

На правах рукописи



Сапожникова Кристина Юрьевна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ
НА ЖИРОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТАХ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» – обособленном подразделении Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук.

Научный руководитель: **Жила Наталья Олеговна**
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Скиба Екатерина Анатольевна,**
доктор технических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук, г. Бийск,
ведущий научный сотрудник лаборатории биоконверсии

Ольхов Анатолий Александрович,
доктор химических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Российский экономический
университет имени Г.В. Плеханова», г. Москва, ведущий научный
сотрудник лаборатории «Перспективные композиционные
материалы и технологии», профессор базовой кафедры химии
инновационных материалов и технологий

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Южный федеральный
университет» (ФГАОУ ВО «ЮФУ»), г. Ростов-на-Дону

Защита диссертации состоится «10» февраля 2026 года в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <https://www.ibp.ru/diser/diser.php>

Автореферат разослан «___» декабря 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Биотехнологические процессы позволяют получать огромный спектр продуктов для жизнедеятельности человека. Разнообразие микроорганизмов, используемых в этих процессах, а также их широкий органотрофный потенциал, позволяют использовать большой спектр соединений в качестве источника углерода для роста продуцентов, включая отходы различного происхождения. Это значимо с экологической точки зрения, поскольку соответствует современным тенденциям перехода от линейной экономики к экономике замкнутого цикла. Одними из актуальных и социально значимых продуктов биотехнологии являются полигидроксиалканоаты (ПГА). ПГА – это семейство биосовместимых и биоразлагаемых полимеров различного состава, которые могут быть получены из возобновляемых ресурсов. ПГА, благодаря их физико-химическим свойствам, рассматриваются в качестве альтернативы синтетическим пластикам и вносят вклад в поэтапную замену традиционных пластиков биополимерами, и поэтому находят применение в различных отраслях – от расходных материалов до медицинской сферы (Behera et al., 2022).

Ключевая проблема биотехнологии ПГА – высокая стоимость производства этих полимеров. Синтез ПГА – это дорогостоящий процесс, где большая часть затрат (до 45-50%) приходится на источник углеродного питания для продуцентов. Это делает поиск более дешёвых субстратов актуальным направлением исследований. С недавних пор в качестве углеродного субстрата для синтеза ПГА стали рассматриваться жиросодержащие источники углерода. Известно, что ежегодно генерируется порядка 29 млн т низкосортного жиросодержащего сырья (непосредственно жиры различного происхождения, отработанные кулинарные жиры, жиросодержащие отходы и пр.) (Anitha et al., 2021; Gutschmann et al., 2023; Khatami et al., 2021; Loan et al., 2022; Sangkharak et al., 2021; Thuoc et al., 2019). Особенностью использования такого типа субстрата является нерастворимость в питательных средах, что снижает его доступность для продуцентов. Это требует использования микроорганизмов, обладающих высокой липолитической активностью, а также специализированных условий их культивирования. К настоящему времени информация об использовании жиросодержащих субстратов для синтеза ПГА крайне ограничена, что и определило цель настоящего исследования.

Цель работы – исследование потенциальной возможности и специфики биотехнологического синтеза полигидроксиалканоатов, их состава и физико-химических свойств при использовании жиросодержащих углеродных субстратов различного происхождения, включая отходы.

Задачи исследования:

1. Исследовать рост природного штамма *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полигидроксиалканоатов при использовании в качестве углеродного субстрата жирных кислот, растительных масел, низкосортных животных жиров и жировых отходов рыбопереработки.
2. Оценить потенциал жиросодержащих углеродных субстратов для биосинтеза сополимерных полигидроксиалканоатов.
3. Изучить влияние исследованных жиросодержащих субстратов различного происхождения на состав и свойства синтезируемых полимеров.

Научная новизна. Впервые показана способность природного штамма *C. necator* B-10646 к росту на жиросодержащих углеродных субстратах различного происхождения и состава, в том числе на жировых отходах рыбопереработки. Впервые продемонстрирована пригодность использования этих источников углерода для биосинтеза ПГА исследованным штаммом, что сопоставимо с аналогичным процессом при использовании сахаров. Установлено, что жиросодержащие углеродные субстраты, включая отходы рыбопереработки, позволяют получать сополимерные ПГА с макровключениями 3-гидроксивалерата и 4-гидроксипутирата, характеризующиеся пониженной степенью

кристалличности, что облегчает переработку этих полимеров в изделия и улучшает потребительские свойства полученных из них продуктов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость заключается в определении закономерностей синтеза ПГА на жиросодержащих субстратах различного происхождения, включая отходы, и обосновании возможности использования этого класса источников углерода в процессах биотехнологического синтеза биополимеров. Практическая значимость работы связана с разработкой и реализацией биотехнологии производства востребованных целевых продуктов – разрушаемых биопластиков. Микробиологический синтез ПГА обеспечивается при использовании в качестве углеродного субстрата жиросодержащего сырья, в частности, отходов рыбопереработки. Это позволяет снизить экономические затраты на синтез ПГА разного мономерного состава и свойств. Показано, что жиросодержащие углеродные субстраты (в том числе жировые отходы рыбоперерабатывающей промышленности) обеспечивают выходы биомассы и ПГА, сопоставимые с аналогичными показателями при использовании сахаров.

Положения, выносимые на защиту.

1. Жиросодержащие субстраты растительного и животного происхождения, включая отходы, – новый источник углерода для синтеза полигидроксиалканоатов с эффективным усвоением субстрата.
2. Выявленные условия и реализованные процессы синтеза сополимерных полигидроксиалканоатов на жиросодержащих субстратах с макровключениями мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксипутирата.
3. Тип жиросодержащих углеродных субстратов влияет на состав мономеров и физико-химические свойства полигидроксиалканоатов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность диссертационной работы подтверждается большим массивом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования, их повторяемостью и воспроизводимостью в независимых экспериментах.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на научных конференциях различного уровня: XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «ПРОСПЕКТ СВОБОДНЫЙ – 2021», Красноярск, 2021; IV Международная научная конференция «Наука будущего» и VI Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего-наука молодых», Москва, 2021; IV-я Международная научная конференция «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», Красноярск, 2021; International Online Conference on Macromolecules: Synthesis, Morphology, Processing, Structure, Properties and Applications (ICM 2021), Kottayam, Kerala, India; XXIV Междисциплинарная конференция молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXIV), Красноярск, 2021; Молодежная международная научная конференция «Современные тенденции развития функциональных материалов», Сириус, 2022; XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив Свободный – 2023», Красноярск, 2023; International Hybrid Conference on Nano Structured Materials and Polymers (ICNP 2023) at Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, India, 2023; XIV International Conference biomaterials and nanobiomaterials «BIONANOTOX 2023», Greece, Crete, 2023; IV Международная научно-практическая конференция «Экосистемы без границ 2023», Калининград, 2023; XXXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 2024; XV International Conference biomaterials and nanobiomaterials «BIONANOTOX 2024», Greece, Crete, 2024; IV Международный биотехнологический форум «BIO Asia Altai 2024», Барнаул, 2024; Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии», Казань, 2025.

Работа выполнена по плановой тематике Института биофизики СО РАН, в рамках реализации государственного задания Министерства науки и образования РФ «Фундаментальное обоснование, разработка и реализация эффективных биопроцессов получения функциональных биоматериалов, композитов и изделий на их основе для различных областей применения» (номер госрегистрации 121101300069-8), и поддержана междисциплинарным грантом Российского научного фонда № 23-64-10007 «Биотехнологический синтез белка одноклеточных и разрушаемых биопластиков с использованием в качестве нового углеродного субстрата жиросодержащих отходов технологий рыбопереработки: фундаментальное обоснование и реализация».

Публикации. По результатам исследований опубликовано 25 работ, включая 10 статей, входящих в международные цитатно-аналитические базы Scopus и Web of Science, ВАК, Белый список, а также 1 патент РФ, 14 тезисов в материалах конференций.

Личный вклад состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы: формулирование цели и задач исследования, выбор методов исследования, проведение экспериментов с последующим обобщением и анализом полученных результатов, подготовка публикаций и презентаций докладов.

Достоверность результатов подтверждается большим массивом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования, их повторяемостью и воспроизводимостью в независимых экспериментах.

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Работа изложена на 113 страницах, содержит 32 рисунка и 15 таблиц. Библиография включает 184 источника, из них 5 отечественных и 179 иностранных.

Результаты исследований диссертационной работы соответствуют пп. 2, 3, 26 паспорта специальности **1.5.6. Биотехнология.**

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы исследований, изложены цели и задачи работы, показана научная новизна и практическая значимость результатов, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Глава 1 содержит аналитический обзор литературы, характеризующий микробные ПГА как объект исследования и ценный продукт биотехнологии. В нем дано представление о микроорганизмах – продуцентах ПГА, субстратах и свойствах полимеров, областях применения; обоснованы актуальность и цель исследования.

