

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН



2015 * № 3

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Ю.В. Захарова, А.С. Сухих, 2015

УДК 577:615.31

Ю.В. Захарова, А.С. Сухих

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК БИФИДОБАКТЕРИЙ С РАЗНОЙ ГИДРОФОБНОСТЬЮ

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово, Россия

Цель. Изучить состав жирных кислот бифидобактерий с разной гидрофобностью для установления механизмов нарушений адгезивной активности микроорганизмов.

Материалы и методы. Использовали культуры *Bifidobacterium bifidum*. Гидрофобность бифидобактерий оценивали по Rosenberg et al. с модификациями L-Q. Wang et al. [1]. Липидная фракция выделена из бульонной культуры бифидобактерий экстракцией смесью хлороформ : *n*-гексан (1:1). Полученный экстракт подвергали метилированию. Метилированные пробы анализировали на хроматомакс-спектрометре Agilent 7000В.

Результаты. У высокогидрофобных бифидобактерий обнаружили разветвленные жирные кислоты - изопентадекановую (*iso*C15:0) и метил-тетрадекановую (13Me-C14:0) кислоты. При средней гидрофобности установлено высокое содержание изопальмитиновой (*iso*C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. Низкогидрофобные штаммы *B. bifidum* характеризовались низким содержанием мононенасыщенных жирных кислот.

Заключение. Гидрофобность бифидобактерий определялась различным содержанием у них ненасыщенных и разветвленных жирных кислот.

Ключевые слова: бифидобактерии, ГХ-МС, жирные кислоты, гидрофобность.

J.V. Zakharova, A.S. Sukhikh

FATTY ACID BIFIDOBACTERIUM WITH DIFFERENT HYDROPHOBICITY

Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russia.

Objective. To study the composition of fatty acids of the membranes of bifidobacteria with different hydrophobicity to establishing mechanisms of the adhesive activity of microorganisms.

Materials and methods. The study used culture *Bifidobacterium bifidum*. The hydrophobicity of bifidobacteria was studied by Rosenberg et al. with modifications L-Q Wang et al. The lipid fraction extracted from the broth culture of bifidobacteria by extraction with a mixture of chloroform : *n*-hexane (1:1). The resulting extract was subjected to methylation. Methylated samples were analyzed on gas chromatography / mass spectrometer Agilent 7000В.

Results. Only high hydrophobicity bifidobacteria found isopentanol (*iso*C15:0) and methyl-tetradecanoyl (13Me-C14:0) acids. With the medium hydrophobicity of a high content isopalmitic (*iso*C16:0) and stearic (C18:0) acids is established. Low hydrophobicity strains *B. bifidum* are characterized by little content of monounsaturated fatty acids.

Conclusions. The hydrophobicity of bifidobacterium is determined by the different contents unsaturated and branched fatty acids.

Keywords: bifidobacterium, GC-MS, fatty acid, hydrophobicity.

Введение

Жирные кислоты у микроорганизмов являются не только структурным компонентом клеточной стенки, но они также определяют физико-химические свойства клетки, такие как текучесть, устойчивость к температурам, гидрофобность [1, 2]. Ферменты синтеза жирных кислот локализованы у бактерий между цитоплазмой и внутренней стороной плазматической мембраны. Их активность определяется внешними факторами, что обуславливает различие в путях синтеза жирных кислот [2], и из-за чего меняется относительное содержание различных жирных кислот, длина их цепей, насыщенность. Известно, что у анаэробных бактерий предшественником ненасыщенных жирных кислот (C 16:1, C18:1) служит C₁₀-ацилпереносящий белок (C₁₀-АПБ), а стимулируют их образование понижение температуры и уменьшение содержания кислорода (анаэробный путь синтеза). Кроме этого существует аэробный путь синтеза ненасыщенных жирных кислот из насыщенных. Он характерен для аэробных грамположительных бактерий. У некоторых грамположительных бактерий помимо неразветвленных насыщенных жирных кислот присутствуют изо-, антеизо- и ω -алициклические жирные кислоты, которые придают текучесть мембране. Их синтез отличается от синтеза жирных кислот с неразветвленной цепью только использованием различных ацил-АПБ в качестве затравки для удлинения цепи и специфичностью ферментов, катализирующих конденсацию молекул. Предшественниками таких модифицированных затравок служат разветвленные 2-оксикислоты, экзогенные разветвленные короткоцепочечные карбоновые кислоты [2]. В связи с этим нельзя исключить, что любые изменения в микросимбиозе будут обуславливать различия в путях синтеза жирных кислот у бактерий и приводить к изменению поверхностных свойств микроорганизмов. Вариативность физико-химических свойств клеточных стенок микроорганизмов ведет, в свою очередь, к изменению способности бактерий колонизировать какой-либо биотоп и сорбировать на своей поверхности белки [3].

