

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи



Сапожникова Кристина Юрьевна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ НА
ЖИРОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТАХ**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук, доцент
Жила Наталья Олеговна

Красноярск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 Обзор литературы	8
1.1 Полигидроксиалканоаты как объект биотехнологии.....	8
1.2 Характеристика и биосинтез полигидроксиалканоатов	11
1.3 Штаммы-продуценты полигидроксиалканоатов	15
1.4 Источники углерода для биосинтеза полигидроксиалканоатов	17
1.5 Свойства полигидроксиалканоатов	24
ГЛАВА 2 Объекты и методы исследования	27
2.1 Объект исследования	27
2.2 Состав питательной среды для культивирования бактерий.....	27
2.3 Анализ химического и жирнокислотного состава углеродных субстратов	29
2.4 Технология и условия культивирования бактерий	30
2.5 Контроль параметров роста культуры бактерий	30
2.6 Определение внутриклеточного содержания полигидроксиалканоатов и их мономерного состава	31
2.7 Определение продукционных показателей роста бактерий и синтеза полигидроксиалканоатов	32
2.8 Экстракция и очистка полученных образцов полигидроксиалканоатов	33
2.9 Определение свойств синтезированных полигидроксиалканоатов.....	33
2.10 Статистический анализ результатов	34
ГЛАВА 3 Закономерности синтеза полигидроксиалканоатов на жирах растительного происхождения	35
3.1 Растительные масла как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов	35
3.2 Жирные кислоты как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов	43
3.3 Заключение к главе.....	47
ГЛАВА 4 Закономерности синтеза полигидроксиалканоатов на жирах животного происхождения	48

4.1 Жировые отходы рыбопереработки как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов...	48
4.2 Жиры животного происхождения как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов	58
4.3 Заключение к главе.....	64
ГЛАВА 5 Химический состав и свойства полигидроксиалканоатов, синтезированных на различных жиросодержащих субстратах.....	65
5.1 Характеристика мономерного состава полигидроксиалканоатов, синтезированных на различных жиросодержащих углеродных субстратах.....	65
5.2 Синтез сополимерных полигидроксиалканоатов на жиросодержащих источниках углерода в присутствии прекурсоров	70
5.2.1 Биосинтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 3-гидроксивалерата, на жиросодержащих источниках углерода	71
5.2.2 Синтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 3-и 4-гидроксивалерата, на жиросодержащих источниках углерода	74
5.2.3 Синтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-гидроксibuтирата, на жиросодержащих источниках углерода	77
5.2.4 Синтез серосодержащих полигидроксиалканоатов на жировых источниках углерода	80
5.3 Молекулярно-массовые характеристики полигидроксиалканоатов, синтезированных при использовании жиросодержащих углеродных субстратов	83
5.4 Термические свойства и кристалличность образцов полигидроксиалканоатов, синтезированных на жиросодержащих углеродных субстратах	88
5.5 Заключение к главе.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

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 к экономике замкнутого цикла. Использование возобновляемых ресурсов, биоразлагаемость и энергосбережение являются одними из главных критериев, предъявляемых к экологически чистым продуктам, таким как биопластики. Биопластик — это общий термин, используемый для пластиков биологического происхождения или способных к естественной биodeградации. Производство биопластиков, несмотря на их очень небольшую долю в общем производстве пластмасс, постепенно увеличивается и составляет около 10-15 % от всего рынка пластмасс. Кроме того, их применение расширяется, и они приобретают все большую популярность в научных исследованиях и промышленности.

Одними из актуальных и социально значимых продуктов биотехнологии являются биопластики микробного происхождения полигидроксиалканоаты (ПГА). ПГА – это семейство биосовместимых и биоразлагаемых полимеров различного состава, которые могут быть получены из возобновляемых ресурсов. Эти полимеры синтезируются различными микроорганизмами при несбалансированных условиях роста из широкого спектра субстратов (сахара, крахмал, целлюлоза, растительные масла, органические и жирные кислоты и др.), в том числе при использовании побочных продуктов различных производств (меласса, сыворотка, глицерин и др.) (Dietrich et al., 2019; Obruca et al., 2020). 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 (Anderson et al., 1990).

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 дешевых 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 тонн низкосортного жиросодержащего сырья (непосредственно жиры различного происхождения, отработанные кулинарные жиры, жиросодержащие отходы и пр.) (Ashby et al., 2008; Mohapatra et al., 2017; Riedel et al., 2015; Sudesh, 2013; 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.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследовать рост природного штамма *Cupriavidus necator* В-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 работы. Впервые показана способность природного штамма *C. necator* В-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-гидроксibuтирата, характеризующиеся пониженной степенью кристалличности, что облегчает переработку этих полимеров в изделия и улучшает потребительские свойства полученных из них продуктов.

Теоретическая значимость работы 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.

Основные 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-гидроксibuтирата.
3. Тип жиросодержащих углеродных субстратов влияет на состав мономеров и физико-химические свойства полигидроксиалканоатов.

Апробация материалов диссертации. Основные положения и научные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 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.

Результаты исследований автора работы, доложенные на научно-практических конференциях и конкурсах, неоднократно были отмечены дипломами I, II и III степени.

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 материалов диссертации. 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.

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

Личный вклад автора 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.

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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Результаты исследований диссертационной работы соответствуют пп. 2, 3, 26 паспорта специальности 1.5.6. Биотехнология.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям – кандидату биологических наук, доценту, старшему научному сотруднику лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН Жила Наталье Олеговне, и доктору биологических наук, профессору, зав. лабораторией хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН Воловой Татьяне Григорьевне за помощь в подготовке диссертационной работы на всех ее этапах. Автор благодарит сотрудников Лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института Биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН за помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов.

ГЛАВА 1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалканоаты как объект биотехнологии

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой нетоксичные, биосовместимые, биоразлагаемые полимеры, которые могут быть получены в процессах микробного биосинтеза из возобновляемых ресурсов, используемых в качестве субстратов. ПГА обладают высокой степенью полимеризации, являются оптически активными, изотактическими и нерастворимыми в воде биополимерами. Эти особенности делают их конкурентоспособной альтернативой нефтехимическим пластикам и привлекают внимание многих исследователей. За последние десятилетия наблюдается значительный рост публикаций, относящихся к тематике ПГА – с 10 публикаций в 1995 году до 180 в 2019 году. Однако история изучения этих биополимеров начинается с конца XIX века. Первое наблюдение бактериальных включений в виде ПГА было сделано Мартинусом Бейеринком в 1888 году. Эти включения были описаны как липидные соединения, но дальнейших исследований относительно их характеристики не проводилось. Лишь 38 лет спустя был открыт поли(3-гидроксibuтират) (П(ЗГБ)): исследован его синтез бактериями *Bacillus megaterium*, изучено строение и описан способ экстракции (Lemoigne, 1926). В 1958 году было показано, что П(ЗГБ) накапливается при высоком соотношении C:N, а его деградация происходит при дефиците источника углерода (Macrae et al., 1958), а позже подтверждена способность к накоплению П(ЗГБ) у других групп микроорганизмов, в том числе у галофильных штаммов (Sierra et al., 1962) и водорослей (Carr, 1966).