Глава 2 описывает материалы и методы исследования. В качестве продуцента ПГА исследован природный штамм *Cupriavidus necator* В-10646 из коллекции лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза ИБФ СО РАН, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Бактерии культивировали в колбах объемом 0,5-1,0 л с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 (New Brunswick Scientific, США) на модифицированной среде Шлегеля (Schlegel et al., 1961), содержащей в качестве источника углерода жирные субстраты различного происхождения. Исследованы растительные масла – пальмовое, рыжиковое и подсолнечное; насыщенные жирные кислоты – лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая и мононенасыщенная олеиновая кислота; жиры, извлеченные из отходов *Sprattus sprattus balticus* (килька балтийская), *Scomber scombrus* (скумбрия атлантическая), *Sander lucioperca* (судак обыкновенный); низкосортные животные жиры, выделенные из нутряного жира домашних животных – бараний жир (*Ovis aries*), говяжий жир (*Bos taurus*), свиной жир (*Sus domesticus*). Жирнокислотный состав субстратов определяли с использованием газовой хроматографии после получения метиловых эфиров жирных кислот. Для синтеза сополимерных ПГА в состав среды дополнительно вносили прекурсоры целевых мономеров:

валерат калия ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOK}$), γ -валеролактон, ε -капролактон, 3-меркаптопропионовую кислоту.

Синтез ПГА реализован в двухстадийном периодическом режиме с лимитированием роста бактерий по азоту (Волова и др., 1992). Определяли урожай биомассы клеток в культуре (X , г/л), внутриклеточную концентрацию ПГА (в % к абсолютно сухой биомассе (АСБ)) продуктивность культуры бактерий по биомассе (P_X , г/л·ч) и полимеру ($P_{\text{ПГА}}$, г/л·ч), экономические коэффициенты (Y_X и $Y_{\text{ПГА}}$, г/г). Внутриклеточное содержание и химический состав ПГА определяли методом газовой хроматографии (Braunegg et al., 1978) (газовый хроматограф Agilent 7890A, масс-спектрометр Agilent 5975C, Agilent Technologies, США).

Физико-химические свойства образцов ПГА определяли при использовании газовой (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), дифференциальной сканирующей калориметрии. Молекулярно-массовые характеристики ПГА определяли, используя ВЭЖХ (Agilent 1200, Agilent Technologies, США) и набор полистироловых стандартов (Sigma-Aldrich, США). Температурные характеристики и степень кристалличности определяли с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Термограммы анализировали с помощью программного обеспечения STARe Ver. 11.0. (Mettler Toledo, Швейцария).

Статистический анализ результатов выполнен общепринятыми методами (Зайцев, 1973) с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel 2013 (Ver. 15.0.4420.1017). Для сравнения групп использовали критерий Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Отдельные статистические расчеты проводили в программе STATISTICA Trial Ver. 13.0 с использованием прикладных пакетов анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Закономерности синтеза полигидроксиалканоатов на жирах растительного происхождения

Исследована возможность применения растительных масел в качестве единственного источника углерода для синтеза ПГА (пальмовое, рафинированное и нерафинированное подсолнечное, рыжиковое масла). Растительные масла представляют собой субстрат сложного состава, где непосредственным источником углерода для клеток служат свободные жирные кислоты (СЖК), образуемые при гидролизе триацилглицеридов липолитическими ферментами продуцентов. Это делает необходимым исследование состава жирных кислот (ЖК) данного субстрата. Исследованные масла представлены различным набором жирных кислот, соотношение которых (% от общей суммы ЖК) различалось (Таблица 1). В пальмовом масле идентифицировано пять ЖК с доминированием C16:0 ($44,2 \pm 1,4$ %) и $\text{C18:1}\omega 9$ ($39,6 \pm 1,6$ %) при содержании C14:0 , C18:0 и $\text{C18:2}\omega 6$ 0,9-11,1 %. В составе рыжикового масла преобладали ЖК с 18 атомами углерода: $\text{C18:1}\omega 9$ ($18,2 \pm 1,0$ %), $\text{C18:2}\omega 6$ ($22,4 \pm 1,7$ %), $\text{C18:3}\omega 3$ ($29,1 \pm 0,7$ %), а также $\text{C20:1}\omega 9$ ($11,3 \pm 1,1$ %). Подсолнечное масло рафинированное содержало семь ЖК с доминированием $\text{C18:2}\omega 6$ ($63,1 \pm 1,4$ %) и $\text{C18:1}\omega 9$ ($24,5 \pm 1,6$ %) кислот; суммарная доля остальных ЖК была около 12 %. ЖК состав нерафинированного подсолнечного масла в целом был близок, но были обнаружены длинноцепочечные кислоты C26:0 , C28:0 и C30:0 ($0,7 \pm 0,1$, $1,1 \pm 0,2$ и $1,1 \pm 0,2$ % соответственно). Соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным у пальмового, рыжикового и двух образцов подсолнечного масел различалось и составило, соответственно, $0,97 \pm 0,10$, $0,11 \pm 0,04$, $0,14 \pm 0,03$, $0,20 \pm 0,05$.

Исследуемый штамм, конститутивно обладающий липазной активностью, сразу после засева среды утилизировал масла, не требуя времени на адаптацию к новому субстрату. Это подтверждено динамикой потребления субстрата культурой бактерий и анализом активности липолитических ферментов, гидролизующих в серии реакций недоступные для клеток триацилглицериды до глицерина и свободных жирных кислот.

Таблица 1 – Жирнокислотный состав жиросодержащих субстратов, исследованных в качестве источника углерода для синтеза ПГА (% от общей суммы жирных кислот)

Жирная кислота	Растительные масла			Жиры – отходы рыбопереработки				Низкосортные животные жиры		
	Пальмовое	Рыжиковое	Подсолнечное	Жир кильки балтийской	Жир скумбрии атлантической	Жир судака обыкновенного		Бараний	Свиной	Говяжий
Миристиновая C14:0	0,9±0,2	–	–	3,5±0,5	2,8±1,2	3,2±0,7		3,3±0,4	–	3,4±0,2
Пальмитиновая C16:0	44,2±1,4	4,3±0,6	7,4±0,6	28,2±1,9	26,2±0,8	17,1±1,6		24,7±1,1	23,3±2,0	25,1±1,5
Пальмитолеиновая C16:1ω7	–*	–	–	0,3±0,1	2,7±0,2	22,5±1,3		1,8±0,2	–	5,0±0,2
Стеариновая C18:0	4,2±0,1	1,4±0,2	3,1±0,2	4,5±0,5	6,4±0,4	4,5±0,3		26,3±1,1	39,0±1,5	24,3±1,2
Олеиновая C18:1ω9	39,6±1,6	18,2±1,0	24,5±1,6	25,4±1,0	32,7±1,6	26,8±0,8		35,8±1,0	36,3±1,2	37,4±2,0
Линолевая C18:2ω6	11,1±0,9	22,4±1,7	63,1±1,4	2,5±0,5	0,4±0,2	–		–	0,7±0,1	–
Линоленовая C18:3ω3	–	29,1±0,7	–	4,3±0,7	0,8±0,1	3,3±0,3		1,6±0,4	–	1,6±0,2
Арахидиновая C20:0	–	3,6±0,5	0,4±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	–		–	–	–
Гондоиновая C20:1ω9	–	11,3±1,1	–	1,1±0,1	–	–		–	–	–
Арахидоновая C20:4ω6	–	–	–	–	0,9±0,3	4,7±0,4		–	–	–
Эйкозапентаеновая C20:5ω3	–	–	–	8,7±0,5	4,3±0,6	6,5±0,3		–	–	–
Эруковая C22:1ω9	–	4,7±0,9	–	–	–	–		–	–	–
Докозагексаеновая C22:6ω3	–	–	–	16,8±0,9	16,9±0,3	6,7±1,2		–	–	–
Нервоновая C24:1ω9	–	1,0±0,3	–	1,5±0,4	0,7±0,1	0,2±0,1		–	–	–
Прочие**	–	4,0±0,2	1,5±0,2	2,9±0,4	4,9±1,1	4,5±0,9		6,5±1,3	0,7±0,2	3,2±0,8
Σ Насыщ. ЖК / Σ ненасыщ. ЖК	0,97±0,10	0,11±0,04	0,14±0,03	0,62±0,03	0,64±0,02	0,38±0,08		1,49±0,12	1,70±0,09	1,27±0,09
Σ Полиен. ЖК	11,1±0,8	54,6±1,6	63,1±1,2	32,7±2,0	24,1±1,4	22,0±,9		1,6±0,2	0,7±0,1	1,6±0,2
Σ Длинноцеп. ЖК (>18 ат. С)	–	24,6±1,0	1,9±0,2	29,3±2,6	24,5±1,8	18,2±1,9		–	–	–

*не идентифицировано; **изо-, антеизо-, разветвленные, C13:0, C15:0, C16:2, C17:0, C17:1, C20:2ω6, C20:2, C20:3, C22:0, C22:1, C22:2, C22:3, C24:0, C26:0, C28:0, C30:0; насыщ. – насыщенные ЖК; ненасыщ. – ненасыщенные ЖК; полиен. – полиеновые ЖК; длинноцеп. – длинноцепочечные ЖК; ат. С – атомов углерода

Липолитическая активность бактерий в первые часы процесса на всех маслах была на уровне 0,7-1,1 Ед./мл, а к 24 часу возрастала до $11,5 \pm 0,6$ Ед./мл. Урожай биомассы бактерий значительно отличался в зависимости от используемого масла и самым высоким был на пальмовом масле ($7,1 \pm 0,3$ г/л), несколько ниже ($5,8 \pm 0,4$ г/л) на рыжиковом масле, самые низкие результаты получены на подсолнечном масле (3,9 и 4,4 г/л) (Рисунок 1А).