Известно более двухсот пятидесяти бактериальных жирных кислот, тогда как у человека их в 10 раз меньше. С помощью газовой хроматографии изучен состав жирных кислот большинства микроорганизмов, определены маркеры отдельных родов и видов бактерий, то есть исследование жирнокислотного состава бактериальных липидов осуществляют с целью идентификации и таксономии микроорганизмов, а также для диагностики инфекций

и дисбиотических нарушений непосредственно по клиническому материалу [4]. При этом недостаточно изучены вопросы влияния структуры и состава жирных кислот на биологические свойства микроорганизмов, от которых зависит стабильность микросимбиоза, а также длительность и глубина микроэкологических нарушений. Поэтому актуальным является исследование жирнокислотного состава клеточных стенок бактерий при различной гидрофобности, что позволит уточнить некоторые механизмы колонизации слизистых оболочек доминантными микросимбионтами и генез микроэкологических нарушений.

Цель исследования – изучить состав жирных кислот бифидобактерий с разной гидрофобностью для установления механизмов нарушений адгезивной активности микроорганизмов.

Материалы и методы

Объектом исследования были культуры *Bifidobacterium bifidum*, выделенные из кишечника здоровых детей. Выделение бифидобактерий проводили рутинным бактериологическим методом. Для создания анаэробных условий применяли анаэростат (BBL, США) и газогенерирующие пакеты (НПО «Новое дело», Санкт-Петербург). Идентификацию бактерий осуществляли на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств. Последние изучали с использованием коммерческих тест-систем ANAERO-TEST 23 (Lachema, Чехия). Гидрофобность бифидобактерий оценивали по Rosenberg et al. с модификациями L-Q Wang et al. [1]. Для этого бифидобактерии выращивали 24 часа на жидкой Бифидум-среде (г. Оболенск), а затем центрифугировали при 8 000 g в течение 10 мин. Бактериальную массу дважды отмывали фосфатным буфером и ресуспендировали в том же растворе. Определяли оптическую плотность (A) раствора при длине волны 600 нм. Затем к 3 мл бактериальной суспензии добавляли 1 мл додекана. Фазы перемешивали на Vortex в течение 2 минут и оставляли на 1 час при температуре 37⁰С для их разделения. Определяли оптическую плотность (A) водной фазы при 600 нм. Аффинитет к углеводам рассчитывали как процент гидрофобности (H%) по формуле $H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, где A₀ и A – оптическая плотность до и после обработки бактериальной суспензии додеканом. Штаммы считали высокогидрофобными при H=60% и более, среднегидрофобными при H=40-59%, низкогидрофобными при H≤39%.

Высокоэффективную хроматографию (ВЭЖХ) осуществляли на хроматографе Цвет Яуза–04 с амперометрическим детектором (НПО «Химавтоматика»); материал рабочего электрода – стеклоуглерод; колонка Gemini C18 (5 мкм, 4,6 x 250 мм (Phenomenex, США). Предколонка Analytical Guard (KJO – 4282) Gemini C18 (Phenomenex, США). Объем петли 20 мкл. Скорость потока 1, давление 57 ± 1 bar. Управление прибором и обработка полученных данных осуществлялась с использованием программного обеспечения МультиХром, версия 3.1.1550.

Состав бактериальных липидов определяли с помощью газожидкостной хроматографии. Липидная фракция выделена из отмытой изотоническим раствором NaCl бульонной культуры бифидобактерий. Избирательную солиubilизацию гидрофобных поверхностных слоев клеточной стенки *B. bifidum* осуществляли смесью хлороформ : гексан (1:1). Полученный экстракт подвергали метилированию. Образец объемом 1 мл помещали в вialу объемом 1,5 мл, растворитель отдували азотом досуха. К сухому остатку добавляли 500 мкл 3% раствора H₂SO₄ в MeOH. К полученному раствору добавляли внутренний стандарт (10 мкг ундеценовой кислоты). Затем образец нагревали при 90⁰С в течение часа. Далее проводили экстракцию 700 мкл гексана. Объем отобранной гексановой фракции концентрировали отдувкой растворителя до объема 200 мкл. Полученные пробы, содержащие жирные кислоты в виде метиловых эфиров, использовали для анализа. Метилированные пробы анализировали на хроматомасс-спектрометре Agilent 7000B; объем пробы 2 мкл, ввод без деления потока. Колонка: ZB-WAX, 30м*0.25мм*0.25мкм, Условия хроматографирования: Oven Program 50⁰С for 0 min then 8⁰С/мин to 260⁰С-5мин, Flow-1мл/мин.

Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica (версия 6.1 лицензионное соглашение VXXR 006BO92218 FAN 11). Статистическая обработка информации строилась с учетом характера распределения данных, которое определяли с помощью построения гистограмм. Если закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, достоверность различий в парных независимых совокупностях определяли с помощью критерия Манна-Уитни. В случае совпадения распределения показателей с нормальным достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Относительно недавно у *Bifidobacterium bifidum* был обнаружен поверхностный липопротеин Вор А, который является видоспецифичным и участвует в адгезии на эпителиальных клетках кишечника [5, 6]. Для его выделения была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Следует отметить, что метод ВЭЖХ следует рассматривать как хроматографический метод, позволяющий эффективно разделять сорбаты в нативном состоянии. Данное свойство особенно актуально при разделении и анализе веществ биологического происхождения. Используемый в нашем исследовании обращённо-фазовый вариант ВЭЖХ с амперометрическим детектированием, позволяет селективно определять молекулы веществ, которые проявляют свойства восстановителей. Существенным достоинством данного детектора является высокая чувствительность, что позволяет визуализировать вещества в концентрации менее 0,5 пмоль (10^{-12}) [7, 8]. Использование изократического режима элюирования на обращенно-фазовом сорбенте позволяет осуществить разделение липидов одного класса, отличающихся числом атомов углерода в жирной цепи.

Липопротеиновый комплекс, выходящий из колонки около 5,15 мин, определяется у всех анализируемых штаммов бифидобактерий. Липиды характеризуются преобладанием жирных кислот с максимальной степенью насыщенности алкильных остатков.

При этом наибольшее число липидов, содержащих насыщенные жирные кислоты, обнаружено у среднегидрофобного штамма бактерий (рис. 1).

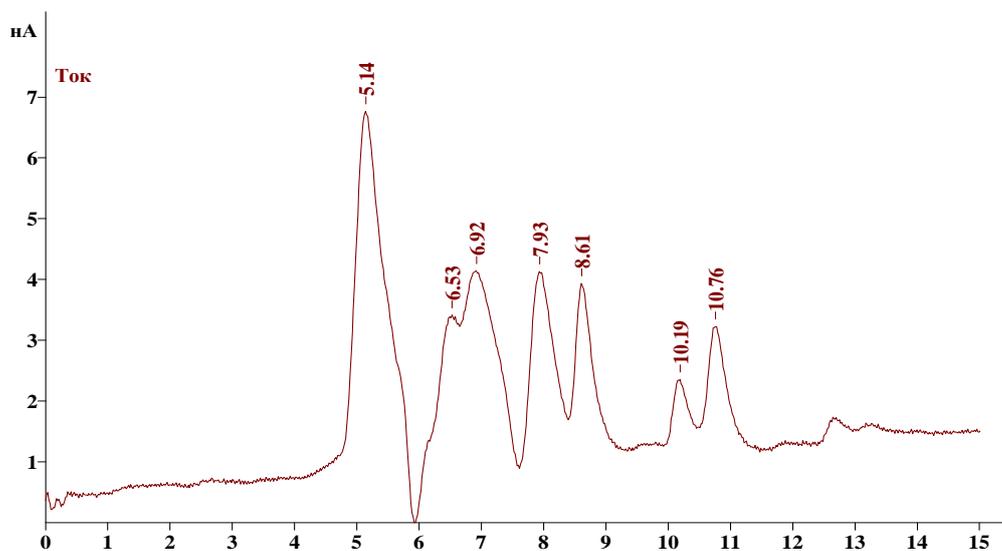


Рис. 1. Хроматограмма липопротеинов среднегидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ-АД.

Их количество обозначено суммарным откликом детектора 239,3 нА*сек, тогда как у высокогидрофобных бифидобактерий данный показатель соответствует 25,7 нА*сек.

Высокая гидрофобность последних связана с компонентом, время удерживания которого составляет 13,38 мин, а отклик детектора - 31,05 нА*сек (рис. 2).

