преимущество над его синтетическими аналогами [25]. Гидролазы и деполимеразы -ПГА, выделяемые бактериями, представляют собой два хорошо известных фермента, которые способствуют разложению данных биополимеров [26].

Ключевые свойства, определяющие биоразлагаемость ПГА в окружающей среде: химический состав, длина полимерной цепи, кристалличность и сложность полимера. Также, условия окружающей среды, такие как температура, рН, влажность и содержание кислорода, являются наиболее важными факторами, играющими решающую роль в биодеградации полимеров. Исследования [27] сообщали, что биодеградация полимеров ПГА в анаэробных осадках сточных вод может происходить за несколько месяцев, а в соленой воде может занимать годы; ультрафиолетовый свет может ускорять деградацию [28]. Из-за биосовместимой природы полимеры ПГА не/почти не токсичны в живых системах [29]. В организме млекопитающих гидролиз и деградация протекают очень медленно. По сообщениям Pouton and Akhtar, 1996 [30]., после имплантации полимера мышам, за 6 месяцев он разложился только на 1,6%.

1.2 Классификация и структура ПГА

Полигидроксиалканоаты – это класс сложных линейных полиэфиров, состоящих из мономеров гидроксикислот, связанных эфирной связью. Химическая структура молекул ПГА асимметрична (хиральна). Эфирные связи обра-

зуются путем соединения карбоксильной группы первого мономера с гидроксильной группой следующего мономера [31].

Структурный состав ПГА зависит как от типа субстрата применяемого в качестве источника углерода, так и от используемого бактериального штамма. Боковая цепь может быть насыщенной или ненасыщенной и может содержать разветвленные, ароматические, галогенированные и даже эпоксидированные мономеры. Например, из *Pseudomonas putida* были извлечены ПГА, включающие такие компоненты, как бромид и ароматические группы [32]. Кроме того, химические модификации боковых цепей ПГА можно использовать для введения желаемой функциональной группы в природные ПГА, что в значительной степени влияет на свойства материала полимеров [33]. Общая структурная формула полигидроксиалканоатов представлена на рисунке 1:

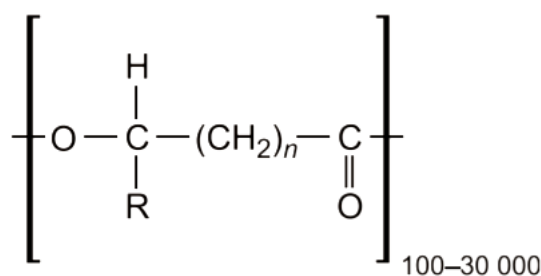


Рисунок 1 – Общая структурная формула полигидроксиалканоатов [34].

Основные структуры:

- n = 1 R = водород - поли (3-гидроксипропионат),
- R = метил - поли (3-гидоксибутират),
- 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-гидоксибутират),
- n = 3 R = водород - поли (5-гидроксивалерат) [34].

В зависимости от набора мономеров, образующих полимеры, ПГА классифицируются как гомополимеры, если в полимере представлен только один тип мономера, и сополимеры (также называемые гетерополимерами), если они построены из различных мономеров [35].

В зависимости от количества атомов углерода в мономерных звеньях, ПГА можно разделить на три группы:

1. Короткоцепочечные (short-chain-length, SCL), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов, являются природными термопластиками;
2. Среднецепочечные (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода, представляют собой природные эластомеры;
3. Длинноцепочечные (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот C17 и C18.

Перечень ПГА постоянно пополняется; сравнительно недавно предложено подразделить их дополнительно в зависимости от частоты встречаемости на две категории: «обычные» и «необычные» ПГА. К «обычным» ПГА относят полимеры, которые синтезируют микроорганизмы внутриклеточно в качестве запасных макромолекул. Эта группа включает полимеры, состоящие из известных мономеров [(R)-3-гидроксипропионата, (R)-3-гидроксипропионата, (R)-3-гидроксивалерата, (R)-3-гидроксигексаноата, (R)-3-гидроксиоктаноата, (R)-3-гидроксидеканоата и (R)-3-гидроксидодеканоата] или из их комбинаций. Термин «необычные» ПГА объединяет широкий спектр высокомолекулярных соединений, среди них полимеры микробного происхождения, которые синтезируются либо из природных мономеров, несущих различные функциональные группы, либо из их химических производных, а также полимеры, полученные химическим синтезом, либо химической модификацией исходных микробных полимеров [36].

1.3 Синтез ПГА

Метаболизм микроорганизмов регулируется средой, в которой они выращены. При сбалансированном росте микроорганизм использует субстрат в качестве источника энергии и/или для поддержания/формирования клеточного материала. Однако когда в среде имеется как ограниченное количество необходимых питательных веществ, так и избыток углерода, углеродный субстрат используется для образования биополимеров, которые могут храниться в виде энергетических клеточных запасов.

