

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова
« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Влияние фруктозы в качестве основного С-субстрата на рост и синтез запасных
полигидроксиалканоатов штаммом *Cupriavidus eutrophus* В-10646

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

Выпускник _____ Сапожникова К.Ю.
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа на тему «Влияние фруктозы в качестве основного С-субстрата на рост и синтез запасных полигидроксиалканоатов штаммом *Cupriavidus eutrophus* В-10646» содержит 52 страниц текстового документа, 61 использованный источник, 2 таблицы и 17 рисунков.

Ключевые слова: *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS*, ФРУКТОЗА, ПОЛИМЕР, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ), ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ЛИПИДЫ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ, ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ.

Цель данной работы – физиолого-биохимическая характеристика культуры бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646, выращиваемой на фруктозе в качестве основного углеродного субстрата в режиме синтеза запасных макромолекул. Для достижения поставленной цели реализовывались следующие задачи:

1. Исследовать динамику накопления биомассы и полимера у бактерий *C. eutrophus* В-10646, выращиваемых на фруктозе в качестве основного источника углерода.
2. Изучить жирнокислотный состав липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов *C. eutrophus* В-1064.
3. Изучить размерные характеристики клеток *C. eutrophus* В-10646, количество гранул полигидроксиалканоатов в клетке.

Актуальность данной работы заключается в нижеследующем.

Изучение и характеристика бактерий, растущих на том или ином субстрате (в данной работе – фруктоза) – очень важный шаг на пути к достижению в биотехнологических процессах высоких показателей как роста культуры, так и выходов целевого продукта (полигидроксиалканоатов).

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Основные организмы, продуцирующие полигидроксиалканоаты	7
1.2 Полигидроксиалканоаты	9
1.2.1 Многообразие полигидроксиалканоатов	10
1.2.2 Поли(3-гидроксибутират)	10
1.2.3 Модели гранулообразования	12
1.2.4 Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов	13
1.3 Липополисахариды	15
1.3.1 Биосинтез липополисахаридов	16
1.3.2 Транспорт липополисахаридов	19
1.3.3 Зависимость степени вирулентности некоторых бактерий от структуры их липополисахаридов	20
1.4 Фосфолипиды	21
2 Материалы и методы	23
2.1 Бактериальный штамм	23
2.2 Культивирование бактерий. Методы измерения параметров культивирования	23
2.3 Определение процентного содержания полимера методом газо-жидкостной хроматографии с МС-детектором	25
2.4 Определение молекулярных характеристик полимера	25
2.5 Выделение липидов цитоплазматической мембраны	26
2.6 Экстрагирование липополисахаридов горячим феноло-водным методом	26
2.7 Омыление экстрагированных липополисахаридов	27
2.8 Газо-жидкостная хроматография с массовой спектрометрией метиловых эфиров жирных кислот	27

2.9	Получение электронных изображений бактериальных клеток.....	28
3	Результаты.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1	Исследование роста штамма бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> В-10646 при культивировании на фруктозе	Ошибка! Закладка не определена.
3.2	Исследование накопления запасных полигидроксиалканоатов, синтезируемых <i>C. eutrophus</i> В-10646 при культивировании на фруктозе	Ошибка! Закладка не определена.
3.3	Оценка жирнокислотного состава липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов <i>C. eutrophus</i> В-10646	Ошибка! Закладка не определена.
3.4	Изучение размерных характеристик клеток <i>Cupriavidus eutrophus</i> В-10646.....	Ошибка! Закладка не определена.
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	29
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	30

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии *Cupriavidus eutrophus* (ранее *Alcaligenes*, *Wautersia*, *Hydrogonomonas*, *Ralstonia*) – модельный организм, способный накапливать в качестве резервных биомолекул полигидроксиалканоаты (ПГА), используя при росте самые разнообразные субстраты – от классических углеводов (фруктоза, глюкоза) до отходов различных производств (производство оливкового, пальмового масла). Биополимеры этого класса обладают крайне широким спектром применения: это медицинская сфера (имплантаты, шовный хирургический материал), сельскохозяйственная сфера (использование в качестве пористых носителей для депонирования пестицидов) и бытовые нужды (упаковочные материалы). Полигидроксиалканоаты для микроорганизмов – это особый внутриклеточный материал для запасания углерода и энергии.

Используемый субстрат прежде всего влияет на урожай биомассы бактерий, выход целевого продукта (в данном случае – ПГА), а также на состав получаемых ПГА. Количественный и качественный состав, характеристики ПГА, такие как молекулярная масса, полидисперсность, кристалличность, температура плавления в свою очередь определяются именно составом синтезируемого полимера. Поиск субстрата для синтеза ПГА – одно из приоритетных и актуальных направлений исследований. Стоимость субстрата оказывает прямое влияние на стоимость готового продукта. Это определяет первостепенную важность как подбора наиболее подходящего субстрата, так и изучения параметров роста и свойств выращиваемой культуры бактерий.

Не менее важным и актуальным является изучение жирнокислотного состава липидов бактерий. Прежде всего липидный профиль используется в хемотаксономии, а состав этого профиля – быстрый способ таксономической идентификации. К тому же, жирные кислоты – это специфические маркеры окружающей среды, так как являются неотъемлемой частью клеточных

мембран, которые, контактируя с окружающей средой, сигнализируют о её изменениях.

Таким образом, разностороннее изучение культуры бактерий, способной накапливать ПГА и характеристика накапливаемых ПГА – это необходимый этап для получения промышленно значимых полимеров, как в отношении объёма производства, так и в отношении качества синтезируемых полимеров.

1 Обзор литературы

1.1 Основные организмы, продуцирующие полигидроксиалканоаты

В настоящее время известно более 300 микроорганизмов, синтезирующих полигидроксиалканоаты. Для промышленного использования активно изучается и рассматривается небольшое число продуцентов. Это *Cupriavidus latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, несколько штаммов метилотрофов и трансгенные штаммы *Escherichia. coli*, *Cupriavidus eutrophus*, *Klebsiella aerogenes*. Данные организмы обладают свойствами, необходимыми для промышленного продуцента биопластиков [2].

Ralstonia eutropha - модельный организм, накапливающий ПГА [38]. Это наиболее изученные представители ПГА–синтезирующих бактерий, потому что эти микроорганизмы могут накапливать до 80-90% поли(3-гидроксибутирата) (ПЗГБ) на простом углеродном субстрате при лимитировании фосфором, азотом или кислородом [3, 30]. *Ralstonia eutropha* – это перспективный продуцент, так как он аккумулирует ПГА даже на отходах промышленных и сельскохозяйственных производств [19].