В середине XX века биопластики не представляли особого интереса для промышленности, поскольку дешевые пластмассы на нефтяной основе быстро внедрялись в повседневную жизнь. После Второй мировой войны пластмассы на нефтяной основе стали повседневными товарами, и к середине-концу 1960-х годов нефтехимическая промышленность уже вытеснила большую часть продуктов на биологической основе (Palmeiro-Sánchez et al., 2022). Необходимость поиска альтернатив остро возникла с наступлением нефтяного кризиса, что подготовило почву для первого коммерческого производства П(ЗГБ). Именно в эти годы ПГА привлекли внимание промышленности. W. R. Grace & Co. запатентовали производство и экстракцию П(ЗГБ) в 1962 году. Спустя десятилетие компания ICI начала свои исследования по использованию П(ЗГБ) в качестве потенциальной замены некоторых коммерческих пластмасс (Poirier et al., 1995). Второй причиной для рассмотрения биоразлагаемых ПГА в качестве альтернативы обычным пластмассам стала осведомленность научного сообщества о загрязнении экосистем пластиком. В

1982 году исследования подтвердили, что свойства П(ЗГБ) аналогичны свойствам полипропилена (King, 1982), также была показана способность ПГА к биологическому разложению и биосовместимость (Howells, 1982). Эти два достижения стали базисом для развития коммерческого интереса к ПГА, их потенциального использования в качестве биопластиков и выдвинули в ряд перспективных объектов биотехнологии. Десятилетие 1970-х годов принесло еще один прорыв – открытие ПГА, отличных от П(ЗГБ). В 1974 году получено первое сообщение о гетерополимерных ПГА, содержащих в качестве мономеров 3-гидроксипентановую кислоту (Wallen et al., 1974). Усовершенствование методов экстракции и определение физико-химических свойств различных типов ПГА, сделали более ясным их потенциал в качестве биоматериалов. Были синтезированы новые биополимеры на основе ПГА с широким спектром свойств. К концу 1980-х годов компания ICI производила 50 т ПГА в год, стоимостью 33 \$/кг (Pool, 1989). Компания Chemie Linz AG также начала производить П(ЗГБ) с использованием бактерий *Alcaligenes latus*, способных накапливать около 80 % П(ЗГБ), что позволило достичь объемов производства до 1000 т П(ЗГБ) в неделю (Hrabak, 1992). К началу XXI века свыше десяти крупных компаний производили полимеры на основе ПГА в промышленных масштабах, в том числе Polyferm Inc., Biotechnologische Forschung, Zeneca Bio Products и др. (Palmeiro-Sánchez, 2022).

Несмотря на открытие сотен различных микроорганизмов – естественных продуцентов ПГА, бурное развитие получили работы, направленные на создание генетически модифицированных продуцентов (Steinbüchel et al., 1998; Sudesh et al., 2000). Целью была оптимизация процесса за счет повышения выхода ПГА и эффективности биосинтеза. В 1987 году впервые были клонированы гены *Alcaligenes eutrophus* в *Escherichia coli* (Madison et al., 1999). Производство П(ЗГБ) также исследовано на генетически модифицированных растениях, среди которых *Arabidopsis thaliana*, хлопок и кукуруза (Chowdhury et al., 1998; Hahn et al., 1997; Poirier et al., 1995), однако это оказалось неперспективным.

Такие особенности ПГА, как способность к биологическому разложению и биосовместимость, делают их пригодными для широкого спектра применений в различных отраслях. Так, американская компания Metabolix производит полимерную смесь П(ЗГБ) и поли(3-гидроксигексаноат) (П(ЗГО)), которая используется в качестве пищевой добавки (Muneer et al., 2020). Другой полимер, произведенный той же компанией, – поли(3-гидоксибутират-*co*-3-гидроксивалерат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)), имеет широкий спектр применений, включая упаковочные материалы (Anjum et al., 2016). Поли(3-гидоксибутират-*co*-3-гидроксигексаноат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГГ)), синтезированный *A. hydrophila*, также используется для изготовления различных изделий – гибкой упаковки, синтетической бумаги и медицинских приборов (Możejko-Ciesielska et al., 2019). Немецкая компания Biomeг производит П(ЗГБ), синтезируемый бактериями *A. latus*, для

изготовления предметов бытового обихода (Philip et al., 2007). ПГА, разработанный Procter and Gamble и продаваемый под торговой маркой Nodax™, используется для изготовления медицинской и хирургической одежды, обивки мебели, ковров, упаковки (Anjum et al., 2016). Тем не менее, ввиду высокой стоимости ПГА, объемы производства упаковочных материалов и бытовых предметов остаются невысокими.

Наибольшую популярность ПГА получили в качестве материалов для медицины благодаря биосовместимости, способности к стимулированию роста костей и заживлению ран. Механические свойства этих полимеров в некоторой степени аналогичны свойствам кости, известно, что они способствуют пролиферации клеток и регенерации тканей. ПГА широко используются в качестве имплантатов, швов, костных пластин, стентов, адгезионных барьеров, устройств для восстановления хрящей (Chen, 2010). Первым фармацевтическим применением ПГА было использование в качестве носителей лекарств. Системы доставки лекарств, содержащие ПГА в качестве матрицы, используются для контролируемого поступления терапевтических средств (антибиотиков, иммуногенов, контрацептивов, гормонов) к месту назначения. Они также повышают биодоступность лекарств и легко выводятся, не вызывая какого-либо иммунного ответа или терапевтической токсичности. Такие системы доставки разработаны в форме микросфер, микрочастиц и наночастиц (Lu et al., 2011; Masood et al., 2015). ПГА интенсивно исследуются для применения в области тканевой инженерии: для восстановления сосудистых, кожных, нервных, хрящевых тканей, а также в тканевой инженерии пародонта (Masood et al., 2015). Композиты на основе ПГА широко используются в сердечно-сосудистой хирургии – для изготовления стентов и исправления дефектов межпредсердной перегородки (Dai et al., 2009).

Описано применение ПГА в аквакультуре для борьбы с патогенами. Обнаружено, что П(ЗГБ) нарушает развитие биопленки и уменьшает образование биомассы патогенов креветок, таких как *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. vulnificus* и *V. parahaemolyticus*; в экспериментах с нильской тилапией, инфицированной патогеном *Edwardsiella ictaluri* показано, что П(ЗГБ) повышает ее выживаемость (Kavitha et al., 2018). Кроме того, ПГА используются в качестве корма при выращивании рыбы (Asiri et al., 2020).