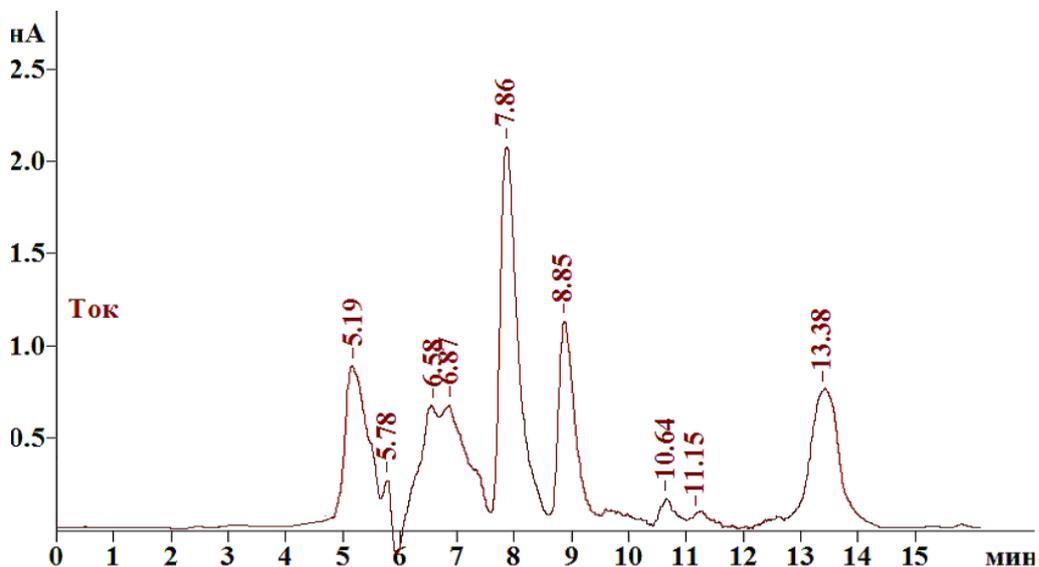


Рис. 2. Хроматограмма липопротеинов высокогидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ-АД.

Данный компонент не фиксируется у низкогидрофобного штамма. Более того, низкогидрофобный штамм *B. bifidum* характеризуется низкой селективностью разделяемых компонентов (рис. 3), что, видимо, связано с низким содержанием в структуре мембраны у данного штамма гидрофобных компонентов, в первую очередь омыляемых жиров и их производных.

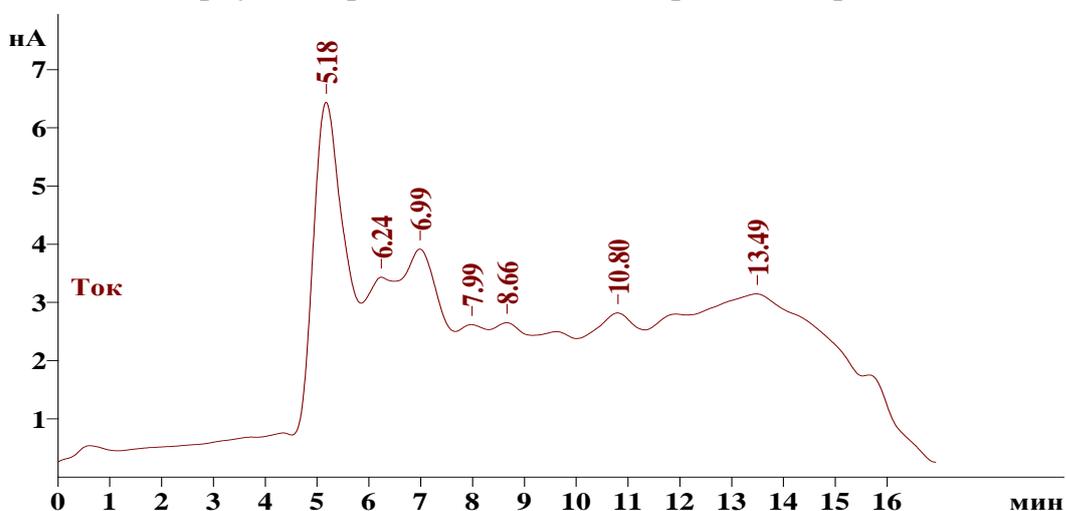


Рис. 3. Хроматограмма липопротеинов низкогидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ-АД.