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 – гомополимер, а ПГА2 – гетерополимер, состоящий из 3 гидроксиалконоатных единиц, содержащих 4-12 атомов углерода. В *Pseudomonas sp. 61-3*, исследованной с помощью электронной микроскопии обнаружилось, что ПГА1 и ПГА2 накапливаются в виде различных гранул в одной и той же клетке [30].

Кроме *R. eutropha* и *Pseudomonas sp.*, ПГА накапливают *Caryophanon latum* [22], *Rhodococcus rubber*, *Acinetobacter sp.*, *Chromatium vinosum*, *Bacillus megaterium*, *Paracoccus denitrificans* [30], *Rhizobium etli* [15] и многие другие.

Поиск субстрата для синтеза ПГА – одно из приоритетных направлений исследований. Стоимость субстрата оказывает прямое влияние на стоимость готового продукта (таблица 1).

Таблица 1 – Затраты и стоимость сырья для синтеза полигидроксibuтирата (Collins, 1987; Lee, 1996)

Субстрат	Стоимость субстрата, \$ США / т	Выход полимера, т / т субстрата	Стоимость субстрата \$ США / т полимера
Глюкоза	220 – 493	0,38	580 – 1300
Сахароза	290	0,40	720
Метанол	110	0,18	610
Этанол	440	0,50	880
Уксусная кислота	370 – 595	0,33 – 0,38	1220 – 1560
Декстроза	360	0,33	1180
Водород	500	1,0	500
Тростниковый сахар	200	0,33	1180
Меласса	220	0,42	520
Молочная сыворотка	71	0,33	220
Гемицеллюлозные экстракты	69	0,20	340

Для получения полигидроксиалканоатов в принципе возможно привлечение разнообразных субстратов. Среди известных – индивидуальные соединения (углекислый газ и водород, сахара, спирты, органические кислоты), отходы спиртовой, сахарной, гидролизной промышленности, производства оливкового и пальмового масла и др., а также необычные субстраты, включая токсичные (октан) [2].

1.2 Полигидроксиалканоаты

Некоторые микроорганизмы способны накапливать вещества, которые близки по своим физико-химическим свойствам к широко применяемым и выпускаемым в огромных количествах синтетическим полиолефинам (полиэтиленом и полипропиленом). Объемы выпуска полиолефинов, получаемых в процессах нефтеоргсинтеза, огромны – 258 млн. тонн в год [3]. В отличие от полиэтилена и полипропилена, которые не разрушаются в природной среде, продукт жизнедеятельности микроорганизмов биосовместим и биоразрушаем [15, 50]. Вещества, которые синтезируют и накапливают бактерии относятся к классу полигидроксиалканоатов (ПГА).

ПГА обладают многими свойствами, привлекательными для различных сфер, включая биомедицину. Преимущества этого класса биоматериалов:

- высокая совместимость ПГА – связана с тем, что мономер, образующий этот полимер – 3-гидроксимасляная кислота – естественный метаболит клеток и тканей организмов;

- ПГА не гидролизуются в жидких средах, т.к. деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальными путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого окисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;

- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавления пластификаторов и модифицирующих компонентов);

- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [3];

Полигидроксиалканоаты являются внутриклеточными материалами для хранения углерода и энергии в клетках многих прокариот [51].

1.2.1 Многообразие полигидроксиалканоатов

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 [3].

Среди известных ПГА встречаются полиэфиры различной химической структуры, от высоко кристаллических термопластов до термолабильных резиноподобных эластомеров [54, 55]. К настоящему времени известно более 150 различных по структуре мономеров, входящих в состав ПГА [3].

Исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры той или иной структуры, ПГА подразделяют на три основные группы:

1. Короткоцепочечные – ПГА_{кц}, состоящие из кислот с длинной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;
2. Среднецепочечные – ПГА_{сц}, в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;
3. Длинноцепочечные – ПГА_{дц} с содержанием кислот C₁₇ и C₁₈ [5].

Наиболее изученными являются короткоцепочечные ПГА – поли(3-гидроксибутират) (П(3ГБ)) и сополимеры 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом [4].

1.2.2 Поли(3-гидроксибутират)

Многие прокариоты способны накапливать резервные материалы, такие как цианофицин (резерв азота и углерода), ПГА (резерв углерода), и полифосфат (резерв фосфора) в виде инертных осмотических включений.

П(ЗГБ) является наиболее распространенным типом ПГА среди бактерий. Содержание П(ЗГБ) в клетках микроорганизмов может составлять до 90% от сухой массы клеток [39].

П(ЗГБ) накапливается в цитоплазме бактерий в виде включений в различном количестве и размерах в зависимости от условий культивирования [35]. В процессе роста и накопления ПГА, бактериальные клетки увеличивают свою длину, но ширина остается постоянной. Таким образом, бактерии точно контролируют свои размеры и форму для того, чтобы наиболее эффективно импортировать питательные вещества [33].

Есть, как правило, 8-12 гранул/клетку, их диаметр составляет от 0,2 до 0,5 мкм в *Ralstonia eutropha* [30].

П(ЗГБ) является наиболее распространенным типом ПГА. Биосинтез и биodeградация П(ЗГБ), а также других типов ПГА изучались в нескольких лабораториях в течение последних 25 лет [39].

Гранулы полигидроксibuтирата - это важные соединения для хранения углерода и энергии у многих прокариот, место локализации гранул - цитоплазма. В условиях ограниченного доступа питательных веществ гранулы П(ЗГБ) позволяют выживать клеткам [23]. Когда наступают более благоприятные условия для репликации, биополимеры деградируют, и освобожденная энергия и мономеры клетка использует на рост и деление [19].

Гранулы в клетке окружены мембраной, толщиной около 2 нм [4]. Они состоят из аморфного полимерного ядра, окруженного плотным белковым поверхностным слоем. Полимер и поверхностный слой представляет собой многофункциональный комплекс, для которого был предложен термин «carbonosome» [56].

Поверхностный слой гранул П(ЗГБ) представляет собой сложноорганизованную систему, которая включает много разных компонентов. По крайней мере описано 17 белков, которые имеют важное значение для биосинтеза, хранения и внутриклеточного использования П(ЗГБ): пять белков-фазинов - PhaP1 - PhaP5, они располагаются на поверхности гранул П(ЗГБ);

семь П(ЗГБ)-деполимераз (*PhaZs*), две ПЗГБ-гидролазы (*PhaZb*, *PhaZc* или *PhaYs*), регулятор белка ФАР и три главных П(ЗГБ) -биосинтетических фермента [β -кетотиолаза (*PhaA*), ацетоуксусная-СоА редуктаза (*PhaB1*) и П(ЗГБ)-синтаза (*PhaC1*)] из *phaCAB* оперона [38].