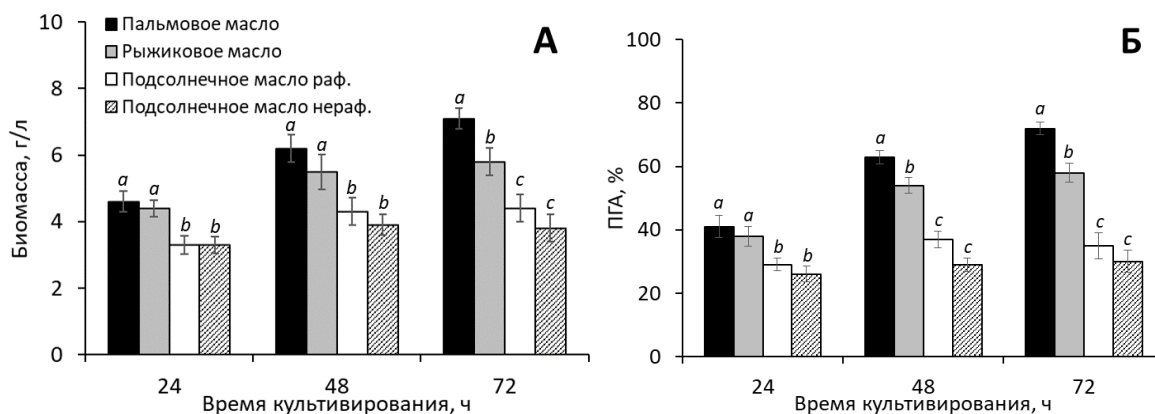


Рисунок 1 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 (А) и внутриклеточное содержание ПГА (Б) при росте на растительных маслах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$).

Содержание ПГА в клетках варьировало в зависимости от типа масла (Рисунок 1Б) Самое высокое внутриклеточное содержание ПГА, аналогично урожаю биомассы, получено при использовании в качестве С-субстрата пальмового масла (72 ± 2 %) и значительно ниже (58 ± 3 , 30 ± 4 и 35 ± 4 %) – при росте бактерий, соответственно, на рыжиковом и подсолнечном маслах.

Некоторые продукционные показатели культуры *C. necator* В-10646 приведены на Рисунке 2.

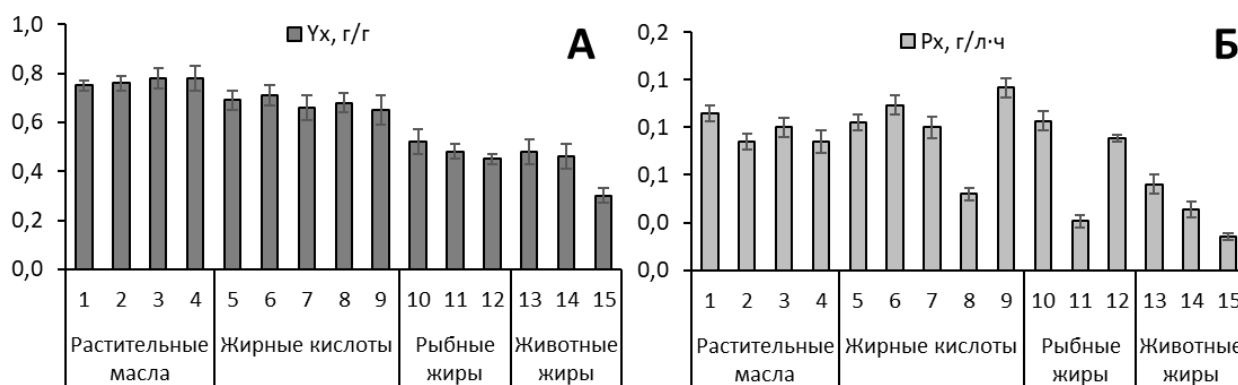


Рисунок 2 – Показатели продуктивности культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на жиросодержащих углеродных субстратах: растительных маслах (1 – пальмовое, 2 – рыжиковое, 3 – подсолнечное рафинированное, 4 – подсолнечное нерафинированное), жирных кислотах (5 – C12:0, 6 – C14:0, 7 – C16:0, 8 – C18:0, 9 – C18:1ω9), рыбных жирах (10 – из кильки балтийской, 11 – из скумбрии атлантической, 12 – из судака обыкновенного) и низкосортных животных жирах (13 – бараний, 14 – говяжий, 15 – свиной). А – экономический коэффициент по биомассе (Y_x), Б – продуктивность по биомассе (P_x).

Самая высокая продуктивность культуры по биомассе (P_x) и полимеру ($P_{ПГА}$) получена на пальмовом масле и составила, соответственно, $0,099 \pm 0,005$ и $0,071 \pm 0,004$ г/л·ч. Важный показатель биотехнологических процессов – расходные субстратные коэффициенты и

эффективность преобразования субстрата в целевой продукт. Экономические коэффициенты культуры *C. necator* В-10646 по урожаю биомассы (Y_X) были сопоставимыми для всех растительных масел (0,75-0,78 г/г). Это более чем в два раза превосходит показатели на сахаросодержащих субстратах (0,30-0,33 г/г). Наиболее высокие экономические коэффициенты по полимеру ($Y_{ПГА}$), были на пальмовом и рыжиковом маслах, соответственно, $0,54 \pm 0,03$ и $0,45 \pm 0,02$ г/г, это значительно превышает показатели на подсолнечном масле ($0,24 \pm 0,04$ и $0,29 \pm 0,03$ г/г).

Растительные масла – это многокомпонентный субстрат, специфика потребления которого бактериями потребовала детального рассмотрения. Исследовано соотношение ЖК в начале и конце культивирования, а также их содержание в культуральной среде (Рисунок 3). Анализ остаточного содержания ЖК в пальмовом масле показал, что все кислоты утилизировались культурой бактерий равномерно. При использовании рыжикового масла наблюдалось неравномерное потребление отдельных жирных кислот: все полиеновые кислоты были утилизированы бактериями практически полностью, менее интенсивно бактерии использовали олеиновую кислоту, а содержание насыщенных кислот осталось на прежнем уровне. Это привело к изменению соотношения ЖК в составе масла, а также к увеличению соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК в 2,5 раза по сравнению с исходным составом. Аналогичная картина отмечена и для подсолнечного масла в обоих вариантах: бактерии также избирательно и неравномерно утилизировали отдельные жирные кислоты. Наиболее интенсивно бактерии использовали линолевую кислоту, несколько меньше – олеиновую, содержание насыщенных жирных кислот оставалось на прежнем уровне. В результате такой избирательности соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот остаточного масла выросло практически втрое и составило $0,36 \pm 0,04$. Это побудило провести исследование способности исследуемого штамма к росту и синтезу ПГА на отдельных жирных кислотах, слабо утилизируемых бактериями в составе масел.

Закономерности синтеза полигидроксиспиритов на жирных кислотах

Исследованы рост *C. necator* В-10646 и синтез ПГА при использовании в качестве единственного источника углерода насыщенных ЖК (миристиновой, лауриновой, пальмитиновой, стеариновой) и моновенасыщенной олеиновой кислоты (Рисунок 4). Все исследованные жирные кислоты поддерживали рост бактерий и синтез ПГА, однако с удлинением углеродной цепи выявлено снижение показателей. Самые высокие урожай биомассы и выход полимера на насыщенных ЖК получены на миристиновой и лауриновой кислотах, соответственно, 6,7-7,5 г/л и 74-75 %. Рост бактерий на олеиновой кислоте был достоверно результативнее: урожай биомассы и внутриклеточное содержание ПГА достигали $8,2 \pm 0,3$ г/л и 85 ± 4 % соответственно.

Самые высокие показатели продуктивности культуры по урожаю биомассы и полимеру получены на олеиновой кислоте – $0,115 \pm 0,006$ и $0,099 \pm 0,003$ г/л·ч; экономические коэффициенты Y_X и $Y_{ПГА}$ составили, соответственно, $0,65 \pm 0,06$ и $0,55 \pm 0,05$ г/г (Рисунок 2). Показатели при росте бактерий на миристиновой и лауриновой кислотах, были близки, но уступали результатам, полученным на олеиновой кислоте, хотя экономические коэффициенты по биомассе в этом случае составили $0,71 \pm 0,04$ и $0,69 \pm 0,04$ г/г соответственно. Самые низкие продукционные показатели зарегистрированы в случае использования стеариновой кислоты.