Весьма необычно применение ПГА в качестве противообрастающего агента. Биообрастание может вызвать серьезные осложнения в эксплуатации оборудования и негативно сказаться на экономике многих отраслей промышленности. К секторам, наиболее пострадавшим от биообрастания, относятся судоходная промышленность, опреснительные установки и подводные трубопроводы. Сообщалось, что нанокompозиты П(ЗГБ) могут быть использованы на корпусах судов для предотвращения биообрастания (Sirohi et al., 2020).

В России, в отличие от мировых трендов, исследования в области ПГА не так обширны. Помимо Института биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН» (ИБФ СО РАН), и Сибирского федерального университета (СФУ), сотрудниками которых инициированы многопрофильные исследования ПГА в РФ, изучением этих биопластиков занимаются лишь несколько научных коллективов. Это группа к.б.н. Г.А. Бонарцевой, ориентированная на синтез ПГА на сахарах азотфиксирующими микроорганизмами в ФИЦ «Биотехнологии»; кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ под руководством проф. К. В. Шайтана, где ПГА исследуются для депонирования лекарственных средств и в качестве матриксов в клеточных технологиях; Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. К.Г. Скрябина РАН (ИБФМ РАН), где под руководством проф. Ю. А. Троценко создан ряд генно-инженерных штаммов, и изучены закономерности синтеза ПГА метилотрофными бактериями. Под руководством проф. А. Л. Иорданского в ФИЦ химической физики им. Н. Н. Семенова РАН выполняются исследования по получению композитов на основе П(ЗГБ) с различными материалами. Все эти исследования выполняются на лабораторном уровне с использованием малых культивационных систем.

Прогресс исследований в области ПГА за последнее десятилетие огромен, о чем свидетельствует значительное увеличение числа публикаций. Были исследованы новые субстраты, новые продуценты ПГА, в том числе генетически модифицированные, многие компании начали промышленное производство этих полимеров. Тем не менее, ряд проблем, препятствующих успешной и широкомасштабной коммерциализации этих материалов, еще не преодолен.

1.2 Характеристика и биосинтез полигидроксиалканоатов

ПГА – это сложные полиэфиры гидроксиалкановых кислот, синтезируемые многими микроорганизмами. Обычно ПГА накапливаются в цитоплазме в виде нерастворимых включений диаметром от 0,2 до 0,5 мкм (Obrusa et al., 2020), но некоторые микроорганизмы могут секретировать эти полимеры во внеклеточную среду (Sabirova et al., 2006). ПГА могут накапливаться в различных фазах роста: в экспоненциальной фазе они образуются при благоприятных сбалансированных условиях (*A. latus*, *Azotobacter vinelandii* и *Actinobacillus sp.* (Pradhan et al., 2020)); в стационарной фазе ПГА синтезируются и запасаются при дефиците питательных веществ (азота, фосфора или кислорода) и избытке источника углерода (*Pseudomonas oleovorans* и *C. necator* (Khatami et al., 2021)). При исчерпании источника углерода

в питательной среде, ПГА деполимеризуются и используются продуцентами для поддержания жизнедеятельности (Anderson et al., 1990).

Полигидроксиалканоаты образованы мономерами гидроксикислот, которые соединены эфирной связью (Рисунок 1) (Philip et al., 2007).

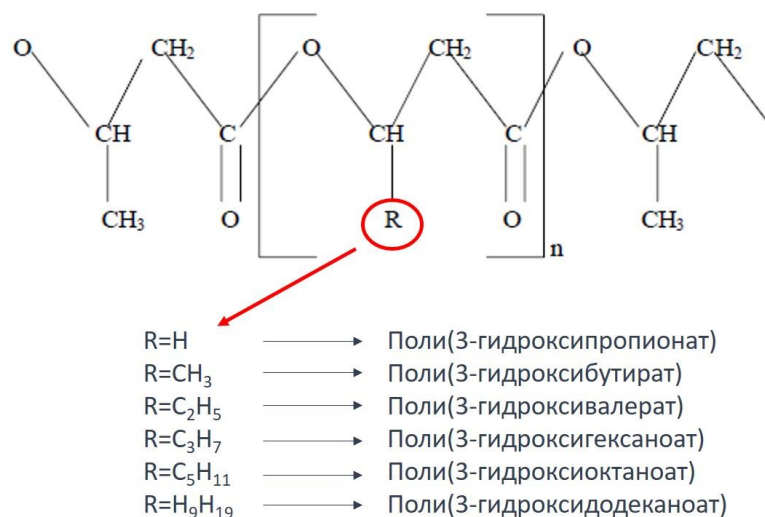


Рисунок 1 – Структура полигидроксиалканоатов

ПГА принято классифицировать на две группы по количеству атомов углерода в мономере: короткоцепочечные ПГА (C₃-C₅) и среднецепочечные ПГА (C₆-C₁₄) (Wang et al., 2017). В первую группу входят 3-гидроксibuтират (ЗГБ), 4-гидроксibuтират (4ГБ) и 3-гидроксивалерат (ЗГВ). Эти мономеры синтезируются многими бактериями, включая *Cupriavidus necator* (ранее *A. eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*). Во вторую группу входят, например, 3-гидроксигексаноат (ЗГГ) и 3-гидроксиоктаноат (ЗГО). Такие типы ПГА синтезируются и накапливаются в основном бактериями рода *Pseudomonas*. ПГА, содержащие более 14 атомов углерода, разнообразны – в их составе могут быть ароматические, галогенированные и другие мономеры, с насыщенными или ненасыщенными связями (Grigore et al., 2019). Кроме того, возможен синтез блок-сополимеров ПГА, которые состоят из чередующихся мономерных блоков, различающихся по составу и строению (Anjum et al., 2016).

Выделяют три основных пути биосинтеза ПГА в микроорганизмах (Рисунок 2). Первый путь протекает в три реакции и характерен для бактерий р. *Cupriavidus*. Фермент β -кетотиолаза (PhaA) катализирует первую реакцию – конденсацию двух молекул ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА. Для *C. necator* описано 14 изоформ β -кетотиолазы (Brigham et al., 2010), что обеспечивает этому таксону определенное преимущество в отношении других продуцентов, поскольку многие бактерии имеют в своем геноме только один или два гена, кодирующих этот фермент.