Фазины - маленькие амфифильные белки, которые определяют количество и размер накопленного П(ЗГБ) [39]. Основная функция фазинов - контролирование свойств поверхности гранул ПГА. Эти белки прочно прикрепляются к гидрофобной поверхности растущей ПГА гранулы, чтобы заблокировать связывание других белков [30].

П(ЗГБ)-синтаза (*PhaC1*) является ключевым ферментом синтеза П(ЗГБ) и катализирует процесс полимеризации 3-гидроксibuтирил-СоА. Функция второй - каталитически неактивной – П(ЗГБ)-синтазы - *PhaC2* неизвестна, но она обладает способностью связываться с П(ЗГБ) гранулами в естественных условиях. Фазины (*PhaPs*), в частности *PhaP1*, охватывают большую часть поверхности гранул и предотвращают слипание гранул между собой. П(ЗГБ) деполимеразы (*PhaZs*) имеют важное значение для реутилизации (мобилизации) полимера во время голодания. Олигомеры гидролазы (*PhaZb*, *PhaZc*) участвуют в расщеплении промежуточно олигомера 3-гидроксibuтирата (ЗГБ) образуемого во время мобилизации. Регуляторные белки (*PhaRs*) регулируют экспрессию выбранных генов фазинов [56].

Известно много различных *PGAPs*, но мало известно об организации этих *PGAPs* на поверхности гранул ПГА. В частности, не известно, организованы они случайным образом на поверхности П(ЗГБ) или существуют конкретные белок-белковые взаимодействия между некоторыми *PGAPs*, которые приводят к упорядоченной структуре на поверхности [38].

1.2.3 Модели гранулообразования

В настоящее время существует три модели гранулообразования:

1. Мицелиальная модель. Удлиняющиеся цепи ПЗГБ ковалентно связаны с синтазой, изначально собранной в мицелиальную структуру [28, 54, 40];

2. Модель «почкования» [52]. Гидрофобная ПГА-синтаза связывается с внутренней поверхностью плазматической мембраны и отпочковывается из этой мембраны, после чего перемещается к поверхности гранулы, покрытой липидным монослоем. В этой модели для образования гранулы задействованы как биологические системы клетки, так и физические свойства самого полимера [54].

3. Тиан с соавторами [52] предложил третью модель образования гранул ПГА у *R. eutropha*. Авторы наблюдали тёмноокрашенные удлиненные структуры, или «элементы-посредники», в центре клетки с прикрепленными маленькими гранулами. В старой культуре эти элементы отсутствовали, что по всей видимости может означать, что они разрушились, либо покрылись гранулами. Авторы предположили, что данные элементы-посредники могут служить в качестве каркасов, обеспечивая для ПГА-синтазы инициацию образования гранул [3].

1.2.4 Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов

Свойства ПГА определяются их строением, прежде всего они зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле [3]. В ходе изучения ПГА стало ясно, что свойства этих полимеров меняются очень значительно в зависимости от типа и соотношения мономеров в полимерной цепи [5].

Одним из наиболее важных макроскопических параметров, характеризующих свойства полимеров, является молекулярная масса, так как определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. На величину молекулярной массы влияет как тип микроорганизма-продуцента, так и условия культивирования и метод экстракции полимера. Молекулярная масса ПГА – это весьма переменный

параметр. Например, у поли(3-гидроксibuтирата) молекулярная масса может меняться от нескольких сотен до миллионов кДа с полидисперсией от 2,3 до 3,2 [5].

Способность полимера кристаллизоваться в нативном состоянии определяет его термомеханические свойства [5]. Величина данного параметра сильно варьирует для каждого типа полимера в зависимости от фракции сополимеров [3]. У полиоксибутирата и некоторых других ПГА, температура, воздействие которой уже приводит к деформации, немного ниже температуры кипения, поэтому газовое состояние в подобных полимерах отсутствует. Основной тип агрегатного состояния – конденсированное состояние (кристаллическое, стеклообразное, жидкое и вязко-текучее) [5]. Температура плавления полимеров отличается в зависимости от фракции определенного компонента в полимере [3].

1.3 Липополисахариды

Липополисахариды (ЛПС) являются основными компонентами наружной мембраны грамотрицательных бактерий, они составляют около 75% поверхности и 5-10% от общей сухой массы грамотрицательных бактерий [43]. Наружная мембрана грамотрицательных бактерий представляет собой асимметричный двухслойный слой, состоящий из фосфолипидов во внутреннем слое и липополисахаридов во внешнем слое [14]. ЛПС структурно состоит из трех частей: гидрофобного липида А – это гидрофобный якорь [59], который прикрепляет молекулу ЛПС к наружной мембране бактерий, фосфорилированного основного олигосахарид, который содержит ~ 10 сахарных остатков [14] и повторяющегося полисахарида, обозначенного как антиген «О» [43]. Схематическое изображение строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий представлено на рисунке 1.

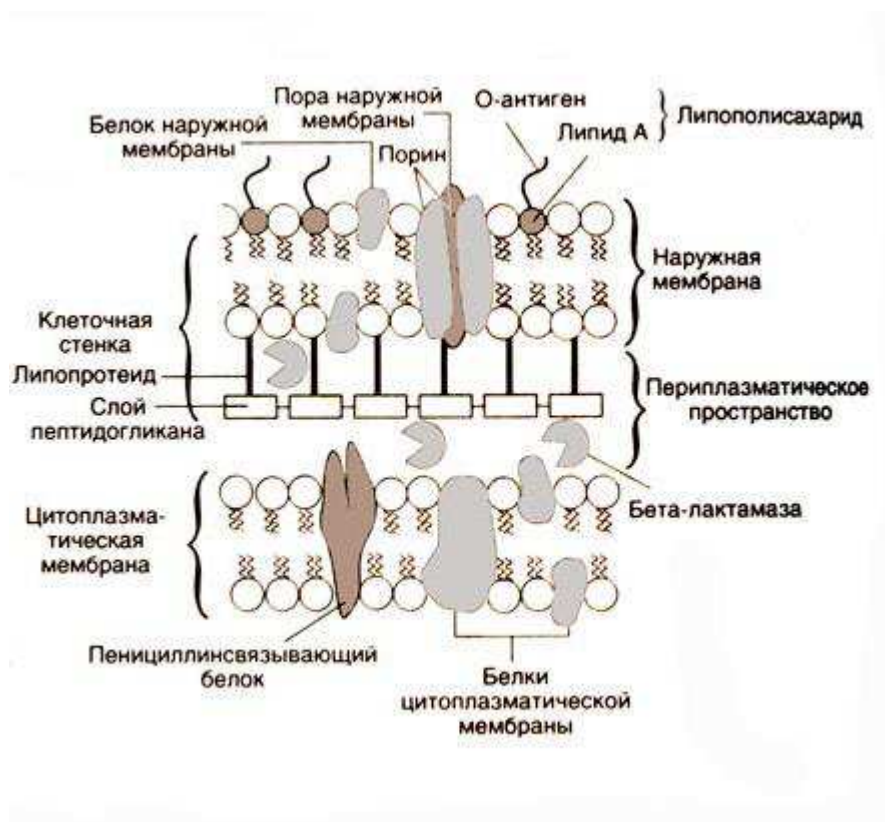


Рисунок 1 – Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий [Tortola et al., 1989].

Часто термины эндотоксин и липополисахарид используются как синонимы [44]. Термин «эндотоксин» был введен в научную семантику Р. Пфейффером в 1892 году. Так был назван термостабильный компонент лизата грамотрицательных бактерий — липополисахарид.

Известно, что именно липид А отвечает за токсические эффекты инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями [25]. Структура ЛПС варьируется от одной бактерии к другой, и может повлиять на вирулентность бактерии [62].

Высокие концентрации ЛПС могут вызвать лихорадку, привести к септическому шоку и смерти после отказа легких или почек. Однако в относительно низких концентрациях липид А является активным иммуномодулятором, который может индуцировать неспецифическое сопротивление как бактериальным, так и вирусным инфекциям [57].

В организмах-хозяевах ЛПС может распознаваться плацебоподобным рецептором 4 (*TLR4*), обнаруженным на поверхности различных иммунных клеток [13]. Такими клетками являются моноциты, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки [41].

1.3.1 Биосинтез липополисахаридов

ЛПС находятся на поверхности бактериальных клеток, но их синтез инициируется в цитоплазме. Механизмы синтеза ЛПС в цитоплазме и их экспорта на поверхность бактерий наиболее изучены для *E. coli*. Биосинтез ЛПС в *E. coli* начинается из небольшой молекулы - UDP-N-ацетилглюкозамина (*UDP-GlcNAc*). Множество ферментов, последовательно функционируя, превращают UDP-GlcNAc сначала в дисахарид-1-Р, далее в Kdo₂-липид А, потом в основной липид А, и, наконец, в ЛПС (рисунок 2) [57].

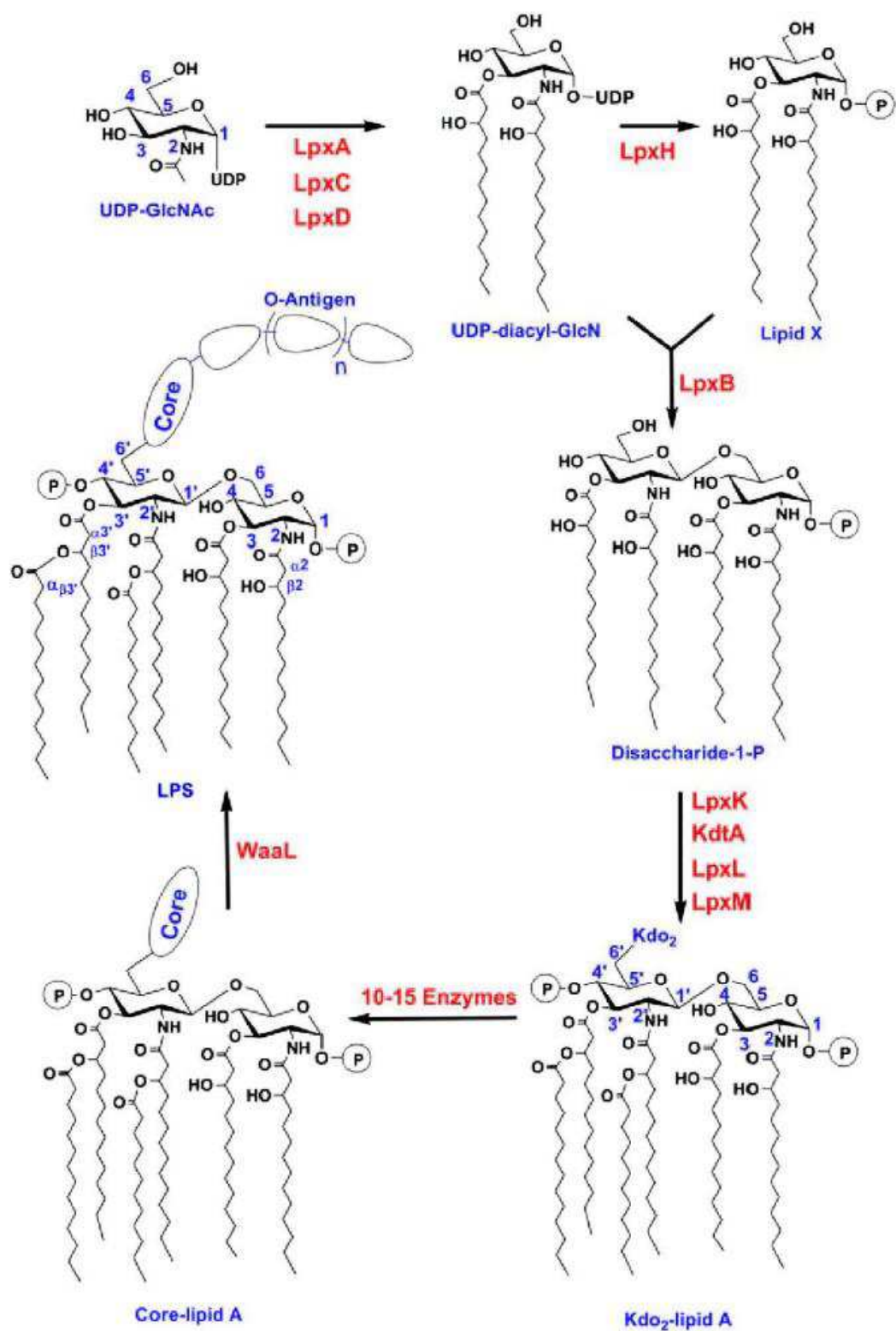


Рисунок 2 – Структура ЛПС и его биосинтетический путь в *E. coli* [57]

Первым этапом пути биосинтеза является синтез Kdo₂-липида А [42]. В этих реакциях задействовано девять ферментов, а сами процессы локализованы в цитоплазме и на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны.

Исходной молекулой является - *UDP-GlcNAc*. Первые три реакции катализируются растворимыми ферментами *LpxA*, *LpxC* и *LpxD*. Они катализируют присоединение двух цепочек 3-гидроксижирных кислот, во 2- и 3-положение молекулы *UDP-GlcNAc*, в результате этого образуется UDP-диацил-GlcN (рисунок 2) [56].