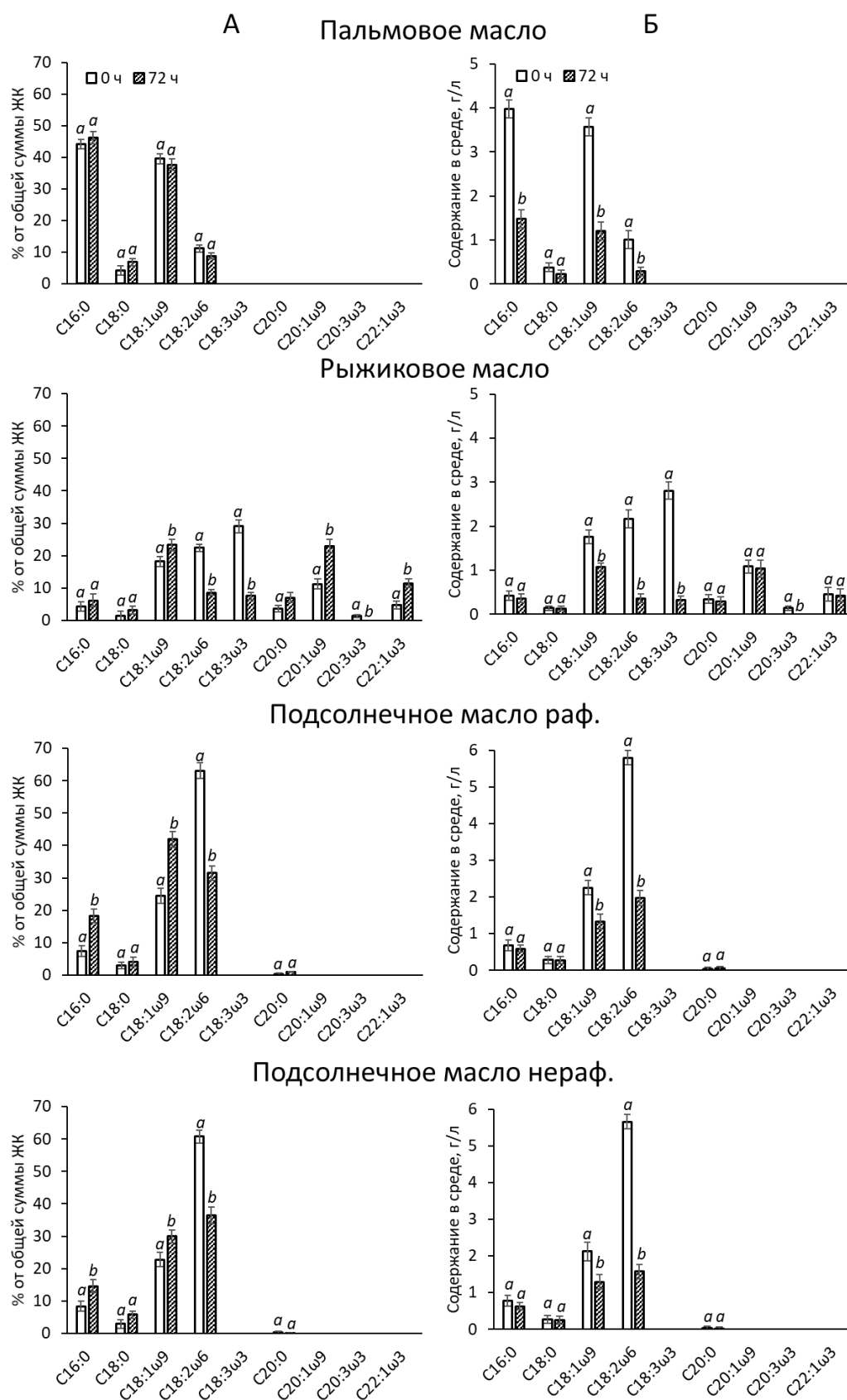


Рисунок 3 – Соотношение жирных кислот в составе растительных масел в начале и конце культивирования (А) и их содержание в среде (Б) (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

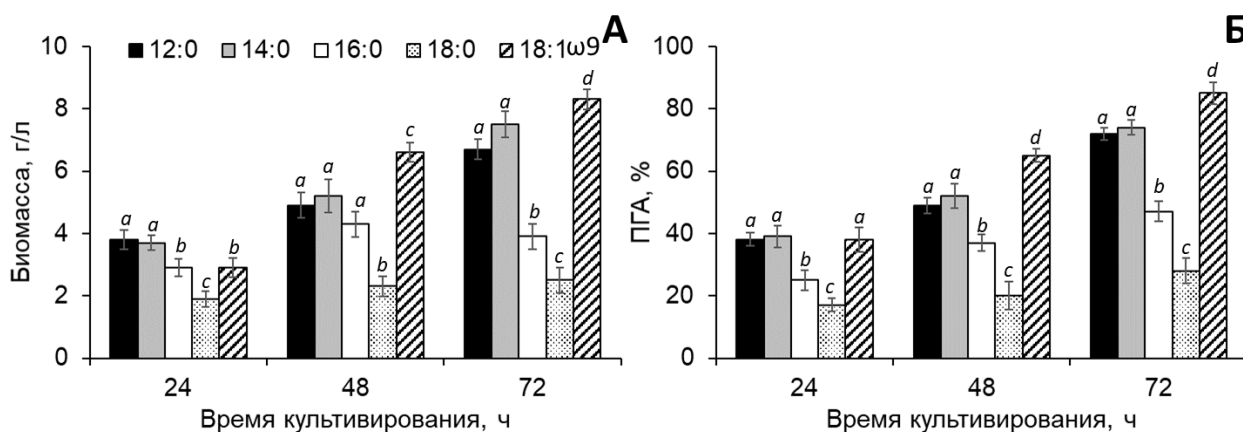


Рисунок 4 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 (А) и внутриклеточное содержание ПГА (Б) при росте на жирных кислотах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$).

Закономерности синтеза полигидроксиалканоатов на жировых отходах рыбопереработки

Рыбоперерабатывающая отрасль образует огромное количество трудно утилизируемых отходов, что требует специальных технологий и затрат. Эти крупнотоннажные отходы богаты липидами и с недавних пор рассматриваются в качестве потенциального биотехнологического субстрата для синтеза целевых продуктов, включая ПГА. Основными компонентами жировой фракции отходов рыбопереработки, аналогично растительным маслам, являются триацилглицериды, в которых к глицериновому остову присоединены жирные кислоты, которые и выступают ростовым субстратом. Содержание жира в отходах зависит от вида и кормовой базы рыб, технологии переработки, типа отходов (головы, внутренности и др.). Исследуемые жировые субстраты получены из голов копченой кильки балтийской, голов и хребтов скумбрии атлантической и внутренностей судака обыкновенного.

Состав жирных кислот в исследованных образцах жира представлен в Таблице 1. Жир, полученный из кильки балтийской, содержал набор из 20 ЖК, в котором преобладали C16:0, C18:1ω9 и C22:6ω3 кислоты (соответственно $28,2 \pm 1,9$ и $25,4 \pm 1,0$ и $16,8 \pm 0,9$ %). Значимым было присутствие C14:0, C18:0, C18:2ω6, C18:3ω3, C20:5ω3 и C24:1 кислот, содержание которых варьировало от 1,5 до 8,7 %; доля остальных ЖК была менее 1 %. Соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным составило $0,62 \pm 0,03$ при общем количестве полиеновых жирных кислот $32,7 \pm 2,0$ %. Доля длинноцепочечных ЖК составила $29,3 \pm 2,6$ %. Состав ЖК жира, извлеченного из скумбрии атлантической, по доминирующим кислотам оказался сопоставимым. Содержание C22:6ω3, C16:0 и C18:1ω9 кислот составило $16,9 \pm 0,3$, $26,2 \pm 0,8$ и $32,7 \pm 1,6$ %. Соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК было $0,64 \pm 0,02$, что обусловлено высокой долей насыщенных ($39,2 \pm 1,5$ %) и низкой долей ненасыщенных ЖК. Также отмечено более низкое содержание длинноцепочечных ЖК – до $24,5 \pm 1,8$ %. Жир, полученный из судака обыкновенного, отличался от предыдущих образцов и был представлен 17 различными ЖК. Среди доминирующих были C16:0 ($17,1 \pm 1,6$ %), C16:1ω7 ($22,5 \pm 1,3$ %) и C18:1ω9 ($26,8 \pm 0,8$ %); содержание C22:6ω3 кислоты было низким ($6,7 \pm 1,2$ %). Для этого жира характерно самое низкое соотношение насыщенных к ненасыщенным ЖК ($0,38 \pm 0,08$).

На основании ранее подобранных концентраций рыбных жиров в среде исследованы урожай биомассы и синтез ПГА в зависимости от типа жира (Рисунок 5) и определены продукционные показатели (Рисунок 2). Наиболее высокий урожай биомассы бактерий и содержание полимера в клетках ($4,7 \pm 0,2$ г/л и 65 ± 2 % соответственно) получены при выращивании бактерий на жире, извлеченном из кильки балтийской. Сопоставимым был урожай биомассы при росте бактерий на жире из судака обыкновенного ($4,5 \pm 0,4$ г/л), самым низким – на жире из скумбрии атлантической ($2,2 \pm 0,3$ г/л), однако, внутриклеточное содержание ПГА на этих жирах было ниже, 48 ± 4 и 27 ± 2 % соответственно (Рисунок 5Б).

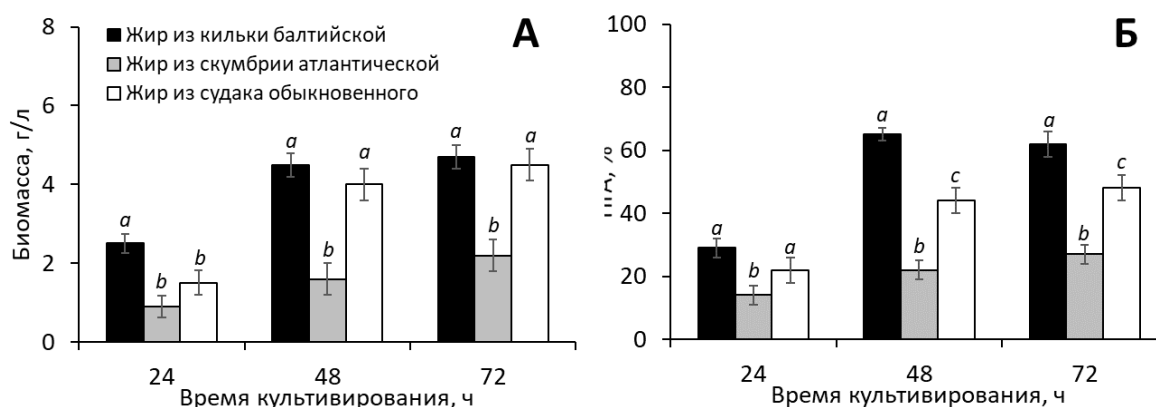


Рисунок 5 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 (А) и внутриклеточное содержание ПГА (Б) при росте на рыбных жирах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$).

