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.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЯМИ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНЫХ УГЛЕРОДНЫХ СУБСТРАТАХ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Магистерская программа 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Доцент,
Канд. биол. наук,
Н.О. Жила

Научный руководитель

подпись, дата

Магистрант

Н.А. Токмина

подпись, дата

С.н.с. ИБФ СО РАН
Канд. биол. наук,
М.Ю. Трусова

Рецензент

подпись, дата

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Синтез экзополисахаридов бактериями *Agrobacterium tumefaciens* при росте на различных углеродных субстратах» содержит 54 страниц текстового документа, 48 использованных источников литературы, 2 таблицы и 27 иллюстраций.

Ключевые слова: *Agrobacterium tumefaciens*, экзополисахарид, культивирование, микрочастицы.

На сегодняшний день накопление пластмасс в окружающей среде является экологической проблемой и лучшая альтернатива пластмассам это биополимеры. Благодаря таким свойствам как биоразлагаемость и биосовместимость полигидроксиалканоаты (ПГА) являются прекрасными кандидатами для применения различных сферах. В последнее время возрастает интерес к бактериальным экзополисахаридам (ЭПС), в отличие от большинства химически синтезированных, они являются биодеградируемыми и не наносят вреда окружающей среде. Экзополисахариды широко применяют в пищевой (в качестве загустителей), медицинской (системы доставки лекарств, тканеинженерные конструкции), косметической (в качестве загустителей) и сельскохозяйственной (системы контролируемой доставки пестицидов) промышленности.

Однако, в настоящее время основным препятствием для роста и расширения производства бактериальных экзополисахаридов является высокая себестоимость продукции. Важно изучать различные методы снижения себестоимости производства за счет поиска новых высокопродуктивных штаммов, поскольку это может открыть новые горизонты применения биополимеров и улучшить качество жизни населения.

Целью настоящего исследования стало изучение способности штамма бактерий *Agrobacterium tumefaciens* к росту и накоплению полигидроксиалканоатов (ПГА) и экзополисахаридов (ЭПС) на разных

сахаросодержащих субстратах. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать штамм почвенных бактерий, способных к синтезу полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов

2. Оценить способность, выделенного штамма бактерий, к синтезу полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов

3. Изучить влияние состава среды на выход полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов

4. Получить микрочастицы методом обратной эмульсии на основе экзополисахарида

В ходе исследования был выделен и идентифицирован штамм *Agrobacterium tumefaciens.* Выявлено, что данный штамм бактерий способен к синтезу двух полимерных соединений: ПГА и ЭПС. Показано, что состав среды влияет как на урожай биомассы, так и на выход биополимеров. ПГА синтезировались на минеральной среде Шлегеля, а ЭПС на среде с дрожжевым экстрактом. Методом ИК-спектроскопии было показано, что в составе экзополисахарида, синтезированного бактериями *Agrobacterium tumefaciens,* присутствуют моносахариды (гексозы). Методом обратной эмульсии получены микрочастицы на основе ЭПС. Микрочастицы получились гетерогенными по размеру, средний диаметр которых – 5,44 ± 3,63 мкм.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ 2

ВВЕДЕНИЕ 6

1 Обзор литературы 8

1.1 Полигидроксиалканоаты 8

1.2 Синтез полигидроксиалканоатов разными микроорганизмами . 10

1.3 Экзополисахариды 12

1.4 Продуценты экзополисахаридов 13

1.5 Метаболические пути биосинтеза экзополисахаридов 15

1.6 Факторы, влияющие на синтез полисахаридов 17

2. Материалы и методы 25

2.1 Объект исследования 25

2.2. Методы исследования 25

2.2.1 Получение накопительной культуры *Agrobacterium tumefaciens* 25

2.2.2 Исследование свойств выделенного штамма 25

2.2.3 Культивирование *Agrobacterium tumefaciens* 26

2.2.4 Анализ параметров культивирования 27

2.2.5 Выделение экзополисахаридов 28

2.2.6 Определение химического состава экзополисахарида 29

2.2.7 Способность к набуханию 29

2.2.8 Изготовление микрочастиц 29

2.2.9 Статистическая обработка результатов 30

3. Результаты 31

ВЫВОДЫ **32**

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ **33**

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные пластики являются важным материалом для повышения комфорта и качества жизни, но накопление этих пластмасс в окружающей среде стало серьезной проблемой из-за их низкого уровня биодеградации. И важной альтернативой пластмассам являются полимеры биологического происхождения. Среди активно исследуемых биополимеров: полилактидов, полигликолидов, природных полимеров (хитозан, коллаген и др.), полигидроксиалканоаты (ПГА) занимают особое место.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс природных сложных полиэфиров, которые продуцируются микроорганизмами в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях несбалансированного роста. Они демонстрируют уникальные свойства, такие как биоразлагаемость, изменяемые механические свойства, нетоксичность, биосовместимость, гидрофобность, поддержка клеточного роста, прикрепление без канцерогенных эффектов, оптическая чистота и желаемые модификации поверхности, и применяются в различных сферах.

Микробные экзополисахариды (ЭПС) представляют собой полимеры, которые секретируются микроорганизмами в окружающую их среду и состоят из остатков сахаров. Высокий спрос связан с тем, что в каждой отрасли требуются биополимеры с различными характеристиками, как функциональными (способность растворяться в воде, создавать растворы, обладающие высокой вязкостью), так и биологическими (иммуномодулирующими, противовоспалительными, бактерицидными, радиопротекторными, ранозаживляющими, противоопухолевыми, антиканцерогенными). Разнообразие физико-химических структур ЭПС определяет широкий спектр сфер возможного их применения: медицина, фармацевтическая, пищевая, текстильная, химическая, нефте- и горнодобывающая промышленности, при культивировании культур тканей

животных и др. в качестве загустителей, текстурирующих агентов и веществ, суспендирующих, желирующих, эмульгирующих, изменяющих реологические свойства водных систем [1].

Микробные ЭПС могут стать хорошей альтернативой ЭПС, извлеченным из животных, растений и морских водорослей, поскольку они могут быть синтезированы в регулируемых условиях. Производство ЭПС во многих случаях уже можно контролировать с помощью условий роста, включая концентрацию и тип углеводов, температуру и pH. Тем не менее, все еще необходимо лучшее понимание механизмов синтеза и экскреции ЭПС [2].

Но на сегодняшний день главным ограничением производства ПГА и ЭПС является стоимость производства. Поэтому большое внимание уделяется поиску и изучению продуцентов и экономически выгодных субстрататов.

В связи с вышесказанным целью данной работы является исследование способности штамма бактерий *Agrobacterium tumefaciens* к росту и накоплению полигидроксиалканоатов (ПГА) и экзополисахаридов (ЭПС) на разных сахаросодержащих субстратах.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать штамм почвенных бактерий, способных к синтезу полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов

2. Оценить способность, выделенного штамма бактерий, к синтезу полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов

3. Изучить влияние состава среды на выход полигидроксиалканоатов и экзополисахаридов

4. Получить микрочастицы методом обратной эмульсии на основе экзополисахарида

1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалканоаты

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – класс природных сложных полиэфиров, которые продуцируются микроорганизмами в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях несбалансированного роста.

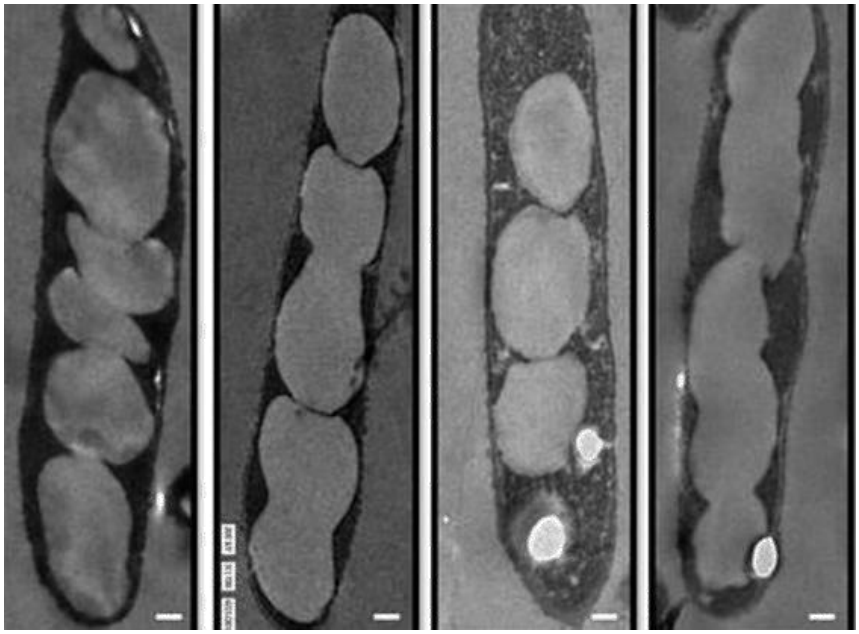
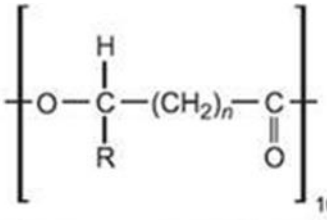


Рисунок 1 – Гранулы ПГА в цитозоле клетки бактерии [3]

Структуры ПГА можно представить следующим образом:



$n = 1$	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).

Рисунок 2 – Общая формула ПГА [4]

Исходя из размера углеродной цепи, полигидроксиалканоаты подразделяют на три основные группы [5]:

1. Короткоцепочечные, состоят из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;
2. Среднецепочечные, в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;
3. Длинноцепочечные, с содержанием кислот C_{17} и C_{18}.

Из-за структурных изменений мономеров, составляющих ПГА, они различаются по свойствам и химическому составу как гомо- или сополимеры. Гомополимеры – это полимеры, макромолекулы которых состоят из одинаковых по строению повторяющихся структурных единиц (мономеров). Например, мономером являются 3-гидроксибутират (3ГБ), 3-гидроксивалерат (3ГВ) и др. Сополимерами называются полимеры, молекулы которых содержат мономерные звенья разных типов.

Свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру. Эти полимеры не гидрализуются в жидких средах, так как деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальными путями. ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами. С этими полимерами связаны большие надежды, так как помимо термопластичности (аналогично полипропилену и полиэтилену) ПГА обладают антиоксидантными и оптическими свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и характеризуются высокой биосовместимостью.

На сегодняшний день выявлено свыше 150 ПГА. Несмотря на это многообразие, внимание исследователей привлекает всего несколько типов

ПГА: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, сополимеры поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксипропионат, поли-3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират,поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксигексаноат, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксидеканоат [5].

1.2 Синтез полигидроксиалканоатов разными микроорганизмами

Список микроорганизмов, способных внутриклеточно аккумулировать полигидроксиалканоаты быстро пополняется. К настоящему времени он насчитывает свыше 300 организмов [4]. Однако лишь некоторые из них были использованы в промышленном масштабе для производства полимера. К ним относятся *Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata* и *Azotobacter vinelandii* [6], несколько штаммов метилотрофов и трансгенные штаммы *Escherichia coli*.

Cupriavidus necator – является модельным организмом. Еще в 1994 г. было показано, что *Cupriavidus necator* способен накапливать до 76 % П(3ГБ) в перерасчете на сухой вес биомассы в процессе периодической ферментации с подпиткой, при росте на глюкозе (10–20 г/л) в течение 50 ч культивирования [3]. Аккумулирует ПГА на отходах промышленных и сельскохозяйственных производств.

Burkholderia sacchari является потенциальным промышленным продуцентом ПГА. Показано, что этот вид бактерий способен усваивать до тридцати различных источников углерода в качестве косубстратов для включения различных мономеров в ПГА. Наибольшая концентрация П(3ГБ) (51,5 %) наблюдалась в культуре, дополненной гексановой кислотой [7].

Синтезировать ПГА способны свободноживующие азотфиксаторы, принадлежащие к семейству Azotobacteraceae [8]. Накопление ПГА штаммами различных видов *Azotobacter* широко изучалось, начиная с 1980-х гг. прошлого века и до настоящего времени [8]. В литературе встречаются данные

об использовании двух видов – *A. vinelandii* и *A. chroococcum* для микробной ферментации. Бактерии данного рода являются облигатными аэробами, способны фиксировать азот и расти в микроаэрофильных условиях [9]. Этот микроорганизм способен синтезировать биополимеры для важных биотехнологических и биомедицинских приложений: это внеклеточный альгинат и внутриклеточный поли-(3-гидроксибутират) (П(3ГБ)), содержание которых может достигать высоких значений [10]. Бактерии *Azotobacter chroococcum* при росте на среде с фруктозой (20 г/л) достигали урожая биомассы 3,1 г/л, полимера – 57,1% [8].

Следующий микроорганизм, рассматриваемый в качестве потенциального продуцента ПГА, *Agrobacterium tumefaciens*. В связи с более широким трофическим потенциалом данного штамма и способностью к росту на фруктозе, глюкозе, галактозе, сахарозе, мальтозе, маннозе и ксилозе исследованы урожай и накопление ПГА в периодической культуре на этих субстратах. Урожай на этих субстратах составил 3,3–3,9 г/л. На всех исследованных сахарах в клетках бактерий данного штамма идентифицировано наличие полимера. Но выходы были невысокими и составили, соответственно, на фруктозе – 45 %, глюкозе – 48 %, сахарозе – 35 %, галактозе – 41 % и других сахарах – 30–35 % [8].

Синтез П(3ГБ) начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА, которая катализируется β-кетотиолазой (кодируемой геном phbA) с образованием ацетоацетил-КоА. Впоследствии ацетоацетил-КоА с помощью НАДФН-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазы (кодируемой геном phbB) превращается в β-гидроксибутирил-КоА. Наконец, β-гидроксибутирил-КоА полимеризуется синтазой П(3ГБ) (кодируемой геном phbC), высвобождая КоА и продуцируя П(3ГБ) [11]. Когда внешний источник углерода истощается, бактерии используют запасы П(3ГБ) в качестве источника углерода и энергии.

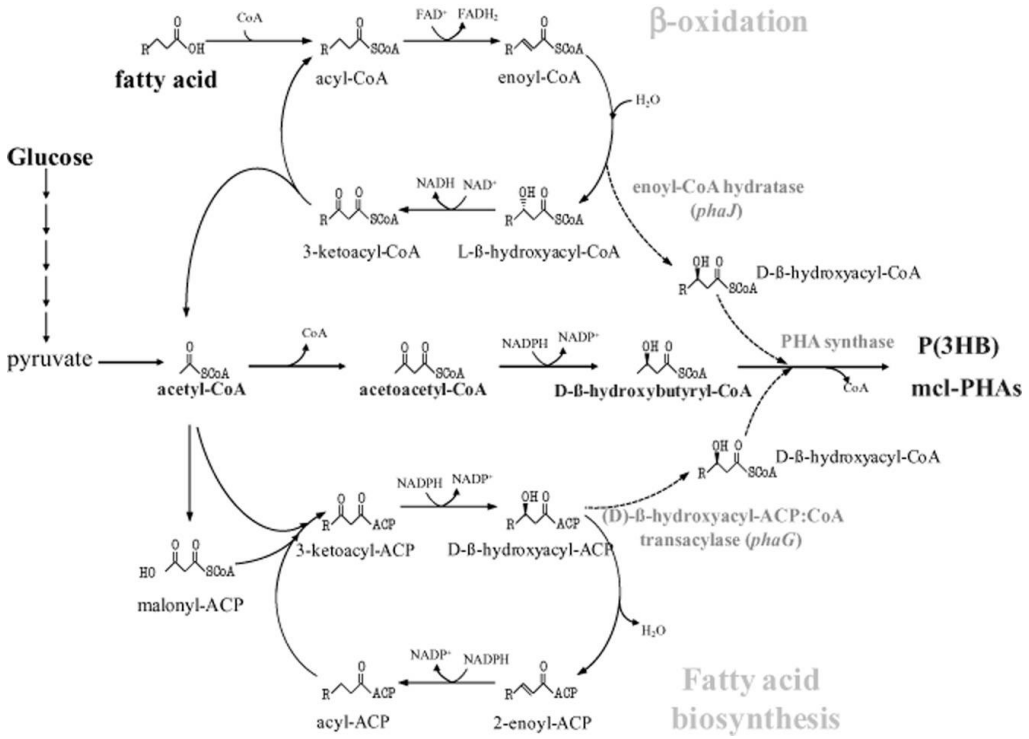


Рисунок 3 - метаболические пути, участвующие в образовании П(3ГБ)

1.3 Экзополисахариды

Бактериальные экзополисахариды (ЭПС) представляют собой водорастворимые полимеры, прикрепленные к клеточной стенке в виде капсул, или секретируемые во внеклеточную среду в виде слизи, состоящие из повторяющихся фрагментов сахара. Выполняют широкий спектр функций для бактерий, в основном обеспечивают защиту от таких воздействий окружающей среды, как высыхание и воздействие антибиотиков, а также выступают в качестве резервного пищевого материала.

В зависимости от состава сахаров ЭПС разделяют на гомополимеры (с одним типом сахара, например, глюкозой, ксилозой и т.д.) это целлюлоза, декстран и гетерополимеры (с более чем одним типом сахарных фрагментов, глюкозой, рамнозой, маннозой и т.д.) – ксантан, гиалуроновая кислота, сукциногликан. Гетерополисахариды составляют большинство бактериальных ЭПС. В зависимости от наличия или отсутствия уроновой

кислоты их классифицируют как кислые или нейтральные соответственно [2]. Полисахариды могут иметь линейную структуру или разветвлённую.

Экзополисахариды обладают различными свойствами, например, способны образовывать гели, пленку [2], стабилизировать эмульсии, создавать вязкие растворы и, как правило, изменять реологические свойства различных продуктов [2], благодаря своим разнообразным свойствам они имеют широкое применение во многих областях промышленности. Например, широко используются в пищевой, в качестве гелеобразователя, загустителя, эмульгатора, модификатора текстуры вместо промышленных гидроколлоидов [12]. Известно об использовании экзополисахаридов в медицине: в первую очередь в качестве добавок, повышающих вязкость, средств доставки лекарств и в конструкциях тканевой инженерии [13]. Также имеются данные об использовании в качестве фармацевтических препаратов. Например, ксантан, сульфатированный декстран и сульфатированный курдлан используются в качестве противовирусных и противораковых средств [14]. Спектр применения бактериальных ЭПС включает области, в которых используется большее количество полимера, но не требуется более высокая степень чистоты. Одним из наиболее важных применений являются буровые растворы для добычи нефти, в которых ксантановая камедь является наиболее используемым бактериальным полисахаридом из-за его высокой способности повышать вязкость при низких концентрациях [15].

1.4 Продуценты экзополисахаридов

Многие бактерии обладают способностью синтезировать и выделять внеклеточные полисахариды (таблица 1).

Таблица 1 – Микроорганизмы, продуцирующие экзополисахариды [2]

Микроорганизм	Экзополисахарид

Acetobacter xylinum	Ацетан/целлюлоза
Agrobacterium tumefaciens	Сукциноглюкан
Alcaligenes faecalis	Курдлан
Alcaligenes faecalis/Sphingomonas sp.	Велан
Azotobacter vinelandii	Альгинат
Epicoccum nigrum	Эпиглюкан
Grifola frondosa	Грифолан
Lactobacillus frumenti	Фруктан
Lactobacillus reuteri	Мутан/рейтеран
Lactobacillus sanfranciscensis	Леван
Lactic acid bacteria and yeasts	Кефиран
Pseudomonas aeruginosa/Lentinula edodes	Лентинан
Sclerotium glucanicum	Склероглюкан
Sphingomonas elodea	Геллан
Trametes versicolor	Крестин
Weissella confusa	Инулин и фруктан
Xanthomonas campestris	Ксантан
Zymomonas mobilis	Леван

К числу хорошо известных продуцентов ЭПС относятся ризобии, выделяющие большое количество полисахаридов как в ризосфере, так и при выращивании в чистой культуре. *Rhizobium tropici*, бобовая симбионтная почвенная бактерия, известна своим обильным производством экзополисахарида, а синтезирует она его в условиях несбалансированного роста, выход ЭПС составляет 4,08 г/л [16]

Agrobacterium radiobacter является важным источником курдлана, растворимого в щелочи ЭПС. Структура, функции и возможные коммерческие преимущества других водорастворимых ЭПС, выделенных из *A. radiobacter*, в настоящее время неизвестны [17]. Так же *Agrobacterium radiobacter* способна

синтезировать сукциногликан. В качестве источника углерода использовали лактозу и мелассу, урожайность ЭПС составила 7,0 г/л и 12,0 г/л соответственно [18].

Синтез сукциноклигана был также зарегистрирован и у других почвенных микроорганизмов: *Agrobacterium rhizogenes* [19], *Rhizobium radiobacter* [20], *Sinorhizobium meliloti* [21], *Ensifer meliloti* [22].

В работе Miroslav Stredansky и его соав. [23] было проведено исследование культивирования *Agrobacterium tumefaciens* на различных сахаросодержащих субстратах, таких как мальтоза, глюкоза, галактоза и сахароза. Данный вид синтезировал экзополисахарид – сукциногликан. Наибольший выход ЭПС составил – 4,45 г/л.

Сообщается, что оба штамма *Pseudomonas fluorescens и Pseudomonas putida* продуцируют экзополисахарид, а именно альгинат. В качестве С-субстрата использовали глюкозу и фруктозу. Наибольший выход у *P. fluorescens* альгината был получен в присутствии фруктозы – 4,4-4,7 г/л, в присутствии глюкозы составил – 2,9 г/л. В культурах *P. putida* максимальные выходы 3–3,5 г альгината г/л были получены с любым субстратом [24].

1.5 Метаболические пути биосинтеза экзополисахаридов

Большинство бактериальных ЭПС синтезируются внутриклеточно и экспортируются во внеклеточную среду в виде макромолекул. Пути бактериального биосинтеза (рис.1.):

1. Поглощение субстрата;

2. Центральный путь метаболитов;

3. Синтез полисахаридов.

Сначала субстрат проникает в клетку посредством специфических транспортных механизмов. Затем катаболизируется путями гликолиза в пируват, пируват в свою очередь превращается в ацетил-CoA и вступает в цикл трикарбоновых кислот. Первичные метаболиты, продуцируемые этими путями, используются в качестве предшественников для синтеза небольших биомолекул (например, аминокислот или моносахаридов). Фосфорилированные сахара превращаются в богатые энергией моносахариды, в основном нуклеозиддифосфатные сахара [16]. Далее синтез полисахаридов протекает по одному из двух путей. Первый путь – повторяющаяся единица синтезируется путем последовательного переноса моносахаридов на полипренилфосфатный липидный носитель. Зрелые повторяющиеся единицы транспортируются через внутреннюю мембрану предположительно флиппазой к периплазматической стороне, где происходит полимеризация под действием полимеразы. У многих бактерий путь транслокации, который охватывает клеточную оболочку, формируется полисахарид-сополимеразой, которая определяет длину полимерных цепей, и белком экспорта полисахарида внешней мембраны, который формирует канал. Второй путь – полисахарид полимеризуется на цитоплазматической стороне внутренней мембраны за счет последовательного добавления остатков сахара к полимерной цепи. Полимер экспортируется через внутреннюю мембрану с использованием транспортера с последующей его транслокацией через периплазму и внешнюю мембран [16].

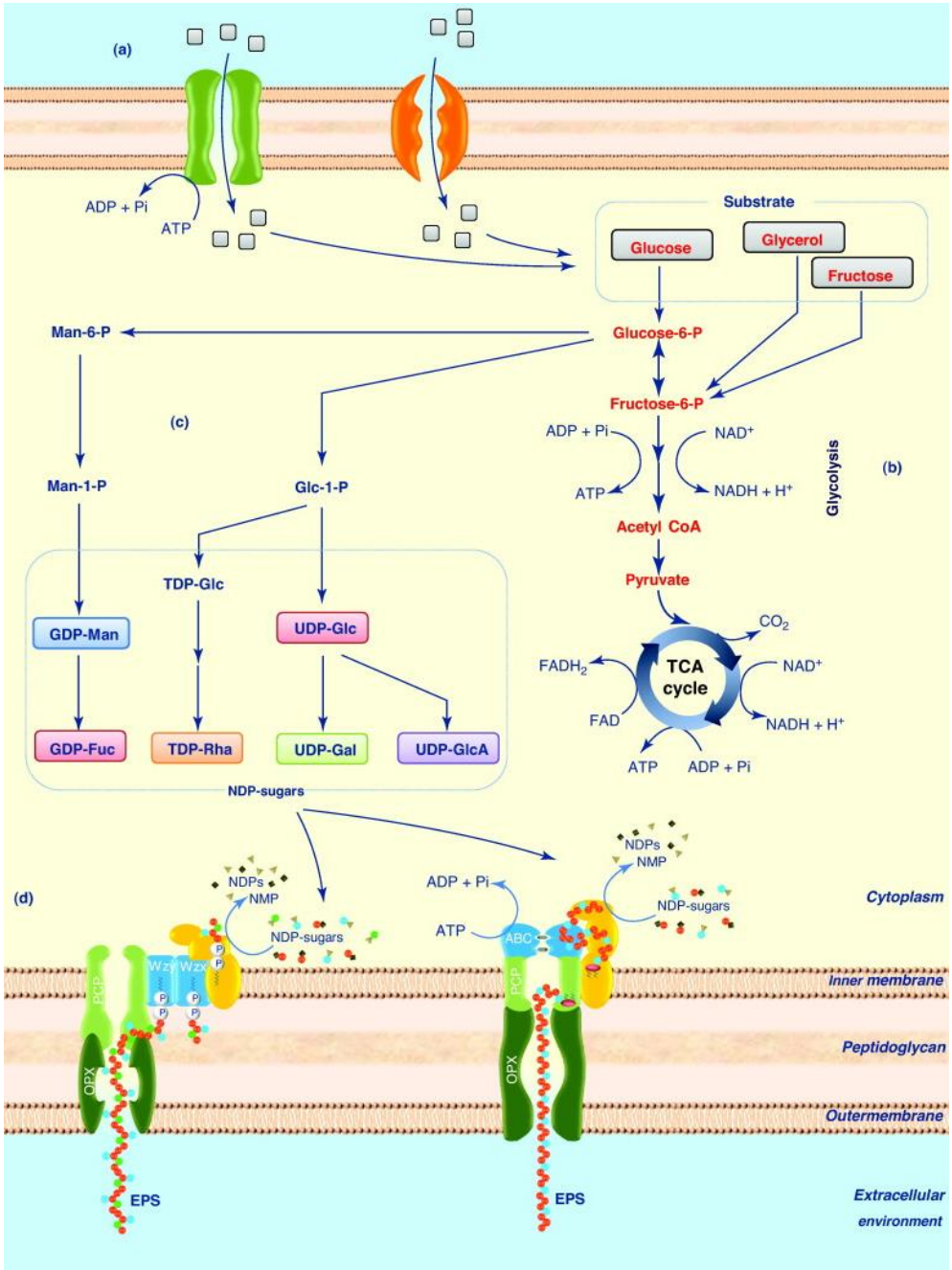


Рисунок 4 – схема, обобщающая биосинтетические пути, участвующие в бактериальном синтезе ЭПС грамотрицательными бактериями.

1.6 Факторы, влияющие на синтез полисахаридов

Как рост бактерий, так и скорость синтеза ЭПС зависят от различных факторов. Одним из таких факторов является источник углерода. Каждый микроорганизм обладает сродством к конкретному субстрату, например,

Lactobacillus casei дает более высокий выход ЭПС при выращивании на галактозе по сравнению с глюкозой [25]. То же самое относится и к *Lactobacillus lactis*, которые дают более высокий урожай ЭПС при выращивании на глюкозном субстрате (460 мг/л) по сравнению с фруктозой (65 мг/л) [26].

В работе автора Mandal S. M [27] бактерии, *Rhizobium vigna,* больше синтезировали ЭПС, когда в качестве С-субстрата добавляли маннитол и глюкозу, выход экзополисахарида составил 240 мг/л и 224 г/л соответственно, а при использовании ксилозы – 140 мг/л.

Также было обнаружено, что источник азота играет важную роль в производстве ЭПС. В случае *Cupriavidus pauculus* производство экзополисахаридов увеличивалось тогда, когда увеличивалась концентрация азота в среде. Выход ЭПС увеличился на 23% от контроля (1 г/л) и составил 129,2 мкг /мл при 1,75 г/л азота [28]. Однако, для некоторых бактерий, таких как *Agrobacterium sp., Rhizobium sp., A. faecalis , Gluconacetobacter xylinus , Bacillus cereus*, культивирование в условиях ограничения азота приводит к увеличению производства ЭПС [29]. Было показано, что бактерии *Rhizobium vigna* способны использовать аспарагин в качестве источника азота, при лимитировании данного фактора, урожайность ЭПС была высокой и составляла 346 мг/л [27].

Скорость синтеза ЭПС и рост бактерий также зависят от pH среды. Высокие значения водородного показателя приводят к снижению производства ЭПС, тогда как оптимальное производство ЭПС у бактерий *Rhizobium sp.* было зарегистрировано при pH 8,0 [30]. Эти данные согласуются с другими исследованиями. Так, в работе Ann K. Staudt максимальная продукция ЭПС наблюдалась при росте на нейтральных (pH 6,9) и слабощелочных (pH 8,0) условиях роста (2,35 г/л и 2,96 г/л соответственно). Более кислая среда роста (pH 4,7 и 5,7) приводит к минимальному образованию экзополисахаридов у бактерий *Rhizobium tropici* [15].

1.7 Применение экзополисахаридов

На сегодняшний день наиболее исследованными являются экзополисахариды такие, как декстран, глюкан, галактан, сукциногликан, альгинат, курдлан, ксантан, леван.

Леван – состоит из D - фруктофуранозильных остатков, соединенных β-(2–6)-связями.

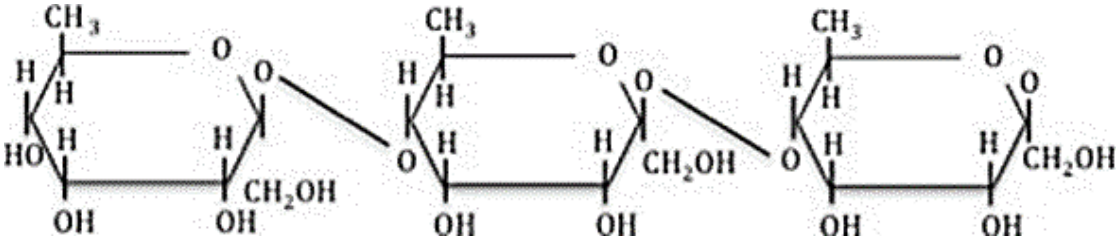


Рисунок 5 – химическая формула левана

Наряду с общими свойствами, такими как биоразлагаемость, биосовместимость, экологичность, гибкость и возобновляемость, леван также обладает важными свойствами, которые обеспечивают применение в медицине: противовоспалительные, антиоксидантные и антиканцерогенные [31].

Одним из эффективных способов улучшения характеристик молочных продуктов является добавление стабилизаторов. Являясь отличным стабилизатором, эмульгатором и усилителем вкуса, леван также полезен в молочных продуктах. Леван в настоящее время производится многими компаниями по всему миру и широко используется во многих пищевых продуктах в качестве стабилизатора. Также свое применение леван нашел в химической промышленности. Благодаря своим превосходным свойствам прочности на растяжение леван стал очень сильным конкурентом многим клеям на нефтехимической основе. Компания Monatana Biotech SE Inc. выпускает две формы клеев на основе левана. Отличные полимерные свойства

левана, такие как пленкообразующая способность, вязкость и стабильность, сделали его важным вспомогательным веществом в фармацевтической промышленности. Леван широко используется в качестве эмульгатора и инкапсулирующего агента. Леван также используется в качестве усилителя цвета и вкуса при производстве таблеток и капсул [31].

Сукциногликан – представляет собой кислые внеклеточные гетерополисахариды, состоящие из повторяющихся звеньев октосахаридов, состоящими из мономеров галактозы и глюкозы [32].

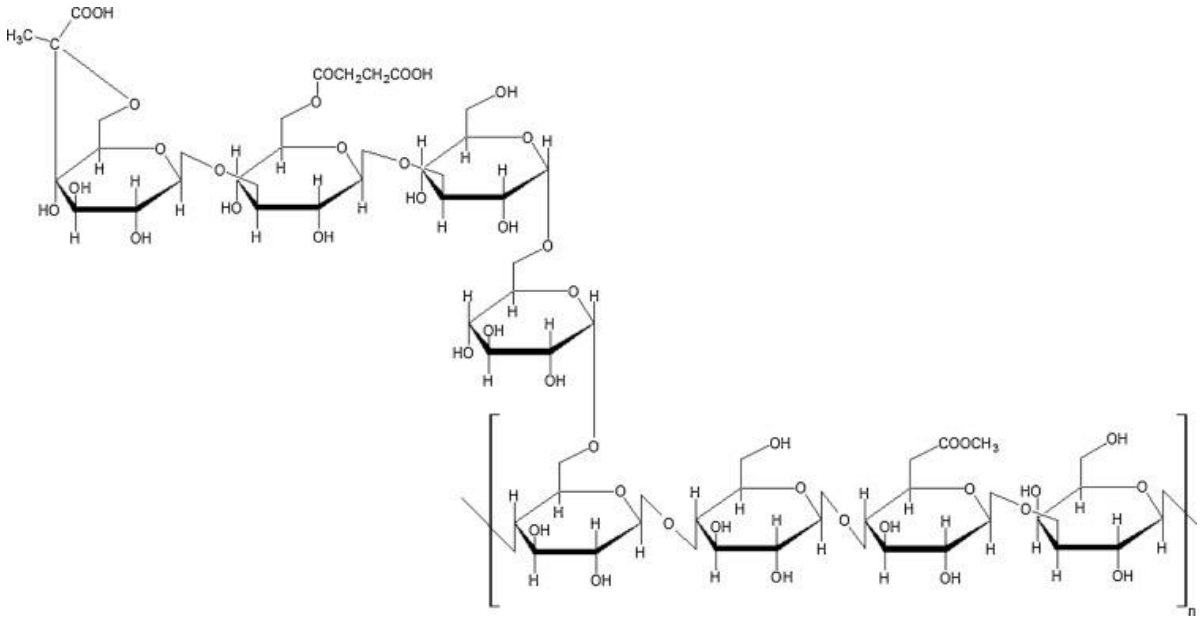


Рисунок 6 – химическая формула сукциногликана

Сукциногликан является экономически важным экзополисахаридом, он синтезируется в основном почвенными микроорганизмами *Agrobacterium, Rhizobium* или *Pseudomonas*. Он используется в косметике по уходу за кожей, средствах по уходу за домом, входит в состав удобрений, также используется для повышения нефтеотдачи в качестве эмульгатора, стабилизатора и загустителя. Сукциногликан коммерчески доступен под торговым названием Rheozan® SH, и компания Solvay Novecare [Режим доступа: https://www.solvay.com/en/our-company/our-businesses/solutions] является

единственным производителем и поставщиком бактериального сукциногликана во всем мире. Компания сообщила о производстве сукциногликана путем ферментации *Agrobacterium tumeficiens* и его очистки путем осаждения изопропанолом с последующей сушкой и измельчением [33].

Курдлан – представляет собой биоактивный полисахарид, состоящий из 300–500 единиц глюкозы, связанных β-1,3-гликозидными связями [34].

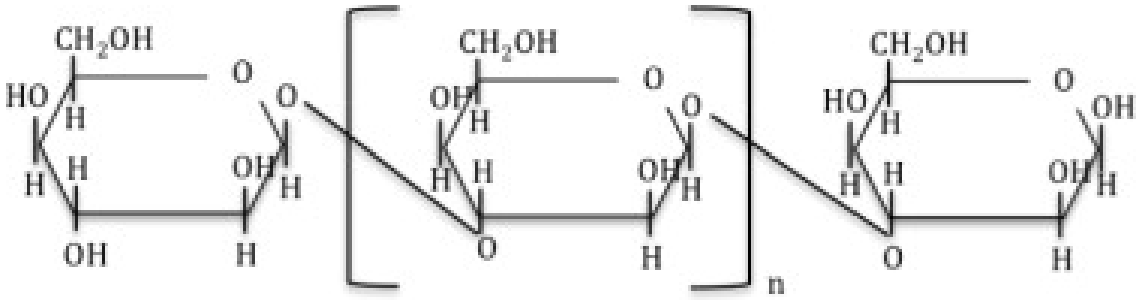


Рисунок 7 – химическая формула курдлана

Обычно продуцируется такими микроорганизмами, как *Agrobacterium sp., Rhizobium sp., A. faecalis, Gluconacetobacter xylinus, Bacillus cereus*. Имеет широкое применение в фармацевтической и пищевой промышленностях. Курдлан обладает противовирусными, противоопухолевыми и антибактериальными свойствами, поэтому его можно применять в качестве каркасов в тканевой инженерии, также рассматривается как перспективный биологически активный материал для перевязки ран. Биоматериалы на основе курдлана могут поглощать в 9,74–12,29 раз больше собственного объема раневой жидкости и сохранять хорошую проницаемость во влажной среде [34]. В пищевой промышленности используют в качестве ингредиента для производства низкокалорийной пищи.

Ксантан (ксантановая камедь) – разветвленный гетерополисахарид, состоящий из пентасахаридных звеньев (D-глюкоза, D -манноза и D-остатки -глюкуроновой кислоты) [36].

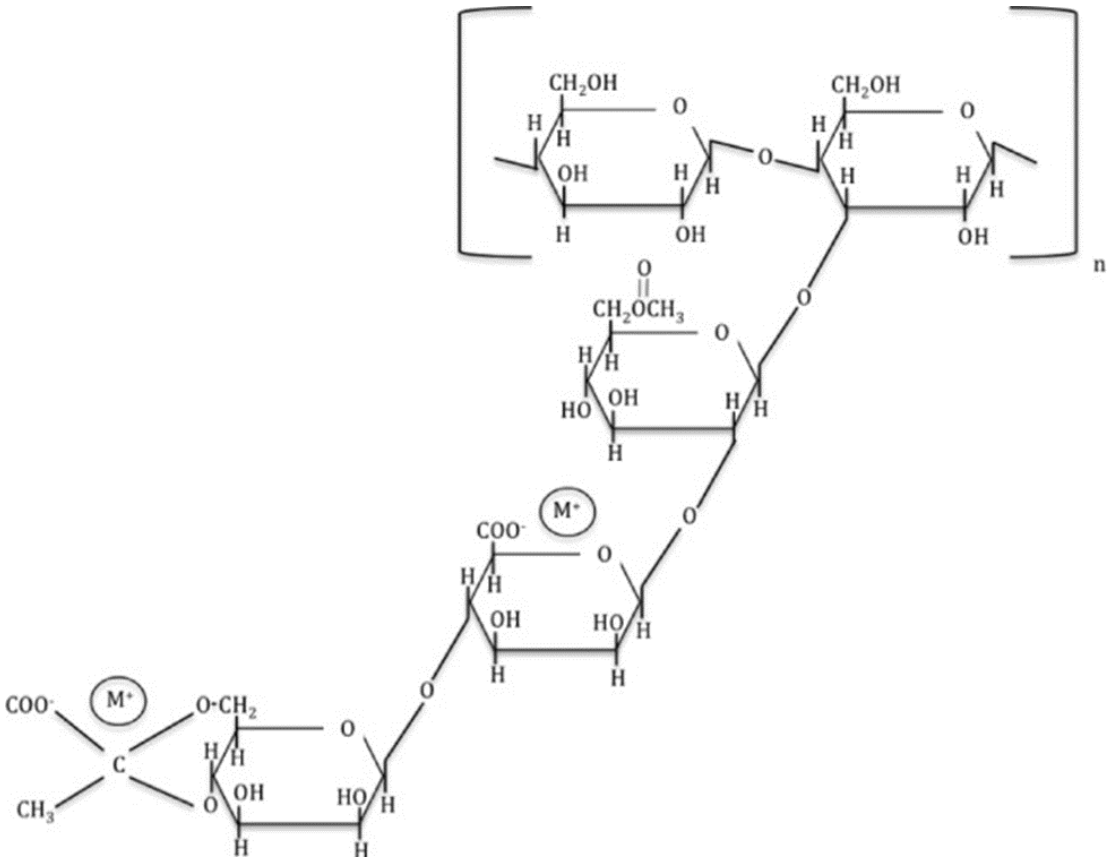


Рисунок 8 – химическая формула ксантана

Представляет собой гидрогелевый полисахарид, коммерчески производимый грамотрицательной бактерией *Xanthomonas campestris.* Ксантан был коммерчески произведен компанией CP Kelco под торговой маркой Kelzan и был аккредитован для использования в пищевых продуктах в 1968 году [35,36].

Он обладает такими свойствами, как биоразлагаемость, биосовместимость, не токсичность и поэтому был одобрен на основании токсикологических тестов, для использования в качестве пищевой добавки. Термически стабилен, образует очень вязкие растворы.

Ксантан использовался как загуститель в зубной пасте и других продуктах для того, чтобы они оставались густыми, также используется в чистящих средствах, косметике, красках. Чаще всего используется для

контролируемой системы доставки лекарств. В сельскохозяйственном секторе текучесть фунгицидов, гербицидов и инсектицидов была улучшена за счет добавления ксантана [35]. В пищевой промышленности используют в хлебобулочных изделиях, добавляют в безглютеновую выпечку из-за эластичности, которую он придает тесту.

Другим важным применением ксантана является повышение нефтеотдачи благодаря контролю воды и стабилизации суспензии в условиях экстремальных температур, а также высоких концентраций солей. Растворы ксантана обладают высокой вязкостью даже при небольшом количестве смолы, что придает растворам псевдопластичность, тем самым повышая их нефтеотдающие свойства. Это помогает в извлечении нефти из мелких пор в трубах путем перекачки ксантана [35].

Альгинат – состоит из из α -D-маннуроновой кислоты и β-L-гулуроновой кислоты.

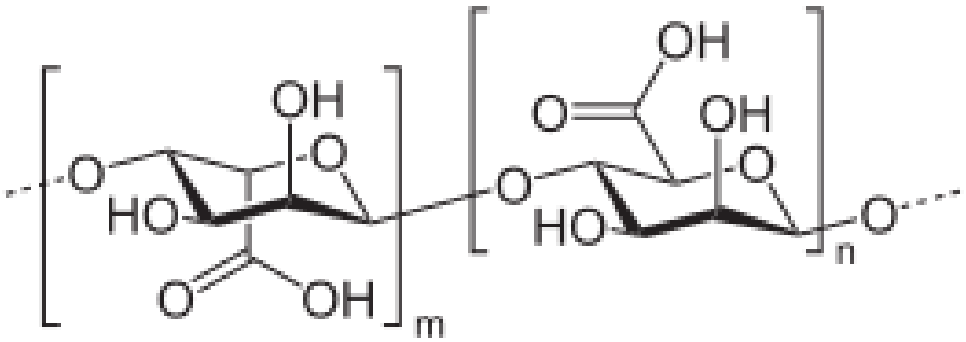


Рисунок 9 – химическая формула альгината

Является коммерческим продуктом, получаемым из бурых водорослей. Он также секретируется *Pseudomonas aeruginosa и Azotobacter vinelandii.* Бактериальный альгинат имеет широкое применение, он используется в качестве загустителя, стабилизатора эмульсии, а также в тканевой инженерии как перевязочный материал для заживления ран. В сельскохозяйственном секторе он используется для покрытия корней саженцев и растений, тем

самым предотвращает от высыхания, а также в качестве микрокапсулирующей матрицы для удобрений, пестицидов [37].

Таким образом, исследовательский интерес к бактериальному производству экзополисахаридов постоянно растет, поскольку они обладают важными свойствами, которые можно применять во многих областях. Но на сегодняшний день полисахариды, полученные из растений, водорослей и животных, по-прежнему составляют основную долю рынка, это связано с тем, что цены на производство бактериальных экзополисахаридов высоки. Поэтому, во всем мире многие ученые изучают различные способы снижения себестоимости продукции за счет поиска новых высокопродуктивных штаммов, а также использования различных дешевых и альтернативных субстратов и оптимизации их производства.

2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Исследуемый штамм бактерий *Agrobacterium tumefaciens* выделен самостоятельно в Институте биофизики СО РАН из земли горшечного растения.

2.2. Методы исследования

2.2.1 Получение накопительной культуры *Agrobacterium tumefaciens*

Для получения накопительной культуры были отобраны почвенные образцы, затем помещены в колбу, содержащую 100 мл среды Эшби. Среда имела следующий состав (г/л): маннит – 20.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; NaCl – 0.2; $CaCO_3$ – 5.0; K_2SO_4 – 0.2; K_2HPO_4 – 0.2; водопроводная вода 1 л. Далее колбы ставили в термостат на 96 часов до образования поверхностной пленки. Получив накопительную культуру, производили посев на агаризованную среду Эшби. Состав среды (г/л): маннит – 20.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; NaCl – 0.2; $CaCO_3$ – 5.0; K_2SO_4 – 0.2; K_2HPO_4 – 0.2; агар – 20.0, водопроводная вода 1 л.

2.2.2 Исследование свойств выделенного штамма

Фенотипические свойства выделенного штамма исследовали с использованием набора для окрашивания по Граму и микроскопа (Primo Star ZEISS, Германия).

Видовую идентификацию проводили путем секвенирования нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК в ЦКП «Геномика» (Новосибирск) с использованием базы данных NCBI GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Для построения филогенетического дерева использовали программу «MEGA 11». Видовую принадлежность определяли по биохимическим тестам, согласно определителю Берджи. В

качестве субстратов использовали: сорбит, маннит, маннит с вазелином, мочевину, крахмал лактозу, сахарозу, глюкозу, метиленовое молоко.

Определяли подвижность по методу Пешкова [38]. Производили посев на полужидкую агаризованную среду в пробирке «в столбик», далее в асептических условиях прокалывали агар, пробирку с культурой убирали в термостат и оставляли на сутки. Подвижность была оценена по характеру роста. Рост по направлению укола указывает на неподвижные культуры, а диффузный рост говорит о подвижности.

2.2.3 Культивирование *Agrobacterium tumefaciens*

Бактерии культивировали в различных средах в колбах объемом 0,5 л с коэффициентом заполнения 0,4. Первая среда способствовала накоплению экзополисахаридов [39] и имела следующий состав (г/л): дрожжевой экстракт – 1; K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2. В качестве источников углерода использовали фруктозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, маннозу, ксилозу, маннит, сорбит (10 г/л), а также сложный сахаросодержащий субстрат свекловичную мелассу концентрацией 10 г/л и 20 г/л.

В качестве последующих двух сред для культивирования были выбраны – среда на основе буфера Берка, поскольку данная среда является специфичной именно для почвенных бактерий [40] имевшая состав (г/л): K_2HPO_4 – 1,05; KH_2PO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0,2; $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$ – 0,025; NH_4Cl - 1 г/л и минеральная среда Шлегеля, являющаяся универсальной средой для синтеза ПГА, имеющая состав (г/л): $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ – 9,0; KH_2PO4 – 1,5; $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0,2; $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$ – 0,025 г/л, NH_4Cl - 1 г/л. Микроэлементы вводили из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,030; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,08; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,008; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,176; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$

– 0,050; $NiCl_2$ – 0,008 (г/л). В качестве инокулята была использована бактериальная культура, выращенная в пробирках на скошенном агаре.

В дальнейшем бактерии культивировали в шейкере - инкубаторе Incubator Shaker Innova® серии (New Brunswick Scientific, США) при температуре 30ºС и 200 об./мин. в течение 72 часов.

2.2.4 Анализ параметров культивирования

Прирост биомассы клеток в ходе культивирования бактерий отмечали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры.

Для измерения оптической плотности в стерильных условиях отбирали пробы культуры, 1 мл культуры разбавляли в 5 мл дистиллированной воды. Полученную пробу измеряли при длине волны λ=440 нм в кювете (1 мм) на спектрофотометре UNICO-2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США). Результаты фиксировали.

Урожай биомассы (г/л) оценивали гравиметрическим методом: 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 5 мин при 6000 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали. Данную процедуру повторяли дважды. Полученную биомассу перенесли в предварительно взвешенные бюксы. Бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу при 105 ºС в течение 24 часов. После этого бюксы доводили до постоянного веса в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах. Вес биомассы рассчитывали, как разницу между весом бюкса с биомассой и его исходным весом.

Концентрацию биомассы в среде на основе дрожжевого экстракта регистрировали следующим образом: отбирали пробы по 10 мл, разбавляли в три раза дистиллированной водой, центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) в течение 15 мин при 8000 об./мин. Надосадочную

жидкость сливали, осадок дважды промывали дистиллированной водой и подвергали центрифугированию. Получившийся на выходе осадок перенесли в бюксы с известным весом и высушивали при температуре 105^0С в течение 24 часов в сухожаровом шкафу (Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония). Бюксы взвешивали и рассчитывали сухую биомассу (г/л).

Для определения процентного содержания и мономерного состава ПГА проводили метанолиз сухой биомассы: к навеске 3,9-4,5 мг сухой биомассы добавляли 0,85 мл метанола, 1 мл внутреннего стандарта и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Выдерживали на водяной бане под обратным холодильником 2 ч 40 мин. После процедуры добавляли 1 мл воды дистиллированной. Проводили хроматографию метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре (Agilent Technologies 7890A, США) с масс-детектором (Agilent Technologies 5975C, США).

2.2.5 Выделение экзополисахаридов

Выделение экзополисахаридов проводили общепринятым методом спиртового осаждения, используемым для выделения полисахаридов при помощи этанола [41]. Бактериальную культуру центрифугировали при 8000 об./мин. в течение 15 минут, далее надосадочную жидкость заливали этанолом, предварительно охлажденным в морозильной камере для более точного результата, в соотношении 1:3 (250 мл культуры: 750 мл спирта), после чего оставляли в холодильнике при 40^0С в течение суток. По истечению времени осажденный ЭПС перемещали в заранее взвешенную чашку Петри и ставили в сухожаровой шкаф (Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) на сутки при температуре 40^0С или лиофильно высушивали.

2.2.6 Определение химического состава экзополисахарида

Для определения состава экзополисахарида использовали инфракрасное преобразование Фурье (Институт физики СО РАН). ИК-спектры экзополисахарида, регистрирорвали на Фурье ИК-спектрометре Vector-22 (Bruker, Germany) в интервале частот 500-4000 см-1. Два миллиграмма экзополисахарида перемешивали с 200 мг бромида калия (KBr) (соотношение 1:100), потом смесь запрессовывали в форму диаметром 16 мм и проводили ИК-спектроскопию для обнаружения функциональных групп, свойственных полисахаридам.

2.2.7 Способность к набуханию

Для определения способности к набуханию использовали формулу [42]:

$$\alpha = Vs/md,$$

где:

α – это способность к набуханию (мл/г);

md – вес сухого образца (г);

Vs – объем гидратированного ЭПС.

Взвешивали 100 мг высушенного порошка ЭПС, затем полимер гидратировали в стеклянном мерном цилиндре 10 мл дистиллированной воды при комнатной температуре в течение 24 часов, после чего замеряли объем гидратированного образца.

2.2.8 Изготовление микрочастиц

В бюксе готовили 2%-ный раствор экзополисахарида, для этого 200 мг измельченного экзополисахарида растворяли в 10 мл дистиллированной воды.

Бюкс ставили на магнитную мешалку на 5-7 минут, до образования однородной смеси. Далее готовили раствор: к 50 мл вазелинового масла добавляли 1,5 мл Tween-80 и 0,5 мл пищевого эмульгатора, приготовленный раствор перемешивали и нагревали при 45^0С. Для того, чтобы придать частицам твердость готовили 5%-ный раствор хлорида кальция $CaCl_2$.

К приготовленному раствору тонкой струей из шприца добавляли 10 мл 2%-ного раствора экзополисахарида. Перемешивали с помощью гомогенизатора (5000 об/мин.). Затем ставили на магнитную мешалку и нагревали при 45 °С, 750 об/мин. По истечению 30 минут добавляли 2,5 мл хлорида кальция. После этого оставляли еще на 2 часа, затем убирали в холодильник на сутки.
По истечению времени полученные частицы промывали гексаном и центрифугировали в течение 5 минут при 15000 об./мин. (Hanil Science Industrial, Япония).

2.2.9 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартными отклонениями.

3. Результаты

С 31 по 47 страницы изъяты в связи с авторскими правами

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы был выделен штамм бактерий и идентифицирован путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК и стандартных биохимических тестов как *Agrobacterium tumefaciens* NN.

2. Штамм бактерий *Agrobacterium tumefaciens* NN способен к синтезу двух типов полимерных соединений: поли(3-гидроксибутирата) и экзополисахаридов.

3. Показано, что состав среды влияет как на урожай биомассы, так и на выход П(3ГБ). В отношении накопления полигидроксиалканоатов наилучшие показатели (26% от веса сухой биомассы) были достигнуты при культивировании продуцента на минеральной среде Шлегеля при использовании глюкозы в качестве источника углерода.

4. При исследовании факторов, влияющих на выход ЭПС, а именно: состава среды, источника углерода, интенсивности аэрации, концентрации дрожжевого экстракта было показано, что наиболее высоких показателей концентрации ЭПС удалось достичь при культивировании *Agrobacterium tumefaciens* NN на среде с дрожжевым экстрактом на фруктозе и мальтозе (1,94 ± 0,097 и 1,276 ± 0,146 г/л, соответственно). Наилучшими условиями для синтеза ЭПС является концентрация дрожжевого экстракта 1 г/л, аэрация при орбитальной скорости вращения шейкера-инкубатора – 200 об./мин. При использовании дешевого субстрата – мелассы, наибольший урожай биомассы и выход ЭПС был зарегистрирован при культивировании бактерий с концентрацией мелассы 20 г/л (3,287 ± 0,246 и 2,18 ± 0,132, соответственно).

5. Получены частицы на основе экзополисахарида методом обратной эмульсии. Средний диаметр частиц составил – 5,44 ± 3,63 мкм.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Градова, Н. Б. Синтез и физико-химические свойства экзополисахаридов, продуцируемых молочнокислыми бактериями *Leuconostoc mesenteroides*, культивируемыми на среде с лактозой и сахарозой / Н. Б. Градова //Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – №. 1. – С. 82-88.

2. Vijayendra S. V. Microbial biopolymers: the exopolysaccharides / V.S. Vijayendra // Microbial factories. – Springer, New Delhi, 2015. – С. 113-125.

3. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. – Новосибирск. – 2003. – 331 с.

4. Николаева, Е. Д. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава / Е. Д Николаева, Е. И Шишацкая, К. Е Мочалов, Т. Г Волова, Э. Д Сински // Клеточная и тканевая трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6. – С. 54-63.

5. García, A. High production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process / A. García // Biochemical engineering journal. – 2014. – Т. 82. – С. 117-123.

6. Kim, B. S., Lee, S. C, Lee, S. Y., [et al.] Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer / B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, [et al.] // Enzyme and Microbial Technology. – 1994. – Т. 16, №. 7. – С. 556-561.

7. Diaz-Barrera, A. Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects / A. Diaz-Barrera // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Т. 9. – №. 33.

8. Киселев, Е. Г. Применение сахаросодержащих субстратов для повышения доступности «зелёных» биопластиков: учеб.-метод. пособие /

сост.: Е. Г. Киселёв, А. В. Демиденко, Н. О. Жила, К. Ю. Сапожникова, Т. Г. Волова // – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2022.

9. Peña, C., Castillo, T., García, A. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work / C. Peña, T. Castillo, A. García // Microbial biotechnology. – 2014. – Т. 7. – №. 4. – С. 278-293.

10. Манчак, Д. Контроль синтеза полигидроксиалканоатов в штамме *Azotobacter vinelandii* UWD/ Д. Манчак // Микробиология. - 1994. - Т. 140. - №. 4. - С. 953-963.

11. Diaz-Barrera, A. Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects / A. Diaz-Barrera // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Т. 9. – №. 33.

12. Kavitake, D., Delattre, C., Pierre, G., [et al.] Physical and functional characterization of succinoglycan exopolysaccharide produced by *Rhizobium radiobacter* CAS from curd sample / D. Kavitake, C. Delattre, G. Pierre, [et al.] // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Т. 134. – С. 1013-1021.

13. Bagnol, R., Eglin, D. The production and application of bacterial exopolysaccharides as biomaterials for bone regeneration / R. Bagnol, D. Eglin // Carbohydrate Polymers. – 2022. – С. 119550.

14. Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications / F. Freitas, V. D. Alves, M. A. Reis // Trends in biotechnology. – 2011. – Т. 29. – №. 8. – С. 388-398.

15. Staudt, A. K., Wolfe, L. G., Shrout, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* / A. K. Staudt, L. G. Wolfe, J. D. Shrout // Archives of microbiology. – 2012. – Т. 194. – №. 3. – С. 197-206.

16. Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications / F. Freitas,

V. D. Alves, M. A. Reis // Trends in biotechnology. – 2011. – Т. 29. – №. 8. – С. 388-398.

17. McKellar, R. C. Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter* / C. R. McKellar // Food hydrocolloids. – 2003. – Т. 17. – №. 4. – С. 429-437.

18. Ruiz, S. P. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer / P. S. Ruiz // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2015. – Т. 122. – С. 15-28.

19. Hisamatsu, M. Structural elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from Agrobacterium and Rhizobium by fragmentation with two special β-d-glycanases and methylation analysis / M. Hisamatsu // Agricultural and Biological Chemistry. – 1980. – Т. 44. – №. 5. – С. 1049-1055.

20. Andhare, P. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by Rhizobium radiobacter strain CAS from curd sample / P. Andhare // Food Hydrocoll 64:1–8.

21. Kwon, C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric behavior of succinoglycan monomers, dimers, and trimers isolated from *Rhizobium meliloti* 1021 / C. Kwon // Carbohydr Res 346:2308–2314.

22. Hawkins, J. Characterization of a gene encoding a membrane protein that affects exopolysaccharide production and intracellular Mg2+ concentrations in *Ensifer meliloti* / J. Hawkins // FEMS Microbiol Lett 364

23. Stredansky, M. Succinoglycan production by *Agrobacterium tumefaciens* / M. Stredansky // Journal of fermentation and bioengineering. – 1998. – Т. 85. – №. 4. – С. 398-403.

24. Conti, E. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties / E. Conti // Microbiology. – 1994. – Т. 140. – №. 5. – С. 1125-1132.

25. Mozzi, F. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87

/ F. Mozzi // Journal of Applied Microbiology. – 2001. – Т. 91. – №. 1. – С. 160-167.

26. Looijesteijn, P. J. Regulation of exopolysaccharide production by Lactococcus lactis subsp. cremoris by the sugar source / J. P. Looijesteijn //Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Т. 65. – №. 11. – С. 5003-5008.

27. Mandal, S. M. Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a Rhizobium isolate of *Vigna mungo* (L.) Hepper / M. S. Mandal // Biotechnology letters. – 2007. – Т. 29. – №. 8. – С. 1271-1275.

28. Pal A., Paul A. K. Optimization of cultural conditions for production of extracellular polymeric substances (EPS) by serpentine rhizobacterium *Cupriavidus pauculus* KPS 201 / A. Pal, K. A. Paul. // Journal of Polymers. – 2013. – Т. 2013.

29. Zhang, H. T. Sequence and transcriptional analysis of the genes responsible for curdlan biosynthesis in *Agrobacterium sp*. ATCC 31749 under simulated dissolved oxygen gradients conditions / T. H. Zhang // Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – Т. 91. – №. 1. – С. 163-175.

30. Sayyed, R. Z. Production of Exo-polysaccharide by *Rhizobium sp* / Z. R. Sayyed // Indian journal of microbiology. – 2011. – Т. 51. – №. 3. – С. 294-300.

31. Dahech, I., Belghith, K. S., Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats / I. Dahech, K. S. Belghith // International journal of biological macromolecules. – 2011. – Т. 49. – №. 5. – С. 942-947.

32. Ruiz, S. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer / S. Ruiz. // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2015. – Т. 122. – С. 15-28.

33. Halder, U. Structural and functional properties, biosynthesis, and patenting trends of Bacterial succinoglycan: A review / U. Halder // Indian journal of microbiology. – 2017. – Т. 57. – №. 3. – С. 278-284.

34. Yuan M., Fu, G., Sun, Y., [et al.] Biosynthesis and applications of curdlan / M. Yuan, G. Fu, Y. Sun, [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2021. – Т. 273. – С. 118597.

35. Bhat, I. M. Advances in xanthan gum production, modifications and its applications / M. I. Bhat // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2022. – С. 102328.

36. Petri, D. A. versatile biopolymer for biomedical and technological applications / D. A. Petri // Journal of Applied Polymer Science. – 2015. – Т. 132. – №. 23.

37. Campos, E. V. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals / E. V. Campos // Agronomy for sustainable development. – 2015. – Т. 35. – №. 1. – С. 47-66.

38. Васильев, Д. А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характери-стики / Д. А. Васильев // Научное издание.– Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. ПА Столыпина, 2013.–98 с.: Ил. 49. ISBN: 978-5-905970-10-8. – 2013.

39. Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., [et al.] 1H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass / S. Jan, C. Roblot, J. Courtois [et al.] // Enzyme and Microbial Technology. – 1996. – Т. 18. – №. 3. – С. 195-201.

40. Savenkova, L. Effect of phosphate supply and aeration on poly-β-hydroxybutyrate production in Azotobacter chroococcum / L. Savenkova // Process Biochemistry. – 1999. – Т. 34. – №. 2. – С. 109-114.

41. Колтовская, С. Г. Изучение динамики образования полисахаридного комплекса *Azotobacter chroococcum* / Г. С. Колтовская // Вестник современных исследований. – 2019. – №. 2.2. – С. 4-7.

42. Kavitake, D. Delattre, C., Pierre, G., [et al.] Physical and functional characterization of succinoglycan exopolysaccharide produced by *Rhizobium radiobacter* CAS from curd sample / D. Kavitake, C, Delattre, G. Pierre, [et al.] //

International journal of biological macromolecules. – 2019. – Т. 134. – С. 1013-1021.

43. Дж, Х. Определитель бактерий Берджи / Х. Дж /М.: Мир. – 1997. – Т. 1. – С. 1-429.

44. Torres, C. A. V. Impact of glycerol and nitrogen concentration on Enterobacter A47 growth and exopolysaccharide production / V. A. C. Torres // International journal of biological macromolecules. – 2014. – Т. 71. – С. 81-86.

45. Medjeber, N. Screening and production of polyhydroxyalcanoates by *Bacillus megaterium* by the using cane and beet molasses as carbon sources / N. Medjeber. // Der Pharmacia Lettre. – 2015. – V. 7. – №6. – P. 102–109.

46. Roychowdhury, R. Isolation of an exopolysaccharide from a novel marine bacterium *Neorhizobium urealyticum* sp. nov. and its utilization in nanoemulsion formation for encapsulation and stabilization of astaxanthin/ R. Roychowdhury // LWT. – 2021. – Т. 151. – С. 112105.

47. Горева, А. В. Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров окисалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов / А. В. Горева, Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2012. – Т. 54. – №. 2. – С. 224-224.

48. Kiselev E. G., Demidemko, A. V., Zhila, N. O. [et al.] Sugar Beet Molasses as a Potential C-Substrate for PHA Production by *Cupriavidus necator* / E. G. Kiselev, A. V. Demidenko, N. O. Zhila [et al.] // Bioengineering. – 2022. – Т. 9. – №. 4. – С. 154.

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.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЯМИ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНЫХ УГЛЕРОДНЫХ СУБСТРАТАХ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Магистерская программа 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	подпись, дата	Доцент, Канд. биол. наук, Н.О. Жила
Магистрант	подпись, дата	Н.А. Токмина
Рецензент	подпись, дата	С.н.с. ИБФ СО РАН Канд. биол. наук, М.Ю. Трусова

Красноярск 2022