После этого, UDP-диацил-GlcN гидролизуется ферментом *LpxH*, в результате чего образуется липид X [16]. Далее фермент *LpxB* конденсирует липид X с его предшественником - UDP-диацил-GlcN, образуется дисахарид-1-Р [20]. Ферменты, которые катализируют последующие реакции - *LpxK*, *KdtA*, *LpxL* и *LpxM* соответственно, являются интегральными белками внутренней мембраны. *LpxK* представляет собой киназу, которая фосфорилирует 40-положение дисахарид-1-Р с образованием липида IV_A [26]. *KdtA* является бифункциональным ферментом, который включает два 3-дезоксид-маннооктулозона (*Kdo*) в 60-положение липида IV_A. Полученный Kdo₂-липид IV_A подвергается дальнейшим реакциям, катализируемым *LpxL* и *LpxM*, в итоге образуется Kdo₂-липид A (рисунок 2) [17]. Далее, после воздействия 10-15 ферментов, образуется так называемый core-lipid A [57].

Структура липида A является высоко консервативной, а структура основных олигосахаридов дает некоторые вариации. Основные олигосахариды последовательно собираются к липиду A на обращенной к цитоплазме поверхности внутренней мембраны в процессе, где участвуют связанные с мембраной гликозилтрансферазы [36].

В основных олигосахаридах можно выделить две структурно различные области: внутреннее «ядро», которое соединяется с липидом A и внешняя область, которая соединяется с повторяющимся O-антигеном [37].

В *E. coli* и *Salmonella* гены, необходимые для биосинтеза основных олигосахаридов располагаются в трех оперонах: *gmhD*, *waaQ* и *kdtA* [46]. В *E. coli* K-12 оперон *gmhD* содержит четыре гена *gmhD-waaF-waaC-waaL*, которые необходимы для биосинтеза внутренней части олигосахаридов [48]. Ген *waaL* кодирует лигазный фермент, необходимый для присоединения O-антигена к

основному липиду А (рисунок 2) [61]. *WaaQ*-оперон содержит 7-9 генов, кодирующих ферменты, ответственные за биосинтез внешней области основных олигосахаридов и их модификацию [17].

О-антиген, аналогично основным олигосахаридам, синтезируется на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны [42].

О-антигены ЛПС обладают значительным разнообразием. Они могут быть как гомополимерами, так и гетерополимерами. Связь единиц в О-антигене может быть линейной или разветвленной. Блоки О-антигенов могут различаться по типу мономера, а также по положению и стереохимии О-гликозидных связей. Количество О-антигенных групп может достигать 60 в *S. enterica* и 164 в *E. coli* [12].

После синтеза на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны, основной липид А и О-антиген транспортируются к периплазматической поверхности внутренней мембраны, где О-антиген полимеризуется с помощью ферментов *Wzy* и *Wzz* и лигируется к основному липиду А с помощью фермента *WaaL*, что и приводит к появлению ЛПС [12].

1.3.2 Транспорт липополисахаридов

Фермент *Wzx* перебрасывает О-антиген с цитоплазматической поверхности на периплазматическую поверхность внутренней мембраны, а *MsbA* проделывает тоже самое с основным липидом А. В периплазматической поверхности внутренней мембраны, О-антиген полимеризуется ферментами *Wzy* и *Wzz*, образуются О-антигенные повторы, которые, в свою очередь, переносятся на основной липид А ферментом *WaaL*, что и приводит к появлению ЛПС. Ферменты *LptA*, *LptB*, *LptC*, *LptF* и *LptG*, затем перемещают зарождающийся ЛПС с периплазматической поверхности внутренней мембраны на внутреннюю поверхность наружной мембраны, а там уже ферменты *LptD* и *LptE* перемещают ЛПС на внешнюю поверхность наружной мембраны [57].

Транспортировку ядра-липид А осуществляет мембранный белок *MsbA* [22]. *MsbA* является высококонсервативным белком [60]. Транспортировка О-антигена через внутреннюю мембрану происходит за счет фермента *Wzx* [32].

Известно, что в этом процессе пересечения ЛПС периплазматического пространства и достижения наружной поверхности внешней мембраны задействованы несколько белков. Это периплазматический *LptA*, цитозольный *LptB*, белки внутренней мембраны *LptC*, *LptF* и *LptG*, а также белки наружной мембраны *LptD* и *lptE* [16, 18, 20]. *LptB*, *LptF*, *LptG*, *LptC* и *LptA*, транслоцируют ЛПС к внутренней поверхности наружной мембраны. Если *LptA*, *LptB*, или оба из них отсутствуют или дефектны, ЛПС накапливается в периплазме. Уже во внешней мембране, к ее наружной поверхности, ЛПС транспортируется ферментами *LptD* и *LptE* [49].

1.3.3 Зависимость степени вирулентности некоторых бактерий от структуры их липополисахаридов

Липид А является биологически активным компонентом ЛПС [25]. Ответ иммунной системы на него зависит как от тяжести инфекции, так и от структуры липида А. Некоторые грамотрицательные патогенные бактерии синтезируют молекулы липида А, которые плохо распознаются рецептором *TLR4* человека, например, *H. pylori* [53], *F. tularensis* [47], *L. pneumophila* [27], *Porphyromonas gingivalis* [21] и *Chlamydia trachomatis* [29]. Фосфатные группы, длина и количество ацильных цепей липида А играют важную роль в активации *TLR4* [45].

F. tularensis, высоко инфекционная и патогенная для человека бактерия, может синтезировать ЛПС без основного олигосахарида и О-антигенов, который не активирует *TLR4* [58].

Цепи жирных кислот в липиде А также связаны с инфекционностью бактерий. *Yersinia pestis* вызывает инфекцию через укусы блох. В блохах, которые имеют температуру тела около 21-27°C, *Y. pestis* синтезирует липид А,

содержащий шесть цепей жирных кислот, но в человеческом организме (37°C) *Y. pestis* синтезирует липид А, содержащий четыре цепи жирных кислот. Липид А с шестью цепями жирных кислот может активировать иммунную систему через *TLR4*, а липид А с четырьмя цепями жирных кислот не может. Поэтому *Y. pestis* может избежать атаки иммунной системы [34].

Модификация липида А у *Salmonella* также приводит к ослаблению передачи сигнала через путь *TLR4* и, следовательно, может способствовать уклонению от врожденной иммунной системы во время инфекции [31]. Липид А у *Sinorhizobium meliloti*, бобового симбионта, и *Brucella abortus*, филогенетически связанные патогены млекопитающих, имеют необычно модифицированные, очень длинные цепи жирных кислот [24].

1.4 Фосфолипиды

Фосфолипиды являются главным компонентом биологически мембран. По своему строению они представляют собой эфиры фосфорной кислоты и двух многоатомных спиртов — глицерина и сфингозина [10].

Основная часть бактериальных липидов представлена именно фосфолипидами: фосфатидная кислота (ФК), фосфатидиглицерин (ФГ), дифосфатидиглицерин (кардиолипин), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) [40]. Фосфолипиды бактерий – это важнейшие структурно-функциональные компоненты клетки, а их функции разнообразны. Они выступают в роли матрикса для мембранных ферментов и белков, выполняют роль кофакторов и эффекторов, участвуют в биогенезе компонентов клеточной оболочки: липополисахарида, липополипротеина, периплазматических олигосахаридов [1]. Фосфолипиды формируют бислой, обуславливающий непрерывность мембраны. Фосфолипидный состав цитоплазматической мембраны, например, *Escherichia coli* представлен фосфатидилэтаноламином, фосфатидилглицеролом и кардиолипином [9].

Пути, ведущие к синтезу фосфолипидов, состоят из нескольких этапов. Исходным субстратом служит фосфодиоксиацетон (промежуточное соединение гликолитического пути), восстановление которого приводит к образованию 3-фосфоглицерина. К последнему затем присоединяются два остатка жирных кислот. Продуктом реакции является фосфатидная кислота. Она активируется и присоединяется к фосфатной группе серина, инозита, глицерина или другого соединения, что и приводит к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина соответственно [11].

Фосфолипиды, содержащие в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты, особенно подвержены окислению. Есть данные о том, что окисленный фосфатидилхолин может селективно ингибировать эффекты липополисахаридов. Напротив, данные о том, могут ли именно бактериальные фосфолипиды ингибировать эффекты собственных липополисахаридов, отсутствуют [8].

2 Материалы и методы

2.1 Бактериальный штамм

В работе был использован штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646. Этот штамм зарегистрирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Систематическое положение следующее:

Домен: *Bacteria*

Филум: *Proteobacteria*

Класс: *Betaproteobacteria*

Семейство: *Burkholderiaceae*

Род: *Cupriavidus*

Вид: *C. eutrophus*

Штамм: *C. eutrophus* В-10646

Данный штамм обладает широким органотрофным потенциалом и может использовать в качестве источников углерода различные вещества. *C. eutrophus* В-10646 устойчив к концентрациям 3-5 г/л в культуральной среде следующих органических субстратов: валериановая кислота, гексановая кислота, γ бутиролактон – и способен использовать их для синтеза сополимеров ПГА, содержащих коротко- и среднецепочечные мономеры [6].

2.2 Культивирование бактерий. Методы измерения параметров культивирования

Бактерий выращивали в жидкой питательной среде – минеральной среде Шлегеля, состоящая из $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,0; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, NH_4Cl – 1 (г/л). Микроэлементы вводятся по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08;

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,050; NiCl_2 – 0,008 (г/л). В качестве основного источника углерода использовали фруктозу (ЕС) в концентрации 10 – 12 г/л. По ходу роста культуры и исчерпания субстрата делали добавки субстрата в культуру в концентрации, аналогичной исходной. Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,5 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30°C и 200 об/мин. Время культивирования составляло 72 ч.

На протяжении культивирования периодически отбирались пробы для анализа.

Оптическую плотность культуры определяли на спектрофотометре UNICO-2100 при $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм); для измерения оптической плотности к культуре бактерий добавляли дистиллированную водой в соотношении 1:5.

Концентрацию фруктозы определяли, используя резорциновый метод [Ермаков с соавт., 1972]. Для проведения анализа отбирали 2 мл культуральной жидкости, центрифугировали (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). 0,5 мл супернатанта доводили дистиллированной водой до 25 мл. Далее, 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 вместо разведения супернатанта использовали дистиллированную воду. Пробирки выдерживали на водяной бане 20 минут при $t=80$ °С, охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волны в 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы определяли по калибровочному графику.

Для определения урожая биомассы использовали весовой метод. Для этого 20 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 10 мин при 6000 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R,

«Eppendorf», Германия). Данную процедуру повторяли дважды. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы. Бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 105 °С 24 ч. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Вес биомассы проб определяли как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

2.3 Определение процентного содержания полимера методом газожидкостной хроматографии с МС-детектором

Проводили метанолиз сухой биомассы: к навеске 3,9-4,5 мг сухой биомассы добавляли 0,85 мл метанола, 1 мл внутреннего стандарта, содержащего 0,5 мг бензойной кислоты и 1 мл хлороформа, 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 на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890А с масс детектором Agilent Technologies 5975С («Agilent», США).

2.4 Определение молекулярных характеристик полимера

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера определяли с использованием гелепроникающей хроматографии (Agilent Technologies 1260 Infinity, США), используя полистироловые стандарты (Fluka, Швейцария, Германия). Определяли среднечисловую (М_ч) и средневесовую (М_в) молекулярные массы, полидисперсность (Д).

2.5 Выделение липидов цитоплазматической мембраны

Липиды цитоплазматической мембраны выделяли, пропуская смесь хлороформа с этанолом (2:1) через фильтр из сырой биомассы бактерий по методу Фолча. Экстрагировали в течение 12 часов. Экстракт, содержащий липиды и полимер, отделяли от биомассы фильтрованием. Растворитель удаляли, используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI), после чего пробы доводили до постоянного веса в эксикаторе. Вес липидного экстракта определяли весовым способом. После этого полимер отделяли от липидов. Полученный экстракт растворяли в 3 мл хлороформа и добавляли двойной объем гексана. Осадок, содержащий полимер, отделяли фильтрованием. Смесь растворителей удаляли используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI).

2.6 Экстрагирование липополисахаридов горячим феноло-водным методом

На 24, 48 и 72 часах культивирования отбирали пробы бактериальной суспензии по 50 мл для проведения экстракции липополисахаридов. Пробы центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 10 мин при 6000 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали; данную процедуру проводили дважды.

Для выделения липополисахаридов горячим фенолом 1–2 г. сырой биомассы помещали в 5 мл воды и суспензировали при температуре 68°C в течение 5 минут. После этого добавляли 5 мл 90%-ного водного раствора фенола и перемешивали 1 час при такой же температуре. Далее смесь охлаждали до 4°C и центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) при 4000 об/мин в течение 20 минут. В результате получили две фракции: водную и фенольную. Собирали водную фазу и диализировали водой

в диализных мешках (диаметр пор 6-8 кДа) на протяжении 24 часов. После этого полученный образец лиофилизировали [14].

2.7 Омыление экстрагированных липополисахаридов

Проводили омыление образцов экстрагированных липополисахаридов для подготовки к анализу жирнокислотного состава. Для этого 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 2 мл. После этого образцы помещали на водяную баню с обратным холодильником на два часа.

К омыленным пробам добавляли по 4 мл дистиллированной воды, подкисляли H_2SO_4 до кислой реакции pH, добавляли 1 мл гексана для экстракции жирных кислот. Пробы промывали, используя делительную воронку дважды. Гексан удаляли, на роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI). К пробам 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, пробы снимали с водяной бани и добавляли по 1 мл дистиллированной воды, промывали с использованием делительной воронки дистиллированной водой: пробы помещали в делительную воронку, добавляли 10-15 мл дистиллированной воды, нижний слой сливали, процедуру повторяли до достижения нейтральной реакции pH. Верхний слой, состоящий из гексана и метиловых эфиров жирных кислот пропускали через слой Na_2SO_4 . Из полученных проб испаряли гексан на роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI) [7].

2.8 Газо-жидкостная хроматография с массовой спектрометрией метиловых эфиров жирных кислот

Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) анализировали на хромато-масс-спектрометре Agilent 5975Inert («Agilent», США). Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий, скорость – 1 мл/мин; колонка HP-FFAP капиллярная длиной 30 м и диаметром 0,25 мм. Температура ввода пробы составляла 220 °С. Начальная температура хроматографирования - 120 °С затем подъем температуры со скоростью 5 °С/мин до 230 °С/мин. Запуск проб производили в режиме «split» с расщеплением потока 30:1. Хроматографировали 1 час. МЭЖК разделялись на колонке, сканировался их спектр в масс-спектрометрическом детекторе и записывалась их общая ионная интенсивность.

Полученные результаты хроматограммы МЭЖК анализировали, идентифицировали жирные кислоты путем сравнения их времен удерживания с таковыми имеющимися стандартами (в качестве стандарта использовались насыщенные моноеновые, диеновые, триеновые, тетра- и пентаеновые кислоты с длиной цепи от 10 до 20, а также β- гидроксикислоты («Serva», Германия и «Sigma», США)), определяли их процентное содержание.

2.9 Получение электронных изображений бактериальных клеток

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

[изъято 15 стр.]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы.

1. Культивирование штамма бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 на фруктозе позволяет достичь высоких выходов биомассы (7,8 г/л), а также высоких выходов поли(3-гидроксibuтирата) (до 91,2 % от веса сухой биомассы на 72 ч роста).

2. Жирнокислотный спектр липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов качественно отличается: циклопропановые жирные кислоты присутствуют только в составе липидов цитоплазматической мембраны, а гидроксикислоты имеют в своем составе только липополисахариды.

3. На протяжении культивирования клетки не изменяют свои размеры достоверно. Клеток с нарушенным делением становится больше к стационарной фазе. Количество гранул поли(3-гидроксibuтирата) сокращается более чем в два раза к концу культивирования.

Результаты проведенной работы доказывают, что фруктоза в качестве основного углеродного субстрата является перспективным субстратом как для получения биомассы клеток штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646, так и для получения высоких выходов целевого продукта – поли (3-гидроксibuтирата).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Багаева, Т. В., Никифоров, А. С. Стресс-индуцируемые изменения фосфолипидного состава цитоплазматических мембран сульфатредуцирующих бактерий / Т. В. Багаева, А. С. Никифоров, Е. Е. Зинурова // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2011. – Т. 153, № 2. – С. 139 – 146
2. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. – Новосибирск. – 2003. – 331 с.
3. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение : монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск : Красноярский писатель. – 2011. – 392 с
4. Волова, Т. Г. Синтез и исследование многокомпонентных полигидроксиалканатов / Т. Г. Волова, П. В. Миронов, А. Д. Васильев // Перспективные материалы. – 2006. – № 5. – С. 35-41
5. Волова, Т. Г. Физико-химические свойства одно-[поли(ЗГБ)], двух-[поли (ЗГБ/ЗГВ)], и трехкомпонентных [поли (ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ)] полигидроксиалканоатов / Т. Г. Волова [и др.] // Перспективные материалы. – 2004. – №. 3. – С. 42-48
6. Жила, Н. О., Волова, Т. Г. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* В-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н. О. Жила, Т. Г. Волова, Г. С. Калачева / Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. – 2014. – с. 161 – 173
7. И Калачева, Г. С. Синтез полиэфиров гидроксипроизводных жирных кислот (полигидроксиалконатов) и характеристика состава липидов сине-зеленых, светящихся и водородокисляющих прокариот : автореф. дис. ...док. биол. наук : 03.01.06 / Калачева Галина Сергеевна. – Красноярск, 2012. – 38 с.

8. Коротаяева, А. А., Самоходская, Л. М. Ингибирование воспалительных эффектов липополисахарида бактерий продуктами окисления липидов / А. А. Коротаяева, Л. М. Самоходская, В. Н. Бочков // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 65-71
9. Кудрякова, И. В. Биогенез везикул *Lisobacter sp.* XL1 : дисс. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / Кудрякова Ирина Валерьевна. – Пушкино, 2017. – 77 с.
10. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия : учебник / Ю. А. Овчинников // М.: Просвящение. – 1987. – 816 с.
11. 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.
12. Abeyrathne, P. D. Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide / P. D. Abeyrathne [etc]. // Journal of bacteriology. – 2005. – Т. 187, № 9. – С. 3002-3012
13. Akira, S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // Cell. – 2006. – Т. 124, № 4. – С. 783-801
14. 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. – С. 1530-1535
15. Anderson, A. J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A. J. Anderson, E. A. Dawes // Microbiological reviews. – 1990. – Т. 54, №. 4. – С. 450-472
16. Babinski, K. J. Accumulation of the lipid A precursor UDP-2, 3-diacylglucosamine in an *Escherichia coli* mutant lacking the lpxH gene / K. J. Babinski, S. J. Kanjilal, C. R. Raetz // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Т. 277, № 29. – С. 25947-25956

17. Brozek, K. A. Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A / K. A. Brozek [etc] // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – T. 264, №. 12. – C. 6956-6966
18. Buetow, L. Structure and reactivity of LpxD, the N-acyltransferase of lipid A biosynthesis / L. Buetow, T. K. [etc] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104, № 11. – C. 4321-4326
19. Cho, M. Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo / M. Cho [etc] // Biochemistry. – 2012. – T. 51, № 11. – C. 2276-2288
20. Crowell, D. N. Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli* / D. N. Crowell, M. S. Anderson, C. R. Raetz // Journal of bacteriology. – 1986. – T. 168, № 1. – C. 152-159
21. Darveau, R. P. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4 / R. P. Darveau [etc] // Infection and immunity. – 2004. – T. 72, № 9. – C. 5041-5051
22. Doerrler, W. T. MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli* / W. T. Doerrler, H. S. Gibbons, C. R. H. Raetz // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279, № 43. – C. 45102-45109.
23. Eggers, J. Poly (3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-Hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA / J. Eggers, A. Steinbüchela // Journal of bacteriology. – 2013. – T. 195, № 14. – C. 3213-3223
24. Ferguson, G. P. Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis / G. P. Ferguson // Molecular microbiology. – 2005. – T. 56, № 1. – C. 68-80

25. Galanos, C. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities / C. Galanos [etc] // The FEBS Journal. – 1985. – T. 148, № 1. – C. 1-5
26. Garrett, T. A. Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase. Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK / T. A. Garrett, J. L. Kadrmas, C. R. Raetz // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – T. 272, № 35. – C. 21855-21864
27. Girard, R. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via toll-like receptor 2 / R. Girard [etc] // Journal of cell science. – 2003. – T. 116, № 2. – C. 293-302
28. Goh, L. K. Enhancement of stress tolerance in the polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules / L. K. Goh, K. Purama, K. Sudesh // Applied biochemistry and biotechnology. – 2014. – T. 172, № 3. – C. 1585-1598
29. Heine, H. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydophila psittaci* 6BC / H. Heine [etc] // The FEBS Journal. – 2003. – T. 270, № 3. – C. 440-450
30. 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, T. 79, № 8. – C. 1369 – 1377
31. Kawasaki, K. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/ PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through toll-like receptor 4 / K. Kawasaki // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279, № 19. – C. 20044-20048
32. 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. – T. 178, № 7. – C. 2102-2107

33. Marsahll, P. A. Assessing compensation for loss of vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae* / P. A. Marsahll, N. Netzel, J. W. Guintchev // Canadian journal of microbiology. – 2012. – T. 58, № 2. – C. 132-144
34. Montminy, S. W. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response / S. W. Montminy // Nature immunology. – 2006. – T. 7, № 10. – C. 1066
35. Mravec, F. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy // F. Mravec [etc] // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – T. 363, № 10. – C. fnw094
36. Muller-Loennies, S. Structural analysis of deacylated lipopolysaccharide of *Escherichia coli* strains 2513 (R4 core-type) and F653 (R3 core-type) / S. Muller-Loennies, B. Lindner, H. Brade // The FEBS Journal. – 2002. – T. 269, № 23. – C. 5982-5991
37. Muller-Loennies, S. Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K-12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis / S. Muller-Loennies, B. Lindner, H. Brade // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278, № 36. – C. 34090-34101
38. Pfeiffer, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16 / D. Pfeiffer, D. Jendrossek // Microbiology. – 2011. – T. 157, № 10. – C. 2795-2807
39. Pfeiffer, D. Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16 / D. Pfeiffer, D. Jendrossek // Journal of Bacteriology. – 2012. – T. 194, № 21. – C. 5909-5921
40. Pfeiffer, D. PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha* / D. Pfeiffer, D. Jendrossek // Applied and environmental microbiology. – 2014. – T. 80, № 2. – C. 555-563

41. Poltorak, A. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene / A. Poltorak [etc] // *Science*. – 1998. – T. 282, № 5396. – C. 2085-2088
42. Raetz, C. R. H. Lipopolysaccharide endotoxins / C. R. H. Raetz, C. Whitfield // *Annual review of biochemistry*. – 2002. – T. 71, № 1. – C. 635-700
43. Rezania, S. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* / S. Rezania [etc] // *Avicenna journal of medical biotechnology*. – 2011. – T. 3, № 1. – C. 3-9
44. Rietschel, E. T. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function / E. T. Rietschel [etc] // *The FASEB Journal*. – 1994. – T. 8, № 2. – C. 217-225
45. Roncero, C. Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the rfa locus / C. Roncero, M. J. Casadaban // *Journal of bacteriology*. – 1992. – T. 174, № 10. – C. 3250-3260
46. Sandstrom, G. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS / G. Sandstrom, [etc] // *FEMS microbiology immunology*. – 1992. – T. 5, № 4. – C. 201-210
47. Schnaitman, C. A. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria / C. A. Schnaitman, J. D. Klena // *Microbiological reviews*. – 1993. – T. 57, № 3. – C. 655-682
48. Sperandio, P. Characterization of lptA and lptB, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli* / P. Sperandio [etc] // *Journal of bacteriology*. – 2007, T. 189. – № 1. – C. 244-253
49. Steinbüchel, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids / A. Steinbüchel, H. E. Valentin // *FEMS Microbiology letters*. – 1995. – T. 128, № 3. – C. 219-228
50. Steinbüchel, A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate

biosynthesis pathways as a successful example / A. Steinbüchel // *Macromolecular Bioscience*. – 2001. – T. 1, № 1. – C. 1-24

51. Stubbe, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase / J. A. Stubbe, J. Tian // *Natural product reports*. – 2003. – T. 20, № 5. – C. 445-457

52. Suda, Y. Chemical structure and biological activity of a lipid A component from *Helicobacter pylori* strain 206 / Y. Suda [etc] // *Journal of endotoxin research*. – 2001. – T. 7, № 2. – C. 95-104

53. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // *Progress in polymer science*. – 2000. – T. 25, № 10. – C. 1503-1555

54. Volova, T.G. Polyhydroxyalkanoates — plastic materials of the 21st century: production, properties, applications / T.G. Volova // Nova publishers. – USA. – 2004. – 283 p

55. Wahl, A. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha* / A. Wahl [etc] // *BMC Microbiology*. – 2012. – T. 12, № 1. – C. 262

56. Wang, X. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification / X. Wang, P. J. Quinn // *Progress in lipid research*. – 2010. – T. 49, № 2. – C. 97-107

57. Wang, X. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis subsp Novicida* / X. Wang [etc] // *Biochemistry*. – 2006. – T. 45, № 48. – C. 14427-14440

58. Wang, Y. Structure characterization of phospholipids and lipid A of *Pseudomonas putida* KT2442 / Y. Wang [etc] // *European journal of mass spectrometry*. – 2015. – T. 21, № 5. – C. 739-746

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


60. Whitfield, C. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length / C. Whitfield, P. A. Amor, R. Köplin // *Molecular microbiology*. – 1997. – T. 23, № 4. – С. 629-638

61. Wilkinson, S. G. Bacterial lipopolysaccharides – themes and variations / S. G. Wilkinson // *Progress in lipid research*. – 1996. – T. 35, № 3. – С. 283-343

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

«19» 06 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

«Влияние фруктозы в качестве основного С-субстрата на рост и синтез
запасных полигидроксиалканоев штаммом *Cupriavidus eutrophus* B-10646»

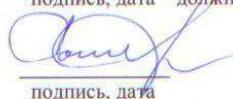
Научный руководитель


подпись, дата

к.б.н., доцент
должность, ученая степень

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

К. Ю. Сапожникова
инициалы, фамилия

Красноярск, 2018