Метаболизм фруктозы как основного источника углерода:

Фруктокиназа катализирует фосфорилирование фруктозы. Затем фруктоза-6-фосфат, преобразуется в глюкозу-6-фосфат (фосфоглюкозную изомеразу) и далее разлагается в ЭД-путь с глюконат-6-фосфатом в качестве одного из промежуточных продуктов. Фруктоза катаболизируется в пути Энтнера-Дудорова с 2-кето-3-дезоксиглюконон-6-фосфатальдозой в качестве ключевого фермента, образуя пируват в конечном итоге. Фосфофруктокиназа и 6-фосфоглюконон-6-дегидрогеназа отсутствуют у *S. necator*, поэтому путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса и окислительный путь пентозофосфата являются неполными. Однако гены для анаболически действующего ЭМП-пути присутствуют у *S. necator* [37]. Пируват, образующийся в ЭД-пути, далее декарбоксилируется комплексом пируватдегидрогеназы с образованием ацетилкофермента А (КоА). Последний используется в анаболических путях для синтеза незаменимых соединений, таких как аминокислоты и липиды, направляется на синтез П(ЗГБ), хранится в качестве источника энергии и углерода или непосредственно окисляется в ЦТК.

Непосредственно биосинтез ПГА:

Синтез ПГА в микроорганизме имеет три известных пути. Первый путь хорошо изучен у *S. Necator* (при выращивании на сахарах): фермент бета-кетотиолаза катализирует конденсацию двух ацетил-КоА молекул с образованием ацетоацетил-КоА и HS-КоА. Затем ацетоацетил-КоА восстанавливается

NADPH+H⁺, взаимодействуя с ферментом ацетоацетил-КоА-редуктазой. Происходит формирование мономерного предшественника (R)-3-гидроксибутирила-КоА и окисленной формы NADP⁺. В конце концов, образуется П(ЗГБ), синтез которого катализируется ПГА-синтазой посредством полимеризации 3-гидроксибутирила-КоА путем этерификации [38].

На втором пути, включающем биосинтез жирных кислот *de novo*, мономеры различной длины могут быть образованы путем переэтерификации 3-гидроксиацил-АСР, промежуточного соединения FAS II, в 3-гидроксиацил-КоА, предположительно ферментом ацил-АСР-КоА трансацилазой, кодируемым геном *phaG*. Этот фермент является ключевым связующим звеном между синтезом жирных кислот *de novo* и биосинтезом полигидроксиалканоатов [31,39]. Этот способ представляет биотехнологический интерес, поскольку помогает генерировать мономеры для синтеза полигидроксиалканоатов из структурно несвязанных и простых, недорогих источников углерода, таких как глюкоза или родственные простые сахара (сахароза, фруктоза).

В третьем варианте мономеры различной длины также могут быть получены из пути β-окисления жирных кислот либо путем превращения 2-еноил-КоА с помощью R-специфичной еноил-КоА-гидратазы, кодируемой геном *PhaJ*, либо путем восстановления 3-кетацила-КоА (кодируемого генами *FabG* или *PhaB*) В этом случае состав мономера связан с используемым источником углерода [31].

1.4 Продуценты ПГА

Из-за более высокой аккумулирующей способности производство ПГА из бактериальных культур является более экономичным по сравнению с производством их из других живых организмов, особенно растений [38]. На данный момент насчитывают около 300 штаммов продуцентов, способных синтезировать и накапливать ПГА, среди которых присутствуют как природные штаммы, так и генетически модифицированные. Микроорганизмы продуценты могут быть

самые разнообразные – анаэробные, аэробные, гетеротрофные, хемоорганотрофные, хемоавтотрофные, фототрофные прокариоты, олиготрофные полипростековые бактерии, анаэробные фототрофные бактерии, аэробные фотобактерии, архебактерии и др. [40, 41].

Бактерии, продуцирующие ПГА, могут быть классифицированы на основе питательного стресса, модели роста и потребности в питательных веществах [42]. Согласно этой классификации, бактерии разделены на две группы. Первая группа является основной, в неё входят микроорганизмы, выделяющие полимер при недостатке питательных веществ и избытке углерода, они не могут биосинтезировать ПГА во время своего роста [43]. Примерами служат: *Pseudomonas putida*, *Cupriavidus necator*. Синтез ПГА второй группой не зависит от поступления питательных веществ, они способны на накопление ПГА во время стадии роста [44]. Ученые [45] сообщают, что мутантные штаммы *Azotobacter vinelandii*, рекомбинантные *Escherichia coli* и *Alcaligenes latus* являются примерами бактерий, принадлежащих к этой группе.

В промышленности используется всего несколько высокопродуктивных видов микроорганизмов: водородокисляющие бактерии *Azohydromonas lata*, *Cupriavidus necator*, азотфиксирующие *Azotobacter vinelandii*, метилотрофы *Methylomonas*, *Methylobacterium organophilum* [27].

Главными аспектами подбора штамма продуцента ПГА являются: показатели продуктивности по биомассе клеток и полимеру, расходы (исчерпание) углеродного субстрата на биосинтез полимера, а также химический состав самого полимера. Бактерии *Cupriavidus necator*, имеют наиболее развитую внутриклеточную систему синтеза ПГА. Они способны аккумулировать ПГА различной химической структуры с высокими выходами полимера при выращивании на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств. [35, 46, 47].