Также выявлены различия в продукционных показателях культуры бактерий и экономических коэффициентах в зависимости от используемого рыбного жира (Рисунок 2). Наибольшую продуктивность процесса обеспечивали жиры, полученные из кильки балтийской и судака обыкновенного. Для жира из скумбрии атлантической эти показатели были значительно ниже. Экономические коэффициенты по полимеру также отличались: самые высокие значения $Y_{\text{ПГА}}$ получены для жира из кильки балтийской ($0,34 \pm 0,03$ г ПГА/г жира), несколько ниже – для жира из судака ($0,21 \pm 0,02$ г ПГА/г жира); для жира, полученного из скумбрии, этот показатель был самым низким. Экономические коэффициенты по биомассе (Y_x) для всех рыбных жиров были близки ($0,45$ – $0,52$ г/г).

Сопоставление состава ЖК жиров в исходной питательной среде и в остаточном жире в культуральной среде, алогично растительным маслам, выявило неравномерность, заключающуюся в быстром потреблении и исчерпании одних кислот и накоплении в культуре других. При использовании жира из кильки балтийской бактерии потребляли полиненасыщенные жирные кислоты $C18:2\omega6$, $C18:3\omega3$, $C20:5\omega3$ и $C22:6\omega3$, к концу культивирования они были практически полностью утилизированы. Менее активно утилизировались $C24:1$, $C18:1\omega9$ и $C16:0$ кислоты. Насыщенные $C14:0$ и $C18:0$ кислоты использовались бактериями еще менее интенсивно. Потребление бактериями ЖК при росте на двух других жирах было аналогичным: насыщенные и моноеновые кислоты с 18 и менее атомами углерода утилизировались хуже. Длинноцепочечные полиеновые ЖК ($C20:5\omega3$, $C22:6\omega3$, $C18:2\omega6$ и $C18:3\omega3$) активно утилизировались бактериями; $C18:1\omega9$ – несколько медленнее. Таким образом, установлено, что бактерии *C. necator* В-10646 избирательно утилизируют ЖК в составе жиров, отдавая предпочтение длинноцепочечным полиеновым кислотам, тогда как насыщенные и моноеновые кислоты с более короткой цепью (от 14 до 18 атомов углерода) утилизируются хуже.

Закономерности синтеза полигидроксикарбоновых кислот на низкосортных жирах животного происхождения

Животные жиры, как правило, твердые и характеризуются высоким содержанием насыщенных ЖК, это осложняет их применение в качестве биотехнологического субстрата. Исследованы три низкосортных жира: бараний, говяжий и свиной, различающиеся составом жирных кислот (Таблица 1). В составе бараньего жира идентифицировано 13 жирных кислот с доминированием насыщенных ЖК $C16:0$ ($24,7 \pm 1,1$ %) и $C18:0$ ($26,3 \pm 1,1$ %), а также моноеновой $C18:1\omega9$ ($35,8 \pm 1,0$ %) кислоты. $C14:0$ и $C17:0$ кислоты составляли $3,3 \pm 0,4$ и $1,7 \pm 0,3$ % соответственно; содержание $C16:1\omega7$ и $C18:3\omega3$ кислот было близким (до 1,7 %); остальные ЖК составляли менее 1 %. В составе говяжьего жира идентифицировано шесть ЖК,

среди которых большая часть также приходилась на C16:0 ($23,3 \pm 2,0$ %), C18:0 ($39,0 \pm 1,5$ %) и C18:1 ω 9 ($36,3 \pm 1,2$ %) кислоты. В составе свиного жира идентифицировано восемь ЖК, в нем также доминировали C16:0 ($25,1 \pm 1,5$ %), C18:0 ($24,36 \pm 1,2$ %) и C18:1 ω 9 ($37,4 \pm 2,0$ %) кислоты. Самое высокое соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным было у свиного жира ($1,70 \pm 0,09$ %); у двух других – ниже ($1,27-1,49$).

Рост бактерий *C. necator* В-10646 на низкосортных животных жирах иллюстрирует Рисунок 6. Самый высокий урожай биомассы получен при росте бактерий на бараньем жире ($3,3 \pm 0,4$ г/л); при использовании говяжьего и свиного жиров урожай был ниже – $2,5 \pm 0,2$ и $1,6 \pm 0,3$ г/л соответственно. Это в целом уступало показателям на растительных маслах и жировых отходах рыбопереработки. Внутриклеточное содержание полимера, синтезированного на бараньем и коровьем жирах, значимо не отличалось (58-64 %), самым низким содержание ПГА было при росте бактерий на свином жире и составило 12 %.

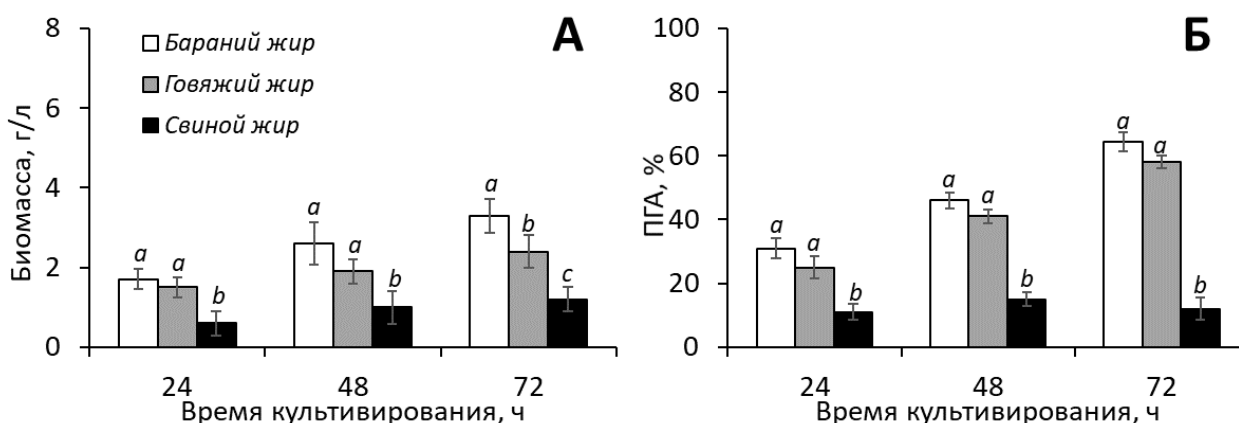


Рисунок 6 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 (А) и внутриклеточное содержание ПГА (Б) при росте на низкосортных животных жирах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$).

Результаты сравнительного анализа продукционных показателей культуры *C. necator* В-10646 приведены на Рисунке 2. Наиболее высокие показатели продуктивности по биомассе и ПГА были получены при использовании бараньего жира ($0,054 \pm 0,006$ и $0,025 \pm 0,003$ г/л·ч соответственно). Экономические коэффициенты по биомассе и ПГА для бараньего и говяжьего жиров были близки – 0,46-0,48 и 0,18-0,22 г/г соответственно. Самые низкие продукционные показатели получены при использовании свиного жира.

Динамика утилизации жирных кислот из животных жиров бактериями также была неравномерной: на говяжьем жире C18:3 ω 3 была утилизирована полностью, содержание C18:1 ω 9 кислоты и насыщенных ЖК снизилось, остальные кислоты практически не утилизировались. Потребление ЖК из говяжьего жира было аналогичным. Жирные кислоты с 18 атомами углерода бактерии также активно утилизировали из свиного жира в отличие от других кислот. Во всех случаях неравномерное потребление жирных кислот из животных жиров сопровождалось увеличением соотношения насыщенных ЖК к ненасыщенным в остаточном жире.

Анализ исследованных жиросодержащих субстратов (растительных масел, жирных кислот, животных и рыбных жиров) показал их пригодность для продуктивного синтеза ПГА, однако выявленная неравномерность потребления ЖК является негативным моментом. Причина этого, по всей видимости, заключается в конкурентных отношениях между ЖК в процессе их транспорта в клетку. Согласно работе (Pavoncello et al., 2022), жирные кислоты с длиной углеродной цепи более 12 атомов углерода требуют специализированных переносчиков. Вопрос транспорта ЖК в клетку не до конца изучен, но причина

неравномерного использования жирных кислот может крыться именно в этом аспекте, однако этот вопрос требует дополнительных и специальных исследований. Несмотря на это, существуют подходы к повышению их доступности и полноты использования: за счет масштабирования процессов в ферментерах и оптимизации эмульгирования жира, также возможно использование остаточного жира в технических целях.

Мономерный состав и свойства полигидроксиалканоатов, синтезированных на различных жиросодержащих субстратах

Культивирование бактерий *C. necator* В-10646 на исследованных жировых источниках углерода оказывало влияние не только на продукционные показатели культуры и эффективность использования субстрата, но также влияло на мономерный состав синтезируемых полимеров (Рисунок 7).

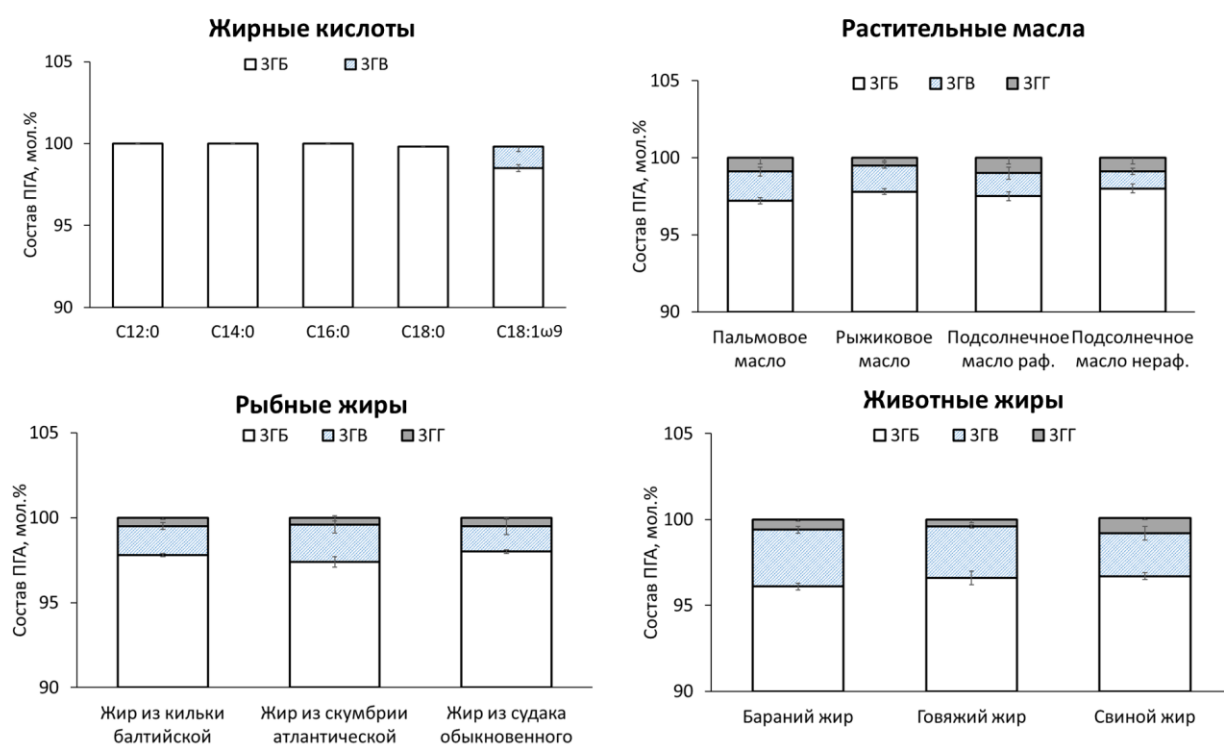


Рисунок 7 – Мономерный состав ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода

Бактерии при росте на насыщенных ЖК синтезировали гомополимер поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)). При использовании олеиновой кислоты без добавления субстратов прекурсоров бактерии синтезировали сополимер с минорным включением мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ) ($1,3 \pm 0,4$ мол.%). На растительных маслах, рыбных и животных жирах получены трехкомпонентные сополимеры П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-ЗГГ), состоящие из доминирующего мономера 3-гидроксибутирата (ЗГБ) (96,1-98,0 мол.%) и минорных включений 3-гидроксивалерата (ЗГВ) (1,1-3,0 мол.%) и 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) (0,4-1,0 мол.%). Это значимый результат, так как наличие в составе ПГА мономеров, отличных от ЗГБ, влияет на их физико-химические свойства, снижая кристалличность, что повышает качество полимерных изделий. Результат идентификации состава мономеров в синтезированных ПГА, позволяет предположить возможную роль отдельных ЖК в составе исследованных жиров как прекурсоров различных мономеров.

Повышение включения в состав ПГА мономеров, отличных от ЗГБ – сложная биотехнологическая задача. С этой целью проведены специальные исследования, основой которых были контролируемое внесение в культуру бактерий субстратов-прекурсоров, как

правило, токсичных для бактерий, и регламентируемая длительность процесса после этих добавок.

Исследование возможности синтеза сополимерных полигидроксиалканоатов на жиросодержащих источниках углерода в присутствии прекурсоров

Для исследований были отобраны жировые субстраты, обеспечившие наиболее высокие продукционные показатели культуры по урожаю биомассы и синтезу ПГА – олеиновая кислота, пальмовое масло и жир, полученный из отходов кильки балтийской. Подача прекурсоров в культуру была регламентированной с учетом выявленных ранее предельно допустимых концентраций (ПДК).

Синтез сополимеров, содержащих макровключения мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ), исследован при внесении в культуру бактерий двух добавок валерата калия в концентрации 1,0 г/л на 0 и 24 ч культивирования (Рисунок 8). Наиболее высокие урожаи биомассы и ПГА получены при росте бактерий на олеиновой кислоте – $6,0 \pm 0,3$ г/л и 58 ± 3 % соответственно. При использовании более сложных жировых источников углерода урожай биомассы был значительно ниже – 3,1-3,8 г/л. Самое высокое содержание мономеров ЗГВ в сополимере получено при росте бактерий на жире из отходов кильки балтийской ($50,6 \pm 1,6$ мол. %).

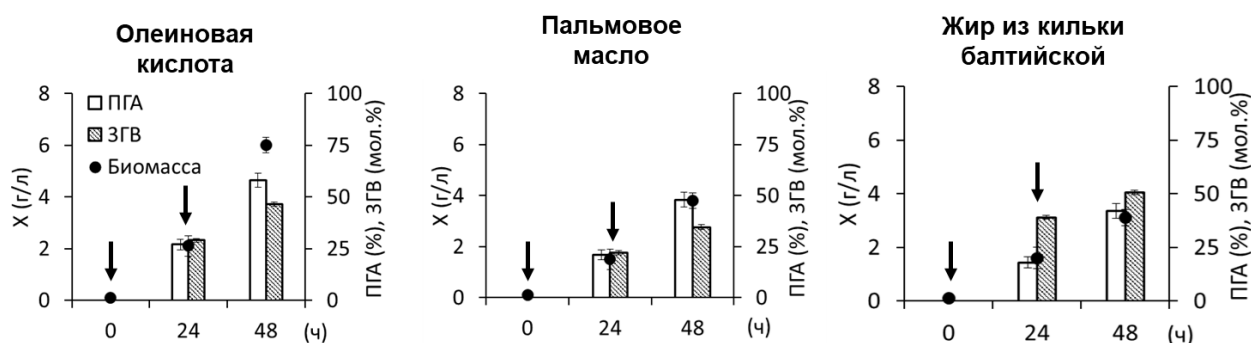


Рисунок 8 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646 (X, г/л), внутриклеточное содержание ПГА (% к АСБ) и содержание мономеров ЗГВ (мол. %) при добавлении валерата калия (время добавок прекурсора отмечено стрелками)

Наиболее перспективным, самым низкокristаллическим и биосовместимым типом ПГА являются сополимеры, содержащие мономеры 4-гидроксибутирата (4ГБ), обеспечивающие получение высокоэластичных изделий. Возможность синтеза этих сополимеров на жировых субстратах исследована при внесении в культуру бактерий ϵ -капролактона – прекурсора мономеров 4ГБ в виде двух добавок по 1,0 г/л в культуру бактерий аналогично процессу синтеза П(ЗГБ-со-3ГВ) (Рисунок 9). Наиболее высокий результат получен при использовании жира из кильки балтийской – включение трудно синтезируемых мономеров 4ГБ достигало $7,4 \pm 0,4$ мол. % на фоне снижения урожая биомассы до $2,7 \pm 0,3$ г/л по сравнению с результатами на олеиновой кислоте и пальмовом масле, соответственно, $5,5 \pm 0,3$ и $3,1 \pm 0,4$ г/л.

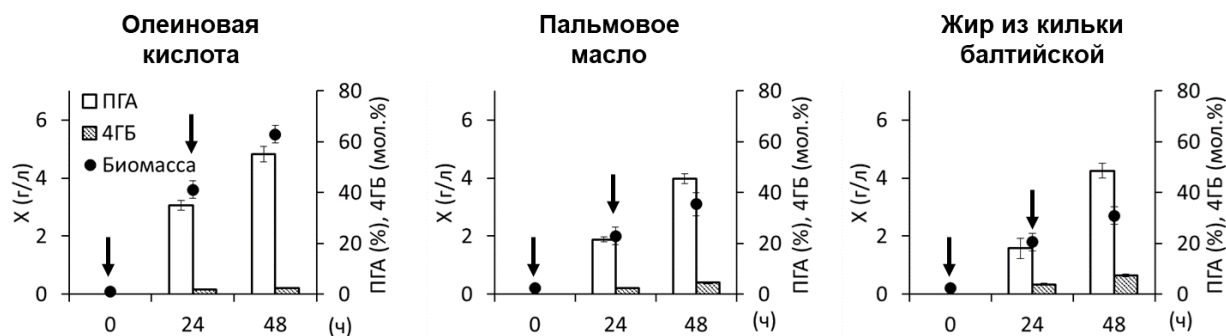


Рисунок 9 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646 (X , г/л), внутриклеточное содержание ПГА (% к АСБ) и содержание мономеров 4ГБ (мол.%) при добавлении ϵ -капролактона (время добавок прекурсора отмечено стрелками)

Еще одним перспективным типом ПГА являются малоизученные серосодержащие сополимеры, которые выделены в отдельный блок политиоэфиров. Реализация синтеза политиоэфиров на жировых субстратах с добавками 3-меркаптопропионовой кислоты в качестве прекурсора позволила синтезировать образцы с минорными включениями мономеров 3-меркаптопропионата (ЗМП) (не выше 1,0 мол.%) на фоне выраженного ингибирования роста бактерий и значительного снижения общего выхода ПГА (Рисунок 10).

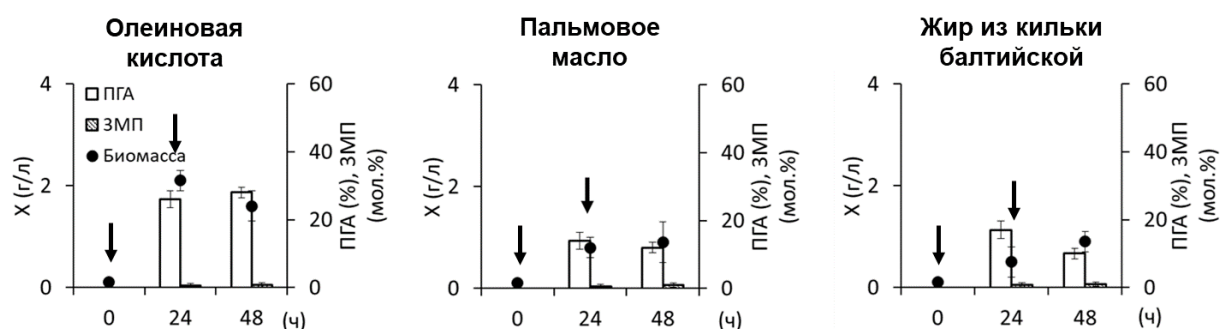


Рисунок 10 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646 (X , г/л), внутриклеточное содержание ПГА (% к АСБ) и содержание мономеров ЗМП (мол.%) при добавлении 3-меркаптопропионовой кислоты (время добавок прекурсора отмечено стрелками)

Выполненными исследованиями впервые решена задача биосинтеза сополимерных ПГА на сложных жиросодержащих субстратах. Синтезирована серия образцов ПГА различного химического состава, свойства которых были исследованы далее.

Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов в зависимости от использованного жиросодержащего субстрата

Образцы ПГА, синтезированные на жиросодержащих субстратах, показали достаточно широкую вариабельность средневесовой (M_v) (от 306 до 780 кДа), среднечисловой (M_n) (83-190 кДа) молекулярных масс и значений полидисперсности (\bar{D}) (от 2,8 до 5,5) (Таблица 2) Это типично для этого показателя, зависящего от многих факторов, включая возраст культуры, время отбора проб и способ экстракции полимеров из биомассы клеток.

Таблица 2 – Состав и свойства ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода

Субстрат	Мономерный состав			М _в , кДа	Đ	Т _{пл} , °С	Т _{дегр} , °С	С _х , %
	ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ					
Жирные кислоты								
Лауриновая	100	–	–	306±28	3,7±0,2	169±6	288±12	70±5
Миристиновая	100	–	–	365±33	3,7±0,2	169±7	285±10	73±5
Пальмитиновая	100	–	–	424±21	3,5±0,3	170±6	285±17	71±4
Стеариновая	100	–	–	447±36	2,9±0,1	166±10	283±17	68±4
Олеиновая	98,7	1,3	–	519±16	4,0±0,4	165±9	286±19	66±5
Растительные масла								
Пальмовое	97,2	1,9	0,9	670±11	5,2±0,2	171±8	286±20	66±5
Рыжиковое	97,8	1,7	0,5	740±14	4,4±0,7	170±8	271±15	70±3
Подсолнечное раф.	97,5	1,5	1,0	780±46	4,1±0,4	170±9	281±16	65±6
Подсолнечное нераф.	97,5	1,5	1,0	775±39	4,4±0,4	171±7	282±19	67±4
Жиры, полученные из отходов рыбопереработки								
Жир из кильки балтийской	97,8	1,7	0,5	663±14	5,5±0,2	160±7	284±13	71±4
Жир из скумбрии атлантической	97,4	2,2	0,4	460±41	2,9±0,1	155±9	251±19	72±3
Жир из судака обыкновенного	98,0	1,5	0,5	401±18	4,1±0,4	169±5	277±14	71±5
Низкосортные жиры животного происхождения								
Бараний жир	96,1	3,3	0,6	312±26	2,8±0,2	165±8	266±18	65±5
Говяжий жир	96,6	3,0	0,4	399±31	2,8±0,2	160±8	269±16	64±6

Важный показатель ПГА – температурные характеристики. Исследование термического поведения образцов показало отсутствие значимых различий между ними вне зависимости от типа исследуемых жировых субстратов. Все образцы имели незначительные отличия температуры плавления (T_{пл}): 165-170 °C при синтезе на жирных кислотах; 170-171 °C на растительных маслах; 160-165 °C на животных жирах и 155-169 °C на жировых отходах рыбопереработки, и продемонстрировали термическую стабильность. При этом температура термической деградации (T_{дегр}) полимеров значимо не отличалась. Разрыв между температурой начала плавления и температурой начала термического разложения у всех образцов составлял порядка 100 °C (96-121 °C). Это свидетельствует о наличии достаточного широкого технологического окна для переработки полимеров в изделия термическими методами.

Исследование степени кристалличности (C_х) полученных образцов ПГА показало, что более высокие значения характерны для жиров, полученных из отходов рыбопереработки (71-72 %) и при использовании жирных кислот (66-73 %). Небольшое снижение степени кристалличности до 64-65 % определено для ПГА, полученных на животных жирах и растительных маслах.

Зарегистрированы положительные эффекты при исследовании синтезированных в присутствии прекурсоров сополимерных ПГА (Таблица 3). Анализ молекулярно-массовых характеристик образцов, содержащих макровключения мономеров ЗГВ и 4ГБ, показал, что с увеличением их содержания M_в большинства из них достоверно снижалась, при этом оставаясь на высоком уровне. В отношении T_{пл} и T_{дегр} выраженного снижения этих показателей не выявлено. Для всех образцов показано наличие разрыва между T_{пл} и T_{дегр} более 100 °C и сохранение термостабильности.

Таблица 3 – Состав и свойства сополимерных ПГА, синтезированных на жиросодержащих субстратах с добавлением прекурсоров

Источник углерода	Мономерный состав				М _в , кДа	Đ	Т _{пл} , °С	Т _{дегр} , °С	С _х , %
	3ГБ	3ГВ	3ГГ	4ГБ					
Прекурсор мономеров 3ГВ – валерат калия (Σ = 2,0 г/л)									
Пальмовое масло	65,3	34,5	0,2	–	258±24	3,2±0,3	166±7	283±17	39±5
Олеиновая кислота	53,5	46,5	–	–	276±15	3,5±0,1	167±9	279±14	40±4
Жир из кильки балтийской	49,2	50,6	0,2	–	327±32	3,2±0,2	168±7	285±16	43±5
Прекурсор мономеров 4ГБ - ε-капролактон (Σ = 2,0 г/л)									
Олеиновая кислота	95,8	1,7	–	2,5	281±12	2,4±0,1	156±10	283±16	53±5
Пальмовое масло	94,7	–	0,7	4,6	374±32	2,4±0,2	161±9	285±16	47±3
Жир из кильки балтийской	84,5	1,9	0,2	7,4	609±42	2,2±0,2	167±9	274±17	49±4

Важный результат – это реализованный синтез образцов со значительно сниженной кристаллическостью – ниже 50 %, что свидетельствует о выравнивании аморфной и кристаллической фаз в полимере и повышении технологичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнено исследование биотехнологического синтеза разрушаемых полигидроксиалканоатов при использовании ранее не изученных жиросодержащих субстратов различного происхождения природным штаммом бактерий *Cupriavidus necator* B-10646. В работе рассмотрены различные группы жиросодержащих углеродных субстратов на предмет пригодности и эффективности их использования в качестве источника углерода для синтеза резервных ПГА. Результаты свидетельствуют о перспективности и эффективности привлечения жиросодержащих источников углерода, в частности низкостоимостных отходов пищевой промышленности, в качестве нового и малоисследованного субстрата для синтеза биополимеров и являются основой для дальнейшего масштабирования процесса.

ВЫВОДЫ

1. Жировые субстраты различного происхождения – отдельные жирные кислоты, растительные масла, низкосортные животные жиры и жировые отходы рыбопереработки, впервые исследованы в качестве потенциального углеродного субстрата для синтеза полигидроксиалканоатов в культуре природного штамма *C. necator* B-10646; результаты позволили разработать и реализовать биотехнологические процессы синтеза полимеров на новых субстратах с высокими выходами (до 85±4 %).
2. Показана высокая эффективность усвоения бактериями исследованных жировых субстратов при значениях экономического коэффициента по урожаю биомассы до 0,78±0,05 г/г, что значительно превышает показатели на сахарах (0,30-0,33 г/г). Самый высокий урожай биомассы в лабораторной культуре получен на олеиновой кислоте (8,3±0,3 г/л), пальмовом масле (7,1±0,3 г/л) и жировых отходах рыбопереработки (4,7±0,2 г/л).
3. Выявлены особенности мономерного состава ПГА в зависимости от использованного субстрата, заключающиеся в синтезе гомополимера П(3ГВ) на насыщенных жирных кислотах и сополимеров с минорными включениями мономеров 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата на жировых субстратах сложного состава растительного и животного происхождения.
4. Контролируемые режимы дозирования в культуру бактерий *C. necator* B-10646 субстратов-прекурсоров позволили разработать продуктивные процессы и синтезировать сополимерные ПГА с макровключениями мономеров 3-гидроксивалерата (до 50,6 мол.%) и 4-гидроксипантаноата (до 7,4 мол.%) с использованием олеиновой кислоты, пальмового масла и жировых отходов рыбопереработки.

5. Исследование влияния состава и соотношения мономеров в ПГА, синтезированных на жиросодержащих субстратах, на физико-химические свойства, показало, что в отличие от высококристаллического П(ЗГБ) (C_x 73±4%), полученные сополимеры имели степень кристалличности 39-53 %, значения средневесовой молекулярной массы не ниже 258 кДа, сохраняли термостабильность с разрывом между температурой плавления и термической деградации не менее 100 °С.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Сапожникова К. Ю. Оценка низкосортных животных жиров в качестве нового субстрата для биосинтеза разрушаемых биопластиков / К. Ю. Сапожникова // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2025. – Т. 18. – №. 4. – С. 424-432. (Scopus, Уровень белого списка 1, ВАК, IF 0,5. Q4).
2. Volova T. G. Synthesis and properties of degradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] derived from waste fish oil / T. G. Volova, E. G. Kiselev, A. G. Sukovaty, N. O. Zhila, K. Yu. Sapozhnikova, N. D. Ipatova, P. O. Shishatskii // Polymers. – 2025. – Vol. 17. – №. 16. – P. 2171. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 1, IF 4,9. Q1).
3. Volova T. From waste to biopolymer: synthesis of P(3HB-co-4HB) from renewable fish oil / T. Volova, N. Zhila, K. Sapozhnikova, O. Menshikova, E. Kiselev, A. Sukovaty, V. Volkov, I. Peterson, N. Ipatova, E. Shishatskaya // Journal of Renewable Materials. – 2025. – Vol. 13. – №. 3. – P. 413. (Scopus, IF 2.1. Q3).
4. Zhila N. O. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Cupriavidus necator* B-10646 on saturated fatty acids / N. O. Zhila, K. Yu. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Polymers. – 2024. – Vol. 16. – №. 9. – P. 1294. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 1, IF 4,9. Q1).
5. Zhila N. O. Synthesis and properties of polyhydroxyalkanoates on waste fish oil from the production of canned sprats / N. Zhila, K. Yu. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Processes. – 2023. – Vol. 11. – №. 7. – P. 2113. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 2, IF 2.8. Q2).
6. Zhila N. O. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from different 4-hydroxybutyrate precursors by new wild-type strain *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1 / N. O. Zhila, K. Yu. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Processes. – 2023. – Vol. 11. – №. 5. – P. 1423. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 2, IF 2.8. Q2).
7. Zhila N. O. Properties of degradable polyhydroxyalkanoates synthesized from new waste fish oils (WFOs) / N. O. Zhila, E. G. Kiselev, V. V. Volkov, O. Y. Mezenova, K. Y. Sapozhnikova, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova, T. G. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – №. 19. – P. 14919. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 1, IF 4.9. Q1).
8. Zhila N. O. Biosynthesis and properties of sulfur-containing polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by wild-type strain *Cupriavidus necator* B-10646 / N. O. Zhila, K. Yu. Sapozhnikova, A. V. Berezovskaya, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, A. D. Vasiliev, S. Thomas, T. G. Volova // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – №. 4. – P. 1005. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 1, IF 4,9. Q1).
9. Zhila N. O. Biosynthesis and properties of a P(3HB-co-3HV-co-4HV) produced by *Cupriavidus necator* B-10646 / N. O. Zhila, K. Yu. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, I. V. Nemtsev, A. V. Lukyanenko, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Polymers. – 2022. – Vol. 14. – №. 19. – P. 4226. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 1, IF 4,9. Q1).
10. Volova T. *Cupriavidus necator* B-10646 growth and polyhydroxyalkanoates production on different plant oils / T. Volova, K. Sapozhnikova, N. Zhila // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 121-130. (Scopus, WoS, Уровень белого списка 1, IF 8.5. Q1).

Патент:

1. Волова Т. Г., Жила Н. О., Киселев Е. Г., **Сапожникова К. Ю.**, Демиденко А. В., Волков В. В. Штамм *Cupriavidus necator* – продуцент разрушаемых полигидроксиалканоатов на жировых отходах рыбопереработки: патент РФ на изобретение № 2845693; приоритет от 30.01.2025; опубл. 25.08.2025, Бюл. №24.

Тезисы докладов в материалах конференций:

2. Жила Н. О. Микробиологический синтез целевых продуктов: белка одноклеточных и биоразрушаемых полимеров (полигидроксиалканоатов) / Н. О. Жила, **К. Ю. Сапожникова**, Е. Г. Киселев, Т. Г. Волова // 5-й Российский микробиологический конгресс : сборник тезисов докладов; Волгоград, 29 сентября – 3 октября 2025 г. / под ред. Д. А. Бабкова. – Волгоград : Библиотечно-издательский центр ВолГМУ, 2025. – С. 147-148.
3. **Сапожникова К. Ю.** Микробиологический синтез поли(3-гидроксibuтирата-*co*-4-гидроксibuтирата) на отходах рыбопереработки / **К. Ю. Сапожникова** // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2025» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2025.
4. **Сапожникова К. Ю.** Биотехнологический синтез разрушаемых полигидроксиалканоатов П(ЗГБ-*co*-4ГБ) при использовании жировых отходов рыбопереработки / **К. Ю. Сапожникова**, Н. О. Жила, Е. Г. Киселев, Т. Г. Волова // Пищевые технологии и биотехнологии. XIX Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием (21–25 апреля 2025 г., г. Казань): материалы конференции / под ред. А. С. Сироткина; Минобрнауки России, Казан. нац. исслед. технол. ун-т. — Казань : Изд-во КНИТУ, 2025.
5. **Сапожникова К. Ю.** Отходы рыбопереработки как субстрат для микробиологического синтеза полигидроксиалканоатов / **К. Ю. Сапожникова** // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2024» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МОО СИПНН Н.Д. Кондратьева, 2024.
6. **Sapozhnikova K. Yu.** Waste fish oils (WFOs) as a substrate for the synthesis of 'green' bioplastics / **Sapozhnikova K. Yu.**, Zhila, N. O., Volova, T. G // Public Health Toxicology, 4 (Supplement 2), 2024.
7. **Сапожникова К. Ю.** Потенциал жиросодержащих углеродных субстратов животного происхождения для биосинтеза «зеленых» пластиков / **К. Ю. Сапожникова**, Н.О. Жила, Т.Г. Волова // Материалы IV Международного биотехнологического форума «BIOAsia Altai 2024» (23-28 сентября 2024 г., г. Барнаул). – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2024. – 588 с.
8. **Сапожникова К. Ю.** Биосинтез трехкомпонентных сополимерных полигидроксиалканоатов П(ЗГБ-*co*-3ГВ-*co*-4ГВ) в культуре бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 / **К. Ю. Сапожникова** // Материалы XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «ПРОСПЕКТ СВОБОДНЫЙ – 2023» (24–29 апреля 2023 г., г. Красноярск). – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2023. – 3618 с.
9. **Сапожникова К. Ю.** Биосинтез и свойства трехкомпонентных полигидроксиалканоатов, полученных в культуре бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 / **К. Ю. Сапожникова** // Междисциплинарная конференция молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXVI): тезисы докладов (16 мая 2023 г., г. Красноярск). – Красноярск: ИФ СО РАН, 2023. – 135 с.
10. **Сапожникова К. Ю.** Биосинтез и свойства трехкомпонентных сополимеров ПГА, содержащих мономеры гидроксивалерата, в культуре бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 / **К. Ю. Сапожникова** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2023» (10–21 апреля 2023 г., г. Москва). – Москва: МАКС Пресс, 2023.

11. **Сапожникова К. Ю.** Углеродный субстрат как фактор, определяющий состав и свойства микробных полигидроксиалканоатов / **К. Ю. Сапожникова** // Современные тенденции развития функциональных материалов: Материалы докладов Международной молодежной научной конференции (16–18 ноября 2022 г., Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия). – Сочи: Научно-технологический университет «Сириус», 2022. – с. 56.
12. **Сапожникова К. Ю.** Микробиологический синтез биоразлагаемых полимеров с использованием перспективных, экономически рентабельных источников углерода / **К. Ю. Сапожникова** // Сборник тезисов докладов участников четвертой Международной научной конференции «Наука будущего» и шестого Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего-наука молодых» — Москва, 2021. — с. 54-55.
13. **Сапожникова К. Ю.** *Cupriavidus necator* B-10646 growth and polyhydroxyalkanoates production on different plant oils / **К. Ю. Сапожникова**, Н. О. Жила // Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни : материалы IV Междунар. науч. конф., г. Красноярск, 10–13 октября 2021 г. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2021. – с. 33-36.
14. **Сапожникова К. Ю.** Особенности синтеза полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 на различных растительных маслах / **К. Ю. Сапожникова** // Проспект Свободный – 2021 : материалы XVII Междунар. конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Красноярск, 19–24 апреля 2021 г. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2021. – с. 1486-1488.
15. **Сапожникова К. Ю.** Рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полигидроксиалканоатов на различных растительных маслах / **К. Ю. Сапожникова** // Междисциплинарная конференция молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXIV): тезисы докладов (Красноярск, 29 апреля 2021 г.) – Красноярск: ИФ СО РАН, 2021. – с. 60.