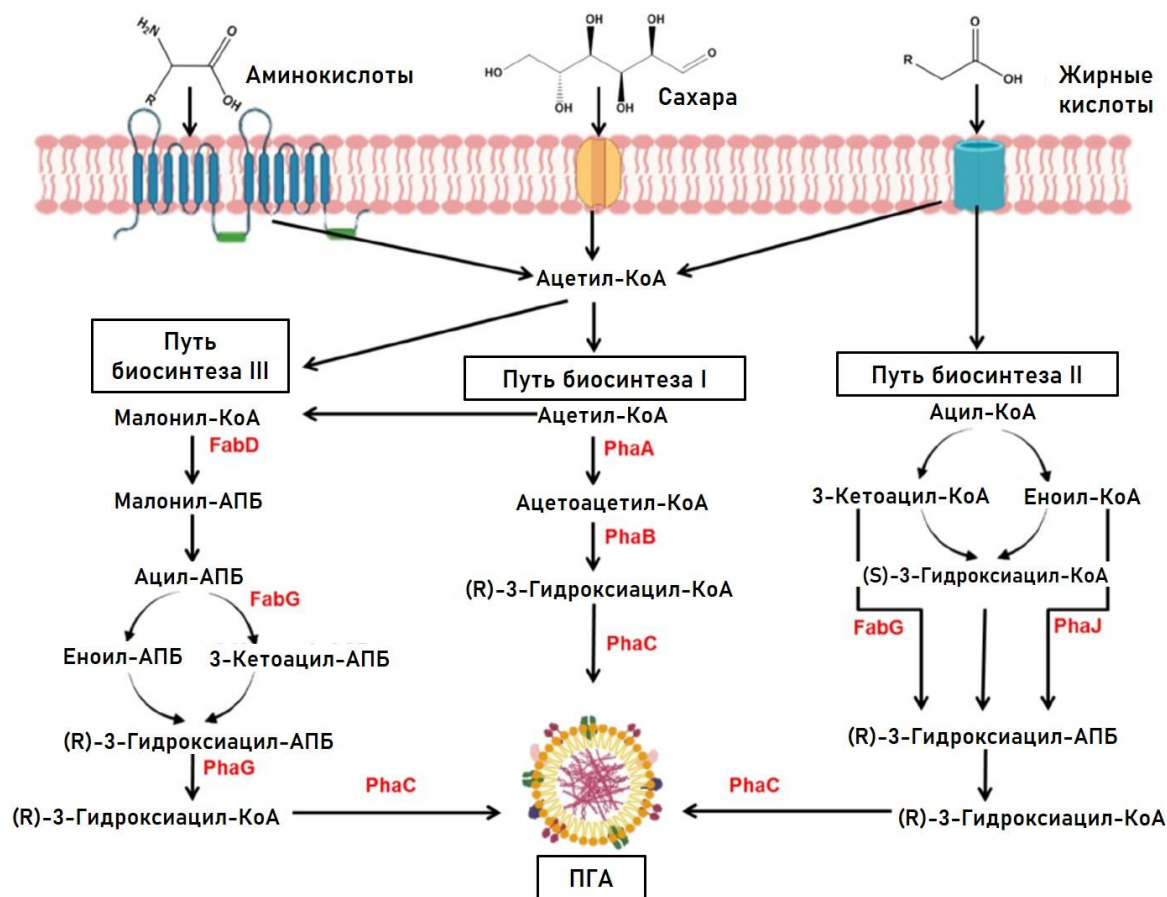


Рисунок 2 – Три основных пути биосинтеза полигидроксиалканоатов (Grigore et al., 2019)

Во второй реакции ацетоацетил-КоА восстанавливается до (R) -3-гидроксибутирил-КоА под воздействием ацетоацетил-КоА-редуктазы с использованием НАДФН в качестве кофактора. На третьем этапе происходит полимеризации мономеров ключевым ферментом ПГА-синтазой (PhaC). При полимеризации П(ЗГБ) первая молекула (R) -3-гидроксибутирил-КоА входит в активный центр фермента, далее вторая молекула (R) -3-гидроксибутирил-КоА присоединяется к терминальной гидроксильной группе первой молекулы. Цикл повторяется с вновь поступившим (R) -3-гидроксибутирил-КоА (Grigore et al., 2019).

Синтез ПГА по второму пути связан с утилизацией жирных кислот микроорганизмами. После β -окисления жирных кислот полученный ацил-КоА используется для образования мономеров ПГА. В реакциях участвуют такие ферменты как 3-кетоацил-КоА-редуктаза, эписмераза, (R) -еноил-КоА-гидратаза / еноил-КоА-гидратаза I, ацил-КоА-оксидаза. Молекула 3-гидроксиацил-КоА функционирует в качестве молекулы-предшественника для синтеза ПГА. Многие микроорганизмы, включая *P. putida*, *P. aeruginosa* и *A. hydrophila*, синтезируют среднецепочечные ПГА, используя именно этот метаболический путь (Manoli et al., 2020).

Третий путь биосинтеза ПГА требует наличия двух ключевых ферментов: 3-гидроксиацил-АПБ-КоА трансферазы (PhaG) и малонил-КоА-АПБ трансацилазы (FabD). Эти

ферменты катализируют образование 3-гидроксиацил-АПБ, который далее превращается в 3-гидроксиацил-КоА, впоследствии полимеризуясь ПГА-синтазой (Zhang et al., 2020).

Исследования различных видов бактерий показали, что число генов, связанных с синтезом ПГА, может превышать 59 единиц. Количество генов ПГА-синтазы варьируется у разных видов, но обычно каждая бактерия содержит по крайней мере две копии этого гена. Структурная организация оперона, контролирующего синтез ПГА, также различается (Muneer et al., 2020). Например, у *Acinetobacter sp.*, *A. latus*, *P. acidophila* и *R. eutropha*, гены *phaCAB* находятся в тандеме, но расположены в различном порядке (Рисунок 3). У *Paracoccus denitrificans*, *Rhizobium meliloti* и *Zoogloea ramigera* гены *phaAB* и *phaC* разделены и не связаны друг с другом.

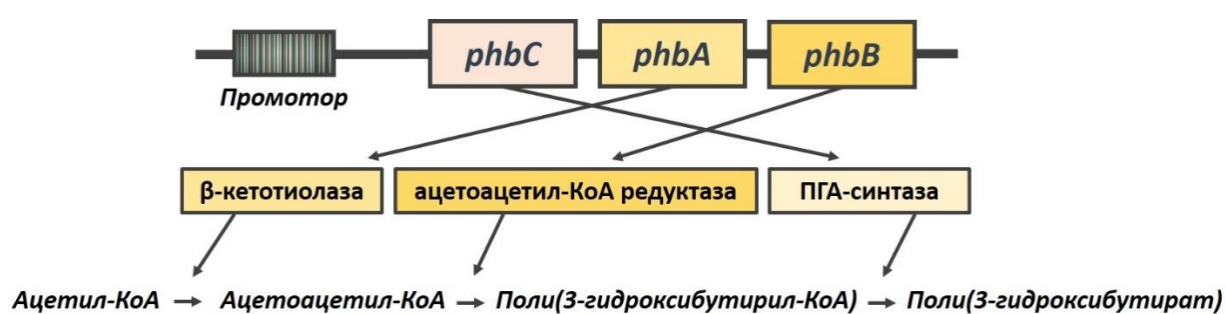


Рисунок 3 – Структура оперона *phbCAB* и продукты его генов

ПГА накапливаются внутриклеточно в виде включений, представленных гранулами. Эти гранулы ограничены слоем фосфолипидов, на их поверхности располагаются ферменты и белки, вовлеченные в процесс биосинтеза и деградации ПГА (ПГА-полимеразы, ПГА-деполимеразы, фазины PhaI и PhaF и другие белки) (Рисунок 4).