Некоторые бактерии способны синтезировать и накапливать одновременно несколько разных типов ПГА. Например, *Pseudomonas sp. 61-3* синтезирует два типа ПГА: поли(3-гидроксибутират) – ПГА1, и поли(3-гидроксибутират-со-

3-гидроксиалконат) – ПГА2. ПГА1 является гомополимером, а ПГА2 – гетерополимером, состоящим из 3-х гидроксиалконоатных единиц, содержащих 4-12 атомов углерода. С помощью электронной микроскопии, исследователи обнаружили, что в *Pseudomonas sp.* ПГА1 и ПГА2 накапливаются в виде разнообразных гранул в одной и той же клетке [48].

1.5 Характеристика липидов бактерий

Синтез полигидроксиалканоатов для ряда бактерий тесно связан с метаболизмом липидов и жирных кислот, так как источником мономера для полимера являются промежуточные метаболиты синтеза или бета-окисления жирных кислот.

В настоящее время точно не установлено, какие именно функции липиды выполняют в жизни клетки. Бактерии никогда не запасают липиды в виде триацглицеринов, хотя для эукариот данные вещества являются основными резервами клетки. Для некоторых бактерий единственным запасным веществом липидной природы служит полимер β -гидрооксимасляной кислоты. Поэтому аккумуляторная функция бактериальных липидов, не похоже, что является основной [49].

По литературным данным, большая часть липидов содержится в наружной мембране клеточной стенки и цитоплазматической мембране. Из этого можно сделать вывод, что бактериальные липиды связаны со структурными элементами клетки, и видимо, на этом уровне регулируют жизнедеятельность микроорганизмов. Основная часть бактериальных липидов представлена фосфолипидами, гликолипидами, липополисахаридами и другими сложными соединениями. При рассмотрении фосфолипидных компонентов, находящихся в бактериях, обнаружены: фосфатидная кислота (ФК), фосфатидиглицерин (ФГ), дифосфатидиглицерин (кардиолипин), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ).

К самым характерным липидам грамотрицательных бактерий можно отнести липополисахариды (ЛПС), локализующиеся в наружной мембране клеточной стенки и составляющие около 75% поверхности и 5-10% от общей сухой массы бактерий [50]. Наружная мембрана грамотрицательных бактерий представляет собой асимметричный двухслойный слой, состоящий из фосфолипидов во внутреннем слое и липополисахаридов во внешнем [51]. ЛПС структурно состоят из трех частей: гидрофобного липида А – являющегося гидрофобным якорем [52], который прикрепляет молекулу ЛПС к наружной мембране, фосфолипидного основного олигосахариды, который содержит примерно 10 сахарных остатков [51] и повторяющегося полисахарида, который обозначен как антиген «О» [50]. Фосфолипиды также являются основными липидами грамотрицательных бактерий. Большинству таких бактерий характерно высокое содержание фосфатидилэтаноламина. Он может составлять до 90 % от общих фосфолипидов. Содержание фосфатидилглицерина и кардиолипина колеблется от 5 до 15 %, и их количество может зависеть от возраста культуры и других факторов роста [53].

Для ряда бактерий отмечено наличие новых или необычных фосфолипидов – например, ацилпроизводные фосфатидилглицерина, разнообразные лизофосфолипиды и гликофосфолипиды, сульфосфолипиды. Многие бактерии синтезируют метилированные производные фосфатидилэтаноламина – N-метилфосфатидилэтаноламин и N,N-диметилфосфатидилэтаноламин. Считалось, что фосфатидилхолин не встречается у бактерий, потому что они лишены ферментов, осуществляющих синтез холина. Однако это мнение ошибочно. [54, 55].

Также все чаще появляются работы, в которых сообщается о содержании стерина, эфиров стерина или стероидов у различных представителей прокариот [53].

1.6 Взаимосвязь между синтезом ПГА и жирнокислотным составом клетки

Клетки *C. necator* проявляют повышенную степень насыщения при индукции накопления ПГА, это объясняется тем, что микроорганизмы в ответ на изменения условий среды могут менять состав своей клеточной мембраны. Что касается данной адаптации, наиболее преобладающий ответ включает изменения процентного содержания насыщенных (предельных) и ненасыщенных (непредельных) жирных кислот (ЖК), что обычно называют степенью насыщения ЖК, которое влияет на текучесть мембраны. В исследованиях [56] при благоприятных условиях культивирования, установленных во время экспоненциальной фазы, клеточные мембраны *C. necator* адаптировались к окружающей среде за счет увеличения их текучести, в основном из-за снижения относительного процента насыщенных ЖК и увеличения процента ненасыщенных ЖК. Эта стратегия, по-видимому, облегчает поглощение субстрата и деление клеток.

Как только для запуска синтеза ПГА были введены лимитирующие условия по азоту, степень насыщения ЖК клеточной мембраны увеличивалась со временем в большей или меньшей степени в зависимости от источников углерода и примененного растворенного кислорода, тем самым способствуя растяжению мембраны для размещения гранул ПГА. Полагается, что более насыщенные мембраны становятся прочнее из-за отсутствия двойных связей и могут без повреждений вмещать в себя необходимое количество полимера.