Особенности структуры и компонентного состава липидов поверхностного липопротеина бифидобактерий изучали с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. В результате проведенных исследований установлено, что масса жирных кислот на 0,01 г сухого остатка у штаммов бактерий с высокой и средней гидрофобностью статистически не отличалась и составляла 30,4 и 33,6 мкг соответственно ($p=0,2$). Тогда как у бифидобактерий с низкой гидрофобностью масса жирных кислот была снижена в 2 раза (до 14,5 мг, $p=0,03$).

Не зависимо от гидрофобности в составе клеточной стенки бифидобактерий преобладали насыщенные жирные кислоты. У высоко и низкогидрофобных штаммов на долю насыщенных жирных кислот приходилось 64,2 и 71,3% соответственно, тогда как при средней гидрофобности бактерий доля этих кислот была наибольшей и составляла 91,1%.

Среди насыщенных жирных кислот у бифидобактерий были обнаружены следующие: лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), пальмитиновая (C16:0), гептадекановая (C17:0), стеариновая (C18:0), арахидиновая (эйкозановая) (C20:0) кислоты. Также среди них присутствовали метилированные кислоты или кислоты с разветвленной цепочкой: 12-метилтетрадекановая (12Me-C14:0), 13-метил-тетрадекановая (13Me-C14:0), изо-пентадекановая (*iso*C15:0), изо-пальмитиновая (*iso*C16:0). Разветвленные или алициклические жирные кислоты, благодаря особенностям химического строения, у грамположительных бактерий выполняют адаптивную функцию, придавая текучесть и пластичность мембране [4]. Такая же функция присуща и ненасыщенным жирным кислотам, наибольшая доля которых обнаружена у бифидобактерий с высокогидрофобными свойствами (35,8%), несколько меньше у штаммов с низкой гидрофобностью (28,7%). Самое низкое содержание ненасыщенных жирных кислот регистрировали при средней гидрофобности, их доля в общей структуре жирных кислот не превышала 8,9%.

Среди мононенасыщенных жирных кислот у бифидобактерий присутствовали миристоолеиновая (C14:1), пентадеценивая (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1), *n*-гептадеценивая (C17:1), олеиновая (C18:1). Также были обнаружены полиненасыщенные жирные кислоты: гексадекадиеновая (C16:2) и линолевоваевая (C18:2).

Количественный состав некоторых жирных кислот бифидобактерий с разной гидрофобностью не отличался друг от друга. Так, содержание мири-

стиновой кислоты (C14:0) у высоко- и низкогидрофобных штаммов составляло 2,7 и 2,9 мкг соответственно, тогда как при средней гидрофобности не превышало 1,6 мкг, однако, разница была статистически не значима ($p=0,1$). Также у штаммов с разной гидрофобностью не было статистически значимых отличий по содержанию пентадекановой (C15:0) и гептадекановой кислот (C17:0), количество которых составило у высокогидрофобных культур по 0,7 мкг, у среднегидрофобных по 0,9 и 0,5 мкг и низкогидрофобных 1,1 и 0,4 мкг соответственно ($p=0,07$).

При анализе количества насыщенных жирных кислот у штаммов бифидобактерий с разной гидрофобностью отмечали статистически значимые различия по содержанию изоформ, метилированных и длинноцепочечных жирных кислот, то есть тех форм, которые определяют жидкокристаллическое состояние мембраны ($p=0,00$). Установлено, что изопентадекановая кислота (isoC15:0) присутствовала только у высокогидрофобных бифидобактерий: у них же в большом количестве регистрировали 13-метил-тетрадекановую кислоту (13Me-C14:0), ее содержание составило 1,3 мкг (рис. 4).