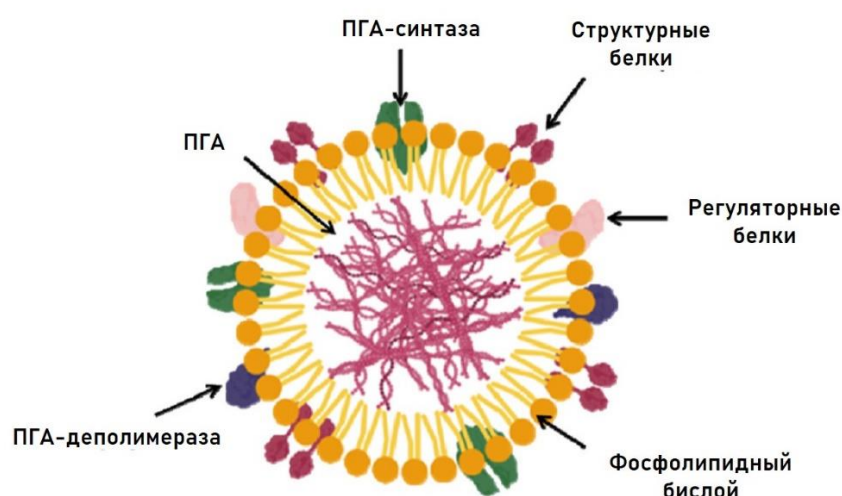


Рисунок 4 – Схематическое строение гранулы ПГА (Behera et al., 2022)

Структурный анализ состава внутриклеточных гранул ПГА показал, что они состоят на 97,5 % из ПГА, а остальная часть приходится на белки и фосфолипиды (Jendrossek et al., 2014). Наиболее распространенными соединениями, связанными с гранулами, являются фазины – группа низкомолекулярных белков. Это метаболически активные регуляторные белки, они организуют полимер в сложные субклеточные образования, описываемые в литературе как карбоносомы. Процесс гранулообразования ПГА до конца не изучен. Согласно мицеллярной модели, ввиду гидрофобности и низкой растворимости П(ЗГБ) в водной среде, вновь образованные полимерные цепи-агрегаты образуют мицеллоподобные структуры в цитоплазме с расположенными на поверхности молекулами ПГА-синтаз (Stubbe et al., 2005). Согласно «Budding-модели», ПГА-синтаза расположена в цитоплазматической мембране или прикреплена к ней, а растущая цепь полимера образует агрегаты, связанные с мембраной. После объединения нескольких агрегатов, к ним присоединяются фазины и другие элементы, образуя гранулы. «Scaffold-модель» предполагает, что ПГА-синтаза прикреплена к некой scaffold-молекуле внутри клетки. В этом случае субклеточная локализация гранул будет зависеть от природы и локализации scaffold-молекулы (Beeby et al., 2012).

Как упоминалось выше, основной целью накопления ПГА в микробных клетках является обеспечение их питательными веществами (углеродом) и энергией, необходимыми для поддержания жизнедеятельности в условиях дефицита питательных веществ (Koller et al., 2011). Утилизация ПГА микроорганизмами происходит путем их деполимеризации (Anis et al., 2017), которая катализируется внутриклеточной ПГА-деполимеразой (PhaZs).

1.3 Штаммы-продуценты полигидроксиспиртов

Промышленное производство ПГА ограничивается высокой стоимостью, поэтому многие исследования сосредоточены на снижении затрат путем привлечения высокопродуктивных штаммов (Koller et al., 2017). Выбор продуцента определяется двумя основными факторами: продукционные характеристики (скорости роста бактерий и синтеза ПГА, содержание ПГА) и его органотрофный потенциал (способность использовать широкий спектр источников углерода, в том числе недорогих). Кроме этого, необходимо учитывать процессы экстракции и очистки синтезированных ПГА поскольку они также влияют на общую экономику (Yamane, 1993).

К настоящему времени описаны сотни организмов, способных синтезировать различные типы ПГА: бактерии, археи, грибы, дрожжи, цианобактерии и водоросли (Anitha et al., 2021). Наиболее изученными являются бактерии, принадлежащие родам *Alcaligenes*, *Cupriavidus*,

Aeromonas, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Methylobacterium*, *Haloferax*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Bacillus*. Однако использование большинства из них в промышленных масштабах не представляется возможным, поскольку их способность синтезировать ПГА недостаточна.

Бактерии *A. eutrophus* – одни из первых промышленных и наиболее эффективных продуцентов ПГА. Показано, что они способны накапливать до 76 % П(3ГБ) внутриклеточно в периодическом культивировании с подпиткой при использовании глюкозы в качестве основного источника углерода, а также до 110 г/л сополимера П(3ГБ-*co*-3ГВ) (Kim et al., 1994). Бактерии р. *Burkholderia* способны усваивать до тридцати различных источников углерода в качестве субстратов и косубстратов для биосинтеза различных типов ПГА (Mendonça et al., 2014). Также известно, что многие азотфиксирующие микроорганизмы синтезируют П(3ГБ) (Tombolini et al., 1989). Это особенно характерно для аэробных азотфиксирующих бактерий, принадлежащих семейству *Azotobacteraceae*. Сообщается, что *Azotobacter vinelandii* усваивает около 60 различных источников углерода, включая моно- и дисахариды, сахарные спирты и амины, органические кислоты, фенолы и углеводороды (Thompson et al., 1979). Биосинтез ПГА показан для таксона метилотрофов, успешно метаболизирующих метанол и его смеси с пентанолом (Галузина и др., 2015). *Methylobacterium* sp. GW2 синтезируют П(3ГБ) и сополимер П(3ГБ-*co*-3ГВ) (Możejko-Ciesielska et al., 2016). Весьма перспективным продуцентом ПГА являются бактерии рода *Pseudomonas*: показано накопление до 50 % ПГА к АСБ (абсолютно сухой биомассе) бактериями *P. pseudoflava*, *P. cepacia*, *P. mosselli* при культивировании на различных источниках углерода (Chen et al., 2014).