При ограничении азота клетки не могут делиться, и фактически считается, что синтез ЖК *de novo* не происходит в нерастущих клетках. Это означает, что изменения на уровне степени насыщения, вероятно, происходят за счет ферментативной конверсии имеющихся насыщенных и ненасыщенных ЖК, т.е. ненасыщенные ЖК, используются для получения замещенных насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот [56].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Бактериальный штамм

В данной работе был использован штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, зарегистрированный во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Штамм получен из *Ralstonia eutropha* В-8562 в ходе продолжительной многостадийной селекции по эффективности синтеза многокомпонентных ПГА.

C. necator хорошо приспособлен к регулярно меняющимся условиям среды, так как распространен повсеместно как в почве, так и в пресной воде. Генетический потенциал и метаболическая универсальность данного микроорганизма позволили считать его модельным в микробиологии в отношении водородной хемолитоавтотрофии, синтеза ПГА и других биопродуктов [57].

Культурально-морфологические особенности микроорганизма: грамотрицателен, клетки-палочки (молодые - короткие, в стационарной фазе - разной длины, размеры 0.3-0.5×1.2-2.0 мк), подвижные (молодые - монотрихи, с возрастом - перетрихи). Слабоподвижен. Оптимум роста 30-31°C, рН 6,7-7,2. Является факультативной хемолитоавтотрофной β-протеобактерией.

Аэробное дыхание играет основную роль в метаболизме, но помимо него *C. necator* способен использовать нитрат и нитрит в качестве альтернативных акцепторов электронов в условиях аноксии [58]. При гетеротрофном росте различные углеводы, липиды и органические кислоты служат источником углерода и энергии, тогда как в отсутствие органических соединений, смесь H₂, СО₂ и О₂ позволяет *C. necator* расти автотрофно. В зависимости от ситуации в среде обитания, *C. necator* может легко переключаться между автотрофией и гетеротрофией [59]. Миксотрофный рост наблюдается, когда *C. necator* использует одновременно органические и неорганические субстраты в качестве углерода и источника энергии [60].

2.2 Культивирование, ход эксперимента и условия роста бактерий

Условия роста:

Для выращивания бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 за основу была принята жидкая минеральная солевая среда Шлегеля, следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,0 г/л; KH_2PO_4 – 1,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 г/л, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ – 1,0 г/л. Микроэлементы добавляются по прописи Хоаганда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,050 г/л; NiCl_2 – 0,008 г/л. В качестве источника углерода использовалась фруктоза в начальной концентрации: 20 г/л. В приготовленную среду добавляли 20 мл инокулированной музейной культуры (получение инокулята указано в пункте 2.3).

Бактерий 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°C и 200 об/мин. Все эксперименты проведены трехкратности.

Ход эксперимента:

Выращивание проводили в течение 165 часов, в роли контрольных точек были выбраны следующие часы культивирования: 20, 35, 44, 60, 72, 85, 96, 120, 144, 165, во время которых отбирали пробы на: определение оптической плотности культуры, концентрации фруктозы в среде, мочевины, концентрации биомассы бактерий, содержания полимера, липидов, белка и состава и соотношения жирных кислот липидов.

На 20 час культивирования делали добавку фруктозы в концентрации: 7,5 г/л для дальнейшего роста культуры. Далее, следили за концентрацией субстрата (фруктозы) и питательных веществ (азота) и после их исчерпания, на 72 час культивирования, добавили мочевины (источник азота) в концентрации 0,7 г/л для иницирования внутриклеточной деградации ПГА, на 119 час повторно добавили фруктозу в концентрации 15-20 г/л для ресинтеза полимера.

2.3 Подготовка инокулята

В коническую колбу объемом 500 мл добавляли 200 мл фосфатного буфера, после чего стерилизовали. В стерильных условиях в колбу переносили музейную культуру *Cupriavidus necator* В-10646, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике. Далее в колбу добавляли: среду Шлегеля (состав указан выше, в пункте 2.2) и фруктозу в концентрации 15-20 г/л. Колбу устанавливали в термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 на 24 часа, при 30°C и 200 об/мин.

2.4 Методы измерения параметров культивирования

2.4.1 Определение оптической плотности бактериальной культуры

Оптическую плотность определяли на спектрофотометре UNICO-2100 (Юнико-2100) при $\lambda=440$ нм и длине оптического пути 1 мм; предварительно разбавив бактериальную культуру дистиллированной водой 1:5.

2.4.2 Определение концентрации фруктозы в среде

Концентрацию фруктозы определяли, используя резорциновый метод. Для проведения анализа отбирали 2 мл культуральной жидкости, центрифугировали при 6000 об/мин 2 минуты (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). Далее супернатант в количестве 0,5 мл доводили дистиллированной водой до 25 мл. К 1 мл приготовленной пробы добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (50 мг резорцина разводили в 50 мл 95 %-ного этилового спирта) и 3 мл 80 % раствора соляной кислоты. Для приготовления контроля использовали дистиллированную воду. Пробирки выдерживали на водяной бане 20 минут при $t=80$ °C и охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волны 540 нм (длина

оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы определяли по калибровочному графику.