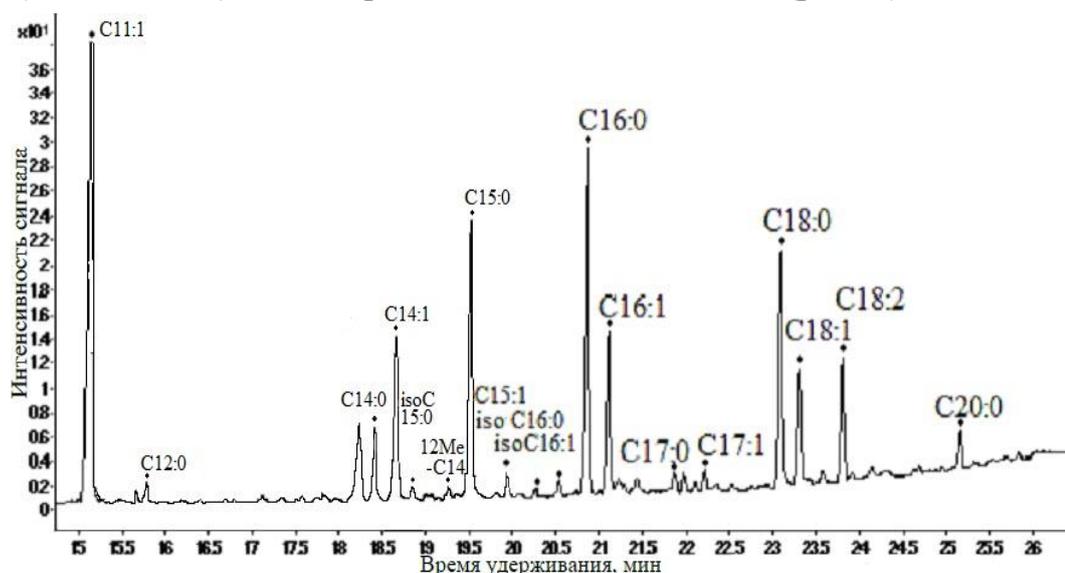


Рис. 4. Интегрированная хроматограмма ГХ-МС жирных кислот высокогидрофобного штамма бифидобактерий.

У культур со средней гидрофобностью такую кислоту не детектировали, а при низкой гидрофобности отмечали небольшое ее содержание – 0,1 мкг. У среднегидрофобных бифидобактерий также отсутствовали 12-метил-тетрадекановая (12Me-C14:0) и пальмитиновая (C16:0) кислоты, содержание которых у высоко- и низкогидрофобных штаммов колебалось в диапазоне 0,3-0,4 и 11,4-12,5 мкг соответственно. Жидкокристаллическое состояние

мембраны у среднегидрофобных бифидобактерий было связано с высоким содержанием изопальмитиновой (*iso*C16:0) (20,4 мкг) и стеариновой (C18:0) (23,6 мкг) кислот.

В составе мембраны среднегидрофобных бифидобактерий отсутствовали такие мононенасыщенные жирные кислоты, как миристоолеиновая (C14:1), пентадеценовая (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1) и н-гептадеценовая (C17:1), но была обнаружена только олеиновая (C18:1) кислота в количестве 1,4 мкг (рис. 5).

При высокой и низкой гидрофобности бактерий количество изопальмитиновой (*iso*C16:0) кислоты не превышало 0,3 и 0,4 мкг соответственно, а масса стеариновой кислоты (C18:0) составляла 8,0 и 7,2 мкг соответственно.

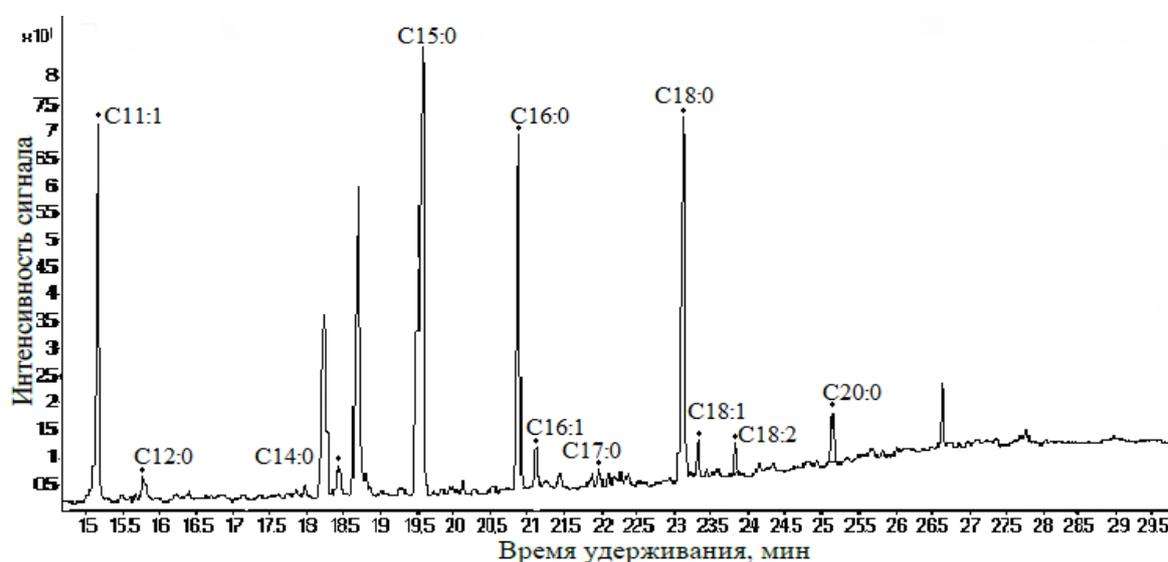


Рис. 5. Интегрированная хроматограмма ГХ-МС жирных кислот среднегидрофобного штамма бифидобактерий.