Среди галофилов также есть бактерии, способные к синтезу различных ПГА, в том числе в экстремальных условиях. *Halomonas boliviensis*, *H. profundus*, *Haloferax mediterraneus* описаны как микроорганизмы, накапливающие ПГА до 20-60 % к АСБ (Thuoc et al., 2008). Следует отметить, что экстремофильные продуценты представляют собой перспективную группу ПГА-продуцентов, поскольку соблюдение дорогостоящих условий культивирования, в частности асептики, не обязательно. Галофилы широко изучаются ввиду того, что высокая соленость предотвращает перекрестное загрязнение, обеспечивая при этом недорогие методы экстракции. Тем не менее, несмотря на огромное количество описанных ПГА-синтезирующих микроорганизмов, множество видов, являющихся продуцентами ПГА, остаются неизвестными до сих пор. В дополнение к природным штаммам-продуцентам ПГА активно разрабатываются генетически модифицированные штаммы. Природные штаммы *E. coli* неспособны к продукции ПГА, но инструменты генной инженерии позволили создать на основе этих бактерий перспективных промышленных продуцентов. Гены, регулирующие биосинтез ПГА, были выделены из *C. necator* (Hornig et al., 2010), *Thiocapsa pfennigii* (Liu et al., 2000) и *Streptomyces aureofaciens* (Mahishi et al., 2003) и введены в *E. coli*. Это позволило получить перспективные

генно-инженерные штаммы-продуценты ПГА, накапливающие до 90 % ПГА внутриклеточно (Wang et al., 2009).

Помимо бактерий, описано использование красных морских водорослей (*Kappaphycus alvarezii* и *Gelidium amansii*) и зеленых макроводорослей *Ulva* для синтеза ПГА (Ghosh et al., 2019). Цианобактерии также способны синтезировать П(ЗГБ) – впервые эта способность была показана для *Chlorogloea fritschii* (Carr, 1966), а позже для *Spirulina sp.*, *Gloeotheca sp.*, *Aphanothece sp.* и *Synechococcus sp.* (Carpine et al., 2020). Существуют данные о биосинтезе ПГА у различных видов грибов. Большинство подобных исследований проведено на дрожжах. Впервые синтез ПГА у грибов показан для *Saccharomyces cerevisiae* (Nutti et al., 1974), позже – для *Rhodotorula minuta*, *Wickerhamomyces anomalus* и др. (Desuoky et al., 2007; Ojha et al., 2018). Кроме этого, структуры, напоминающие гранулы П(ЗГБ), также были обнаружены в клетках человека (Elustondo et al., 2012).

1.4 Источники углерода для биосинтеза полигидроксиалканоатов

Ключевой проблемой биотехнологии ПГА является высокая стоимость их получения. Решение этой проблемы лежит в привлечении доступного углеродного сырья. ПГА-синтазы обладают широкой субстратной специфичностью, что позволяет использовать разнообразные углеродные субстраты для биосинтеза ПГА. Помимо таких источников углерода, как сахара, амины, органические кислоты, фенолы, углеводороды, были исследованы более сложные и многокомпонентные субстраты – органические отходы, агроотходы, сточные воды, животные жиры, отработанные растительные масла (Sathya et al., 2018).

Большинство продуцентов ПГА способны метаболизировать углеводы. «Классическими» углеводами, позволяющими достигать высоких выходов ПГА, считаются фруктоза и глюкоза, которые утилизируются микроорганизмами по пути Энтнера-Дудорова (2-кето-3-дезоксиглюконоатный путь). Например, *C. necator*, модельный организм-продуцент ПГА, способен синтезировать до 80-90 % П(ЗГБ) при культивировании на фруктозе (Anderson et al., 1990). Несмотря на высокие выходы ПГА при использовании сахаров, эта группа субстратов значительно повышает стоимость их синтеза.

Растительные масла являются менее дорогими источниками углерода для биосинтеза ПГА. Использование растительных масел обеспечивает более высокие выходы ПГА по сравнению с сахарами. Теоретический коэффициент выхода ПГА на растительных маслах может достигать 0,65-0,70 г ПГА / г масла, ввиду наличия в молекулах масел большего количества

атомов углерода, это способствует снижению стоимости производства (Akiyama et al., 2003; Alias et al., 2005). Теоретически молекула глюкозы или фруктозы, содержащая шесть атомов углерода, метаболизируется с образованием двух ацетил-КоА и двух молекул диоксида углерода, что приводит к образованию одного мономера 3ГБ. Молекула линолевой кислоты, входящая в состав многих растительных масел, метаболизируется по пути β -окисления с образованием девяти ацетил-КоА, что способствует образованию большего количества мономеров 3ГБ (Akiyama et al., 2003; Kahar et al., 2004). Для синтеза ПГА при использовании масел или жиров требуются микроорганизмы, обладающие липазной активностью. В отличие от сахаров, такие субстраты состоят в основном из триацилглицеридов (ТАГ), состоящих из глицерина и трех остатков жирных кислот. ТАГ утилизируются бактериями посредством секреции липаз, которые последовательно гидролизуют масло в диглицериды (ДАГ), моноглицериды (МАГ), глицерин и свободные жирные кислоты (СЖК), которые переносятся в клетку и метаболизируются по пути β -окисления (Brigham et al., 2010; Kahar et al., 2004). Ферментативная система, ответственная за утилизацию ТАГ, была описана для *C. necator* H16. Она включает два основных компонента: неспецифическую внеклеточную липазу (LipA) и липазоспецифичную фолдазу (LipB). Показано, что высвобождающиеся жирные кислоты (ЖК) действуют как поверхностно-активные вещества и, следовательно, обеспечивают эмульгирование масла и делают ТАГ восприимчивыми к действию липаз (Lu et al., 2013).

Для биосинтеза ПГА исследованы различные растительные масла: соевое (Kahar et al., 2004), пальмовое, оливковое, подсолнечное, кокосовое (Lee et al., 2008), кукурузное (Fukui et al., 1998). Пальмовое масло обычно получают из плодов масличной пальмы, оно широко используется в пищевой промышленности для производства маргарина и в качестве жира для жарки пищевых продуктов, отходы которого также интересны с точки зрения биосинтеза ПГА. В состав этого масла по большей части входят ЖК с 16 и 18 атомами углерода, такие как пальмитиновая, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты. Однако из плодов масличной пальмы можно извлечь два отдельных типа масел: сырое пальмовое масло (СПМ) из мезокарпия и сырое пальмоядровое масло (СПЯМ) из косточек, которые отличаются по жирнокислотному составу (Basiron, 2007). Оба типа этих масел рассматриваются для синтеза ПГА. *C. necator* H16 показал высокую продуктивность при росте на СПМ – получено 4,6 г/л биомассы с внутриклеточным содержанием П(3ГБ) 75 % (Lee et al., 2008). При использовании СПЯМ в качестве углеродного субстрата также были достигнуты высокие выходы биомассы и ПГА как среди природных штаммов – культивирование *C. necator* H16 позволило получить 5,5 г/л биомассы и 75 % ПГА (Lee et al., 2008), так и при использовании рекомбинантных – выходы биомассы *C. necator* Re2160/pCB113 достигали 5,0 г/л биомассы, содержащей 77 % ПГА (Wong et al., 2012). В качестве субстрата для синтеза ПГА также исследован пальмовый олеин,