2.4.3 Определение концентрации биомассы бактерий

Использовали весовой метод. Для этого 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 7-10 мин при 6000-6500 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Данную процедуру проводили дважды. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы. Далее бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 95 °С 24 ч. После этого охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Биомасса бактерий определялась, как разница между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

2.4.4 Определение концентрации мочевины в среде

Для проведения анализа отбирали 2 мл культуральной жидкости, центрифугировали при 6000 об/мин 2 минуты (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). 1 мл супернатанта доводили дистиллированной водой до 50 мл. Далее, к 10 мл приготовленной пробы добавляли 1 каплю гидроксида калия (KOH) и 0,5 мл реактива Несслера. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волны в 400 нм (длина оптического пути 10 мм). Концентрацию азота определяли по калибровочному графику.

2.5 Определение содержания полимера

Содержание накопленного в ходе культивирования полимера в биомассе *C.necator* В-10646 определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890А с масс детектором Agilent Technologies 5975С («Agilent», США). Для этого в сердцевидную колбу помещали навеску высушенной биомассы (0,0039-0,0045 г), далее к ней добавляли 1 мл внутреннего стандарта, 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. В качестве внутреннего стандарта была использована: бензойная кислота (0,5 мг/мл хлороформа). Колбы выдерживали на водяной бане (80 °С) под обратным холодильником 2 ч 40 мин. По окончании метанолиза добавляли 1 мл дистиллированной воды.

Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий, скорость 1,2 мл/мин. Капиллярная колонка DB-35MS, длина – 30 м, диаметр – 0.25 мм. Температура ввода пробы – 220 °С; начальная температура хроматографирования – 55 °С; подъем температуры до 310 °С со скоростью 10°С/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °С; температура источника ионов – 230 °С; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 аму при 0,5 сек/скан.

2.6 Экстракция липидов цитоплазматической мембраны и полимера

Чтобы выделить нужные компоненты, 50 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 7-10 мин при 6000-6500 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Данную процедуру проводили дважды. В полученную биомассу добавляли этанол с хлороформом (5 мл и 15 мл) и переносили в конические колбы объемом 50 мл. Экстракция происходила в течение 24 часов при температуре 30 °С. Далее экс-

тракт, содержащий липиды и полимер, отделяли от биомассы* через бумажный фильтр в сердцевидные колбы. Растворители удаляли, используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI).

После, полимер отделяли от липидов. Для этого: в полученный экстракт добавляли 10-15 мл гексана. Осадок, содержащий полимер, пропускали через фильтр: сам полимер оставался на бумажном фильтре, а содержимым новой сердцевидной колбы являлись липиды с растворителем. Далее из этой сердцевидной колбы гексан удаляли, используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI).

Затем к липидам снова добавили 1-3 мл гексана и пропустили через фильтр с сернокислым натрием (Na_2SO_4) в предварительно взвешенные сердцевидные колбы (на 25-50 мл). Из них гексан удалили, используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI), на день убрали в эксикатор, после чего взвесили, и по разности значений между пустой с. колбой и заполненной рассчитали содержание внутриклеточных липидов в перерасчете на вес сухой биомассы.

2.7 Омыление липополисахаридов

Проводили омыление оставшейся биомассы* из пункта 2.6 для подготовки к анализу жирнокислотного состава. Для этого брали небольшую часть биомассы и помещали в сердцевидные колбы (на 25-50 мл). К 1,2 г КОН добавляли 3 мл дистиллированной воды и доводили до 10 мл 95 %-ным этиловым спиртом. Полученную смесь добавляли к образцам в количестве 1,5 мл. После этого образцы помещали на водяную баню (80 °C) с обратным холодильником на два часа.

В омыленные пробы заливали двойной объем дистиллированной воды, подкисляли H_2SO_4 до кислой реакции pH, и добавляли 2 мл гексана для экстракции жирных кислот. Пробы промывали, используя делительную воронку дважды. Гексан удаляли, на роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI).

2.8 Метанолиз жирных кислот

К липидам, находящимся в сердцевидных колбах, добавляли по 1 мл смеси метанола и концентрированной серной кислоты в соотношении 19:1 соответственно, а также по 1 капле бензойной кислоты. Пробы помещали на водяную баню с обратным холодильником на два часа. По истечении времени, образцы снимали и добавляли двойной объем дистиллированной воды.

Затем проводили очистку. Пробы переливали в делительную воронку, заливали дистиллированной водой (10-15 мл) для промывки от серной кислоты и ждали разделения слоёв. Нижний слой воды сливали, измеряя pH индикаторной бумагой. Процедуру повторяли до достижения нейтральной реакции pH (примерно pH=7). Верхний слой, состоящий из гексана и метиловых эфиров жирных кислот, пропускали через слой Na_2SO_4 и переносили в сердцевидную колбу (на 25-50 мл). Из полученных проб удаляли гексан на роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI) .