При высокой гидрофобности бактерий в мембране регистрировали все вышеуказанные ненасыщенные жирные кислоты (рис. 4). Самое большое количество приходилось на пальмитолеиновую (C16:1) кислоту, ее масса составила 4,6 мкг. Данная кислота в наибольшем количестве из ненасыщенных присутствует в составе мембран бактерий многих таксономических групп, то есть полученные данные согласуются с данными литературы [4]. Также довольно часто у микроорганизмов обнаруживают олеиновую (C18:1) кислоту, содержание которой у высокогидрофобных бифидобактерий составило 3,8 мкг. Несколько меньше в составе мембраны содержалось миристоолеиновой (C14:1) (2,7 мкг) и гептадеценовой (C17:1) (0,5 мкг) кислот, а пентадеценовая кислота (C15:1) у высокогидрофобных штаммов регистрировалась в количе-

стве не более 0,1 мкг.

Установлено, что у бифидобактерий с низкой гидрофобностью содержание всех жирных кислот было снижено по сравнению с высокогидрофобными культурами (рис. 6). При этом из мононенасыщенных кислот также в наибольшем количестве содержалась пальмитолеиновая (C16:1) (3,7 мкг) и олеиновая (C18:1) (3,2 мкг) кислоты.

Миристоолеиновая (C14:1) кислота содержалась в количестве 0,6 мкг. Наименьшей была масса пентадеценовой (C15:1) и гептадеценовой (C17:1) кислот, она составила по 0,4 мкг.

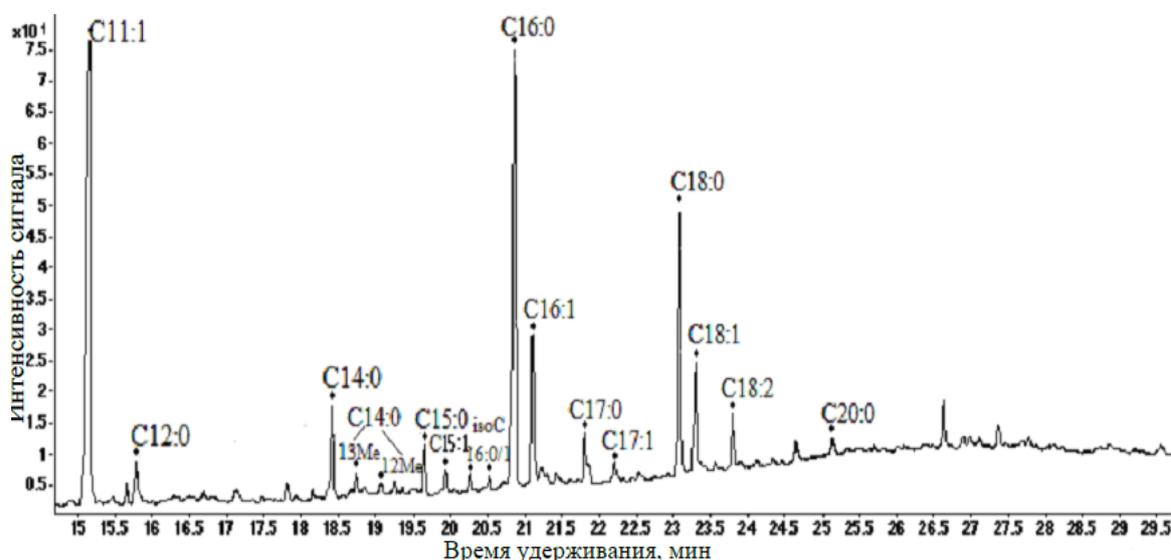


Рис. 6. Интегрированная хроматограмма ГХ-МС жирных кислот низкогидрофобного штамма бифидобактерий.

Полиненасыщенная линолевая (C18:2) кислота присутствовала в составе липидов всех изученных штаммов бифидобактерий. Максимальное ее количество регистрировалось при высокой гидрофобности бактерий и составляло 3,6 мкг; в 2 раза меньше ее содержалось у среднегидрофобных культур бифидобактерий (1,8 мкг); минимальное содержание данной кислоты обнаружено у низкогидрофобных штаммов (1,3 мкг).