получаемый путем фракционирования пальмового масла. Урожай биомассы и содержание ПГА при культивировании *C. necator* H16 на этом субстрате достигали 5,2 г/л и 70 %, соответственно (Lee et al., 2008). В качестве доступных с экономической точки зрения субстратов для синтеза ПГА рассматривались и другие пищевые масла, среди которых соевое, кукурузное, кокосовое, оливковое, подсолнечное и рапсовое, однако, данные крайне ограничены и варьируют даже в пределах одного штамма-продуцента. Помимо традиционных масел, широко известных и производимых в больших количествах, интерес представляют масла, получаемые из других культур. Такие масла объединяет важное преимущество – они не востребованы в качестве пищевых масел и их использование для синтеза ПГА не представляет какой-либо проблемы с точки зрения пересечения сфер использования. Так, например, масло из семян финиковой пальмы является съедобным, но непригодно для использования в пищевой промышленности ввиду низкого содержания масла в семенах по сравнению с другими масличными культурами (Al-Shahib et al., 2003). Тем не менее, этот тип масла также был рассмотрен в качестве субстрата для синтеза ПГА: показано, что *C. necator* H16 способен к росту и синтезу ПГА на финиковом масле, при выходе биомассы 14,4 г/л и П(ЗГБ) до 82 % к АСБ (Yousuf et al., 2017).

Именно жирные кислоты в составе масел выступают источником углерода для продуцентов, поэтому они рассматриваются в качестве отдельных субстратов для синтеза ПГА. ЖК метаболизируются по пути β -окисления, где в ходе одного цикла ЖК теряет два углеродных атома в виде ацетил-КоА, который является основным строительным блоком для синтеза ЗГБ (Budde et al., 2011). Например, при утилизации одной молекулы лауриновой кислоты образуется шесть молекул ацетил-КоА, которые обеспечивают синтез трех мономеров ЗГБ (Sudesh, 2013). Жирные кислоты могут оказывать значительное влияние на рост бактерий и синтез ПГА, в зависимости от типа жирной кислоты, ее концентрации и конкретного продуцента. Жирные кислоты как субстрат для синтеза ПГА рассмотрены в ряде работ. Лауриновая кислота, будучи относительно недорогим субстратом, который можно получить как отход производства растительного масла, утилизируется штаммом *Alcaligenes* sp. АК 201 для синтеза П(ЗГБ). Синтез П(ЗГБ) на миристиновой (C14:0), пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) жирных кислотах показан для штамма *C. necator* DSM 545 (Povolo et al., 2015). Более детально изучено использование мононенасыщенной олеиновой кислоты, являющейся преобладающим компонентом в составе многих растительных масел (рапсовом, соевом и др.) (Grigull et al., 2008; Eggink et al., 1992). Применение олеиновой кислоты в комбинации с сахарами показано в культуре штамма *R. eutropha* DSM 545, однако выходы биомассы и ПГА были невысоки (1,02-6,96 г/л и до 28,3 %, соответственно) (Grigull et al., 2008).

В последние годы наблюдается растущая тенденция к использованию дешевого сырья для биосинтеза ПГА – отходов различных производств, в частности жиросодержащих. Отсутствие

рациональной технологии переработки жиросодержащих отходов является проблемой в пищевой промышленности. Количество отработанного жира ежегодно на земном шаре составляет около 29 млн т (Maddikeri et al., 2012). Вовлечение отходов в качестве сырья для синтеза целевых продуктов обеспечивает повышение эффективности промышленных производств, так как способствует более полному и комплексному использованию сырьевых ресурсов.

Отходы в виде животных жиров из пищевой промышленности и убоя скота обладают потенциалом в качестве сырья для синтеза ПГА. Одной из серьезных проблем их применения является высокая гидрофобность, что затрудняет их утилизацию микроорганизмами. Помимо этого, животные жиры обладают высокой температурой плавления ($T_{пл}$), до 55°C, что также осложняет их использование в качестве углеродных субстратов. В работе Riedel S. L. et al., 2015 авторы увеличили доступность животных жиров для бактерий путем добавления эмульгатора – гуммиарабика (Riedel et al., 2015). При культивировании природного штамма *R. eutropha* H16 на животных жирах различного происхождения (домашняя птица, свиной жир, жир крупного рогатого скота и их смеси) было получено 4,0-4,5 г/л биомассы и 72,0-75,3 % П(ЗГБ). Также было исследовано использование сала крупного рогатого скота: выход биомассы составил всего 2,5 г/л, а содержание полимера – 61,3 % (Riedel et al., 2016).

Проблема эффективного использования жиросодержащего сырья актуальна для рыбоперерабатывающей отрасли. Общее потребление рыбы в мире в 2020 году составило свыше 70 млн т (Kratky et al., 2020). В больших количествах производятся рыбные субпродукты, в которые перерабатывается от 20 до 80 % веса рыбы. Таким образом, в процессе переработки рыбного сырья образуется много отходов, значительная часть которых уносится с промывной водой, что оказывает существенное влияние на сточные воды и приводит к образованию специфических осадков. В среднем доля жиросодержащих отходов оценивается в 60 % от объема производимых рыбных продуктов (Alfio et al., 2021). Жиросодержащие отходы рыбоперерабатывающей отрасли могут стать перспективным, крупномасштабным и дешевым источником сырья для биотехнологического синтеза микробных ПГА. Однако исследования этого субстрата для синтеза разрушаемых биопластиков были развернуты лишь в последние годы. В работе (Ashby et al., 2008) исследован синтез ПГА с использованием сырого жира минтая Аляски. Этот тип субстрата выбран авторами статьи, исходя из того, что доля потребления этой рыбы в США высока, при этом до 60-70 % (включая внутренности, головы, кожу и т.д.) от массы рыбы остается как побочный продукт. В попытке переработать этих побочные продукты исследован синтез ПГА шестью штаммами *Pseudomonas*. Накопление ПГА было различным, от 6 до 53 %. Все полимеры относились к классу среднецепочечных ПГА, в основном состояли из мономеров 3-гидроксиоктановой кислоты и 3-гидроксидекановой кислоты в количестве не менее 75 мол.%. В работе (Mohapatra et al., 2017) исследован синтез П(ЗГБ) на экстракте твердых

рыбных отходов в культуре штамма *B. subtilis* (KP172548): получены выходы биомассы и полимера до 2,3 г/л и 70 % соответственно. В другой работе (Thuoc et al., 2019) исследован рост умеренно галофильной бактерии *Salinivibrio* sp. M318 и синтез ПГА на смеси отработанного рыбьего жира и глицерина, получены высокие выходы по биомассе и полимеру, соответственно, 69,1 г/л и 51,5 %. Этим же коллективом (Thuoc et al., 2021) исследован синтез ПГА на сыром рыбном жире в культуре 15 изолятов бактерий рода *Ralstonia*. Наиболее результативный штамм M91 за 48 ч культивирования накапливал до 10 г/л биомассы с содержанием П(ЗГБ) 51,7 %. Еще в одной работе этого коллектива (Loan et al., 2022) исследовано использование отработанного рыбьего жира рыбы Баса (*Pangasius bocourti*) и отработанного кулинарного жира: показано, что штамм *C. necator* H16 в лабораторной культуре синтезировал до 72-76 % гомополимера П(ЗГБ). Эти немногочисленные результаты обнадеживают и показывают, что жиросодержащие отходы рыбопереработки могут стать доступным и крупнотоннажным субстратом для биосинтеза ПГА. Низкая стоимость отходов рыбопереработки, значительная часть которых не утилизируется и выбрасывается, а также высокая эффективность трансформации жиров в целевой продукт – основа для налаживания биотехнологического производства ПГА, стоимость которого будет существенно ниже, чем при использовании индивидуальных субстратов, в основном, сахаров.

Углеродный субстрат, оказывает существенное влияние не только на продукционные показатели культуры бактерий, но и на мономерный состав синтезируемых ПГА. Внесение в питательную среду субстратов-предшественников (прекурсоров) обеспечивает включение целевых мономеров, определяющих свойства конечного продукта и возможные области его применений. В отличие от гомополимера П(ЗГБ), характеризующегося хрупкостью и относительной термической нестабильностью, наличие мономеров, отличных от ЗГБ, улучшает физико-механические свойства ПГА, облегчая их переработку в изделия и тем самым расширяя потенциал применения. Ввиду наличия аморфных доменов в таких сополиэфирах, они лучше поддаются биодegradации *in vivo*, имеют более низкую температуру плавления, пониженную степень кристалличности, большую упругость и эластичность (Koller et al., 2017; Lee et al., 2008). Увеличение доли включений таких мономеров является важной задачей, решение которой позволит расширить сферу применения ПГА.

Двухкомпонентные сополимеры П(ЗГБ-со-ЗГВ), синтезируемые, например, *C. necator* или *Burkholderia sacchari*, при использовании разнообразных углеродных субстратов и предшественников исследованы достаточно широко (Oliveira-Filho et al., 2021). Этот тип сополимеров отличается повышенной прочностью и улучшенными механическими свойствами по сравнению с П(ЗГБ). Физические и механические свойства П(ЗГБ-со-ЗГВ) в значительной степени зависят от содержания в них мономеров ЗГВ. Например, степень кристалличности и температура плавления сополимеров снижаются с увеличением доли ЗГВ (Rivera-Briso et al.,

2018). П(3ГБ-со-3ГВ) синтезируется различными микроорганизмами, но наиболее часто используются бактерии *C. necator* (Kim et al., 1994; Lee et al., 2008), поскольку способны накапливать до 80-90 % ПГА. Среди других таксонов синтез П(3ГБ-со-3ГВ) исследован бактериями родов *Haloferax*, *Bacillus*, *Methilobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillaceae* и др. (Hou et al., 2013). Крайне мало изучена связь между продукционными показателями культуры, составом и свойствами ПГА, содержащих мономеры 3ГВ, в зависимости от комбинации основного углеродного субстрата и прекурсора. Имеющиеся отрывочные и не свободные от противоречий данные показывают, что основной источник углерода оказывает влияние на выходы биомассы бактерий и ПГА, а также на состав и свойства синтезируемых полимеров. В работе (Huong et al., 2017) исследовано применение различных ЖК в комбинации с прекурсорами 3-гидроксивалерата в культуре штамма *Cupriavidus* sp. USMAA1020. Наиболее высокие выходы биомассе (9,2-10,5 г/л) и ПГА (до 78 %) были получены при использовании олеиновой кислоты, на других ЖК эти показатели были ниже (1,3-4,3 г/л и 5-34 %, соответственно). При использовании смеси отработанного рыбного жира и глицерина как основного субстрата и валерата, пропионата и гептаноата натрия как прекурсоров, штамм *Salinivibrio* sp. M318, синтезировал сополимер П(3ГБ-со-3ГВ) с содержанием 3ГВ 13,3-24,7 мол.% (Thuoc et al., 2019).

Отдельный интерес представляют ПГА, содержащие помимо 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата мономеры 4-гидроксивалерата (4ГВ). Этот тип сополимеров малоизучен и относится к «необычным» ПГА. Присутствие в основной углеродной цепи ПГА мономеров 3ГВ и 4ГВ также влияет на физико-химические и механические свойства, облегчая переработку в изделия и, следовательно, расширяя потенциал применения ПГА (Ng et al., 2010). Показано, что даже небольшое содержание мономеров 3ГВ и 4ГВ (до 10 мол.%) способствует снижению температуры плавления, стеклования и степени кристалличности, а также повышает гибкость ПГА (Koller et al., 2017; Lee et al., 2008). В отличие от хорошо изученных двухкомпонентных сополимеров, синтез П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) исследован ограничено. Синтез этого типа сополимеров исследован при использовании в качестве прекурсора γ -валеролактона. Бактерии *A. eutrophus* H16 синтезировали сополимер, с содержанием 3ГВ и 4ГВ до 54,1 и 4,9 мол.% соответственно (Valentin et al., 1992). Бактерии *C. necator* USMAA2-4 при росте на олеиновой кислоте синтезировали аналогичный тип ПГА с высокими включениями мономеров 3ГВ (до 91 мол.%), но низким содержанием мономеров 4ГВ (1-2 мол.%) (Muzaiyanah et al., 2013).

Поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират) (П(3ГБ-со-4ГБ)) – еще один тип сополимерных ПГА, который востребован и активно изучается. Различное содержание мономеров 4ГВ в сополимере позволяет получать материалы с широкой вариабельностью физико-химических и механических свойств (Lee et al., 2004). Эти сополимеры имеют пониженные значения степени кристалличности, а изделия из них характеризуются наибольшей

эластичностью (удлинение при разрыве на порядки выше значений у других ПГА). Например, прочность на разрыв П(ЗГБ-*co*-4ГБ), содержащего 64-100 мол.% 4ГБ, возрастает с 17 до 104 МПа по мере увеличения доли 4ГБ (Saito et al., 1994). Температурные характеристики и механические свойства П(ЗГБ-*co*-4ГБ) также напрямую зависят от содержания 4ГБ в сополимере и могут изменяться в широких пределах (Saito et al., 1994). Включение мономеров 4ГБ в состав ПГА впервые было показано в культуре бактерий *A. eutrophus*, выращенной на 4-гидроксимасляной кислоте как единственном источнике углерода (Doi et al., 1988). Позже способность к синтезу этих сополимеров была показана у *A. latus* (Kang et al., 1995), *C. acidovorans* (Saito et al., 1994), *C. testosteronii* (Renner et al., 1996) и др. Для синтеза П(ЗГБ-