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

2.9 Определение содержания белка в клетке

Внутриклеточную концентрацию общего азота определяли по методике Кьельдаля [61]. Для проведения анализа использовали навески сухой биомассы: по 40 мг, к которым приливали по 2 мл концентрированной H_2SO_4 и ставили на песочную баню на 40 мин, затем добавляли по 1,5 мл H_2O_2 и снова помещали на песочную баню на 1,5 часа. Далее, разводили в 200 раз (дистиллированной водой). Оптическую плотность измеряли на фотоколориметре ($\lambda = 440$ нм). Концентрацию общего азота рассчитывали по калибровочному графику. Перерасчет на содержание белка проводили умножением полученных данных на коэффициент 6.25.

2.10 Анализ молекулярно-массовых характеристик полимера

12-16 мг полученного ранее полимера растворяли в 2 мл хлороформа. Далее, образовавшийся раствор фильтровали с помощью специального шприца и фильтра-насадки – Millex-FH Filter Unit. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера выясняли с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии – Agilent Technologies 1260 Infinity, США, относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Определяли среднечисловую (M_n) и средневесовую (M_w) молекулярные массы, а также полидисперсность ($Pd = M_w / M_n$).

Глава 3. Результаты

Изъяты страницы 26-38 в связи с авторскими правами

ЗаКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе периодической культуры (0-72 ч) происходило постепенное накопление концентрации биомассы и содержания полимера с максимальными значениями на 72 ч, соответственно 7,83 г/л и 77%. Процесс внутриклеточной деградации полимера (72-144 ч) сопровождался как снижением содержания полимера до 40%, так и концентрацией биомассы до 5,6%. При ресинтезе полимера (144-165 ч), инициированном добавлением углеродного субстрата, произошло увеличение содержания полимера и биомассы соответственно до 61,5% и 6,4%.
2. Показано, что накопление полимера происходило на фоне снижения содержания белка и липидов. Внутриклеточная деградация полимера сопровождалась увеличением содержания белка, которое не снижалось при ресинтезе полимера. Содержание липидов практически не менялось в ходе деградации и ресинтеза полимера.
3. Липиды цитоплазматической мембраны *Cupriavidus necator* в своём составе содержат циклопропановые, насыщенные и моноеновые жирные кислоты. В ходе накопления полимера увеличивается насыщенность липидов цитоплазматической мембраны за счет увеличения содержания насыщенных жирных кислот, включая циклопропановые, на фоне снижения моноеновых кислот. Высокая насыщенность липидов сохраняется и в фазу внутриклеточной деградации и ресинтеза полимера. Основными жирными кислотами липополисахаридов являются насыщенные жирные кислоты, включая β - и α -гидроксикислоты. В процессе накопления полимера изменения в жирнокислотном составе связаны главным образом со снижением содержания 16:1 ω 7 и β -ОН 14:0 на фоне увеличения содержания 16:0. В фазу внутриклеточной деградации и ресинтеза значительных изменений в содержании жирных кислот не выявлено.

4. Среднечисловая (M_n) и средневесовая (M_w) молекулярные массы полимера на 20 час культивирования имели максимальные значения: 281 кДа и 744 кДа соответственно. По ходу накопления полимера эти показатели снижались до 120 кДа и 407 кДа (72 ч) соответственно. В фазу деградации полимера данные показатели практически не менялись. В фазу ресинтеза полимера отмечено снижение M_n и M_w до 84 кДа и 375 кДа соответственно.

Список сокращений

ЖК – жирные кислоты

M_v – средневесовая молекулярная масса полимера

МС-детектор – масс-спектрометрический детектор

M_n – среднечисловая молекулярная масса полимера

ЛПС – липополисахариды

ЛЦМ – липиды цитоплазматической мембраны

П(ЗГБ) – поли-3-гидроксibuтират

ПГА – полигидроксиалканоаты

Пд – полидисперсность

ЭД-путь – путь Энтнера-Дудорова

ЭМП-путь – путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Alavi, S., Thomas, S., Sandeep, K.P., Kalarikkal, N., Varghese, J., Yaragalla, S. (Eds.), 2014. *Polymers for Packaging Applications*. CRC Press.
2. Yadav, A., Mangaraj, S., Singh, R., Kumar, N., Simran, A., 2018. Biopolymers as packaging material in food and allied industry. *Int. J. Chem. Stud.* 6, 2411-2418.
3. Marichelvam, M.K., Jawaid, M., Asim, M., 2019. Corn and rice starch-based bioplastics as alternative packaging materials. *Fibers* 7, 32.
4. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161-174.
5. Boucher, J., Billard, G., 2019. The challenges of measuring plastic pollution. *Field Actions Sci. Rep.* 19, 68-75.
6. Kumar, M., Gupta, J., Thakur, I.S., 2016b. Production and optimization of polyhydroxyalkanoate from oleaginous bacteria *Bacillus* sp. *ISTC1. Res. Rev. J. Microbiol. Biotechnol.* 5, 80-89.
7. Amaro, M.M., Miguel, T., Rosa, F., Comi, G., Iacumin, L., 2019. Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Front. Microbiol.* 10, 992.
8. Kishna, M., Niesten, E., Negro, S., Hekkert, M.P., 2017. The role of alliances in creating legitimacy of sustainable technologies: a study on the field of bioplastics. *J. Clean. Prod.* 155, 7-16.
9. Тасекеев М. С., Еремеева Л. М. Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК: Аналит. обзор.– Алматы: НИЦ НТИ, 2009.– С.7.
10. Kijchavengkul T., Auras R. (2008) Perspective compostability of polymers. *Polymer International* 57: 793–804.

11. Park, D.H. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil / D.H. Park, B.S. Kim // *N. Biotechnol.* - 2011. – p.719–724.
12. Kessler, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism / B. Kessler, B. Witholt, // *Biotechnol.* - 2001. – V. 86. – P. 97–104.
13. Steinbüchel, A. Bacterial and other biological systems for polyester production / A. Steinbüchel, B. Fuchstenbusch // *Trends Biotechnol.* – 1998. – Vol. 16. – p. 419- 427.
14. Singh, A.K.; Srivastava, J.K.; Chandel, A.K.; Sharma, L.; Mallick, N.; Singh, S.P. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: An insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103, 2007–2032.
15. Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J.Możejko-Ciesielska, R.Kiewisz // *Microbiological research.* – 2016. – T. 192. – С. 271-282.
16. Прунтова, О. В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии : в 2 ч. Ч. 1 / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно, М. А. Мазиров. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та. – 2006. – 192 с.
17. Liu, D. An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase / D. Liu, R. A. Cole, P. R. Reeves // *Journal of bacteriology.* – 1996. – Т. 178, № 7. – С. 2102-2107.
18. Khanna, S., Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S.Khanna, A. K.Srivastava // *Process biochemistry.* – 2005. – Т. 40, №. 2. – С. 607-619.
19. Sabirova, J. S. [et al.] Mutation in a “tesB-like” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2 / J. S.Sabirova [et al.] // *Journal of bacteriology.* – 2006. – Т. 188, №. 24. – С. 8452-8459.

20. Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246-265.
21. Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* 8, 791-808.
22. Masood, F., Yasin, T., Hameed, A., 2014. Comparative oxo-biodegradation study of poly- 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/polypropylene blend in controlled environments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 87, 1-8.
23. Boyandin, A.N., Prudnikova, S.V., Karpov, V.A., Ivonin, V.N., Đô, N.L., Nguyễn, T.H., Le, T.M.H., Filichev, N.L., Levin, A.L., Filipenko, M.L., Volova, T.G., 2013. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 83, 77-84.
24. Czerniecka-Kubicka, A., Fracz, W., Jasiorski, M., Błazejewski, W., Pilch-Pitera, B., Pyda, M., Zarzyka, I., 2017. Thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate) modified by nanoclay. *J. Therm. Anal. Calorim.* 128, 1513-1526.
25. Johnston, B., Radecka, I., Hill, D., Chiellini, E., Ilieva, V., Sikorska, W., Musio, M., Zieba, M., Marek, A.A., Keddie, D., Mendrek, B., Darbar, S., Adamus, G., Kowalczyk, Marek, 2018. The microbial production of polyhydroxyalkanoates from waste polystyrene fragments attained using oxidative degradation. *Polymers* 10, 957.
26. Choi, G.G., Kim, H.W., Rhee, Y.H., 2004. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp MT-16. *J. Microbiol.* 42, 346-352.
27. Madison L.L., Huisman G.V. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic // *Microbiol. And Molecular Biology Rev.* - 1999. - Vol.63. - P.1-25.
28. Shangguan, Y.Y., Wang, Y.W., Wu, Q., Chen, G.Q., 2006. The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials* 27, 2349-2357.

29. Volova, T.G., Shishatskaya, E.I., Sevastianov, V.I., Efremov, S., Mogilnaya, O., 2003. Results of biomedical investigations of PHB and PHB /PHV fibers. *Biochem. Eng. J. – Biopolymers*. 16, 125-133.
30. Pouton, C.W., Akhtar, S., 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 18, 133-162.
31. Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications / S.Philip, T.Keshavarz, I. Roy // *Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & clean technology*. – 2007. – T. 82, №. 3. – С. 233-247.
32. Fritzsche, K., Lenz, R. W., Fuller, R. C. An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group / K.Fritzsche, R. W.Lenz, R. C.Fuller // *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*. – 1990. – T. 191, №. 8. – С. 1957-1965.
33. Hartmann, R., Hany, R., Pletscher, E., Ritter, A., Witholt, B., Zinn, M., 2006. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: batch versus chemostat production. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 737–746.
34. Lee S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates (review) // *Biotechnol. and Bioengin.* – 1996a. – V. 49. – P. 1–14.
35. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение : монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск : Красноярский писатель. – 2011. – 392 с.
36. Olivera E.R., Arcos M., Naharro G., Luengo J.M. Unusual PHA biosynthesis / Ed. by G.-Q. Chen, A. Steinbüchel. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 133.
37. Pohlmann A, Fricke WF, Reinecke F, et al. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol*, 24, 1257–62.

38. Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1437-1449.
39. Rehm, B. A.; Kruger, N.; Steinbüchel, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The phaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxy-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 24044–24051.
40. G.-Q. Chen, X.-R. Jiang, Y. Guo. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA) // *Synthetic and Systems Biotechnology*.- 2016- V.1 p. 236-242.
41. Sabbagha, Farzaneh, Production of poly-hydroxyalkanoate as secondary metabolite with main focus on sustainable energy / Farzaneh Sabbagha, Ida Idayu Muhamada. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews* .- 2017. – p. 95–104.
42. Shrivastav, A.; Kim, H.Y.; Kim, Y.R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013, 581684.
43. Muhammadi; Shabina; Afzal, M.; Hameed, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem. Lett. Rev.* 2015, 8, 56–77.
44. Nitschke, M.; Costa, S.G.; Contiero, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochem.* 2011, 46, 621–630.
45. Rathika, R.; Janaki, V.; Shanthi, K.; Kamala-Kannan, S. Bioconversion of agro-industrial effluents for polyhydroxyalkanoates production using *Bacillus subtilis* RS1. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2019, 16, 5725–5734.
46. Бессонова В.А., Ануфриева К.М. Полигидроксиалканоаты – новые биоматериалы // *Современные научные исследования и инновации*. – Москва, 2016. – вып. 7. – С. 25-27.

47. Volova, T. Cell growth and PHA accumulation from CO₂ and H₂ of a hydrogenoxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646 / T.Volova, , E. Kiselev, E. Shishatskaya, N. Zhila, A. Boyandin, D. Syrvacheva, O. Vinogradova, G. Kalacheva, A. Vasiliev, I. Peterson, // *Bioresour. Technol.* - 2013. – p. 215–222.

48. Hokamura, A. Characterization and identification of the proteins bound to two types of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas* sp. 61-3. / A. Hokamura [etc] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* – 2015, R. 79, № 8. – p. 1369 – 1377.

49. Алимов Е.К., Аствацатурьян А. Т. Биосинтез и окисление жирных кислот нормального строения с нечетным числом атомов С, разветвленных и циклопропановых. / *Успехи современной биологии* / 1973, в т.76, № I (4). – С.34-53.

50. Rezania, S. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* / S. Rezania [etc] // *Avicenna journal of medical biotechnology.* – 2011. – R.3, № 1. – p.3-9.

51. Al-Sultany, S. J. Physiological and immunological effect of lipopolysaccharide of *Escherichia coli* was extracted by hot phenol-water in rabbits / S. J. Al-Sultany, Y.A. Jassim // *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences.* – 2016. – Т. 7, № 3. – p.1530-1535.

52. Ward, A. Flexibility in the ABC transporter MsbA: alternating access with a twist / A. Ward [etc] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2007. – R. 104, № 48. – p.19005-19010.

53. 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.

54. Пинчук Л.М., Соколова К.Я. О значении профилей жирных кислот в таксономии энтеробактерий. /*Биохимия и биофизика микроорганизмов* / - Горький / -1983, №II, С.53-58.

55. Рубан Е.А. Фосфолипиды и фосфолипазы микроорганизмов. // *Успехи микробиологии.* -1980, -Т.15. -С.41-67.

56. Cavaleiro J.M.B.T. Adaptation of *Cupriavidus necator* to conditions favoring polyhydroxyalkanoate production / J.M.B.T. Cavaleiro, M. Catarina M.D. de Almeida^{a,b}, M. Manuela R. da Fonseca^a, Carla C.C.R. de Carvalho. // *Journal of Biotechnology*. - 2012. - Vol.164. - P.309-317.

57. Reinecke, F., Steinbüchel, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers / F.Reinecke, A.Steinbüchel // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. – 2009. – T. 16, №. 1-2. – С. 91-108.

58. Aragno, M. The mesophilic hydrogen-oxidizing (Knallgas) bacteria / M.Aragno // *The Prokaryotes*, 2nd ed, A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. – 1992. – Vol. 1. – p.344-384.

59. Kessler B., Witholt B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism / B. Kessler // *Journal of biotechnology*. – 2001. – Vol. 86, №. 2. – p.97-104.

60. Friedrich C. G., Friedrich B., Bowien B. Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus* / C. G. Friedrich, B. Friedrich, B. Bowien // *Microbiology*. – 1981. – Vol. 122, №. 1. – p.69-78.


61. Абакумова, Н. А. Органическая химия и основы биохимии: учебное пособие / Н. А. Абакумова, Н. Н. Быкова. – Тамбов: изд-во ГОУ ВПО ТГТУ, 2011. – Ч. 2. – 80 с.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
 Т. Г. Волова
«24» июня 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология


Исследование накопления биомассы, полимера и липидов бактериями
Cupriavidus necator В-10646, культивируемыми на фруктозе

Руководитель


27.06.2022
подпись, дата

доцент, к.б.н., Н.О. Жила

Выпускник


27.06.2022
подпись, дата

Я.В. Филиппова

Красноярск 2022