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что в целом количество жирных кислот было снижено у низкогидрофобных штаммов ($p=0,03$). Как и у большинства микроорганизмов, у бифидобактерий в мембранах содержались как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи от 14 до 20 атомов углерода.

Известно, что присутствие у бактерий ненасыщенных и разветвленных жирных кислот увеличивает текучесть мембраны микроорганизмов и способствует повышению адгезии [1, 4]. Действительно, полученные данные свидетельствуют, что у высокогидрофобных бифидобактерий отмечается повышенное содержание и разнообразие ненасыщенных жирных кислот с одной или двумя двойными связями. Кроме того при высокой гидрофобности у бифидобактерий обнаружены разветвленные жирные кислоты – изопентадекановая кислота (*isoC15:0*) и 13-метил-тетрадекановая кислота (13Me-C14:0). У штаммов бактерий со средней гидрофобностью из ненасыщенных присутствовали только олеиновая (C18:1) и линолевая (C18:2) кислоты в небольших количествах. Гидрофобность среднего уровня у штаммов бифидобактерий была связана с изопальмитиновой (*isoC16:0*) кислотой, содержание которой было в 20 раз больше, чем у штаммов с высокой гидрофобностью. При низкой гидрофобности бактерий жидкокристаллическое состояние мембраны определяли ненасыщенные жирные кислоты, содержание которых было снижено, по сравнению с высокогидрофобными культурами. При этом отмечали сходство состава ненасыщенных жирных кислот при низкой и высокой гидрофобности, однако у штаммов бифидобактерий с низкой гидрофобностью в клеточной стенке отсутствовали метилразветвленные жирные кислоты.

Таким образом, в основе механизма изменения поверхностных свойств бактериальных клеток лежат вариации путей синтеза ненасыщенных и разветвленных жирных кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang L-Q., Meng X-Ch., Zhang B-R. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010. 26: 1999–2007.
2. Schneiter R., Toulmay A. The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 73: 1224-1232.
3. Бухарин О.В., Сгибнев А.В., Черкасов С.В. Активные формы кислорода как фактор, регулирующий поверхностные свойства бактерий. 2008. 4: 3-6.
4. Будников Г.К. Химический анализ в медицинской диагностике. Москва: Наука, 2010. 504 с.
5. Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. 15 (74): 4695–4702.
6. Gleinser M, Grimm V, Zhurina D et al. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein Bop A. *Microbial Cell Factories*. 2012. 11 (80): 1-14.
7. Korytowski W., Girotti A. W. Lipid hydroperoxide analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography with mercury cathode electrochemical detection. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Springer, 1995: 165-183.

8. Yashin Ya. I., Yashin A. Ya. Analytical potentialities of amperometric detection in HPLC. *J. Analytical Chemistry*. 2003. 58 (7): 649-649.

Поступила 3.09.2015

(Контактная информация: Захарова Юлия Викторовна – к.м.н., доцент кафедры микробиологии иммунологии и вирусологии Кемеровской государственной медицинской академии; адрес: 650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22А, кафедра микробиологии, иммунологии и вирусологии; тел. (3842) 73-28-71; E-mail: yvz@bk.ru).

LITERATURA

1. Wang L-Q., Meng X-Ch., Zhang B-R. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010. 26: 1999-2007.
2. Schneiter R., Toulmay A. The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 73: 1224-1232.
3. Buharin O.V., Sgibnev A.V., Cherkasov S.V. Aktivnye formy kisloroda kak faktor, regulirujushhij poverhnostnye svojstva bakterij. 2008. 4: 3-6.
4. Budnikov G.K. Himicheskij analiz v medicinskoj diagnostike. Moskva: Nauka, 2010. 504 s.
5. Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. 15 (74): 4695-4702.
6. Gleinser M, Grimm V, Zhurina D et al. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein Bop A. *Microbial Cell Factories*. 2012. 11 (80): 1-14.
7. Korytowski W., Girotti A. W. Lipid hydroperoxide analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography with mercury cathode electrochemical detection. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Springer, 1995: 165-183.
8. Yashin Ya. I., Yashin A. Ya. Analytical potentialities of amperometric detection in HPLC. *J. Analytical Chemistry*. 2003. 58 (7): 649-649.

Образец ссылки на статью:

Захарова Ю.В., Сухих А.С. Жирные кислоты клеточных стенок бифидобактерий с разной гидрофобностью. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2015. 3: 1-12 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/ZJV-SAS-2015-3.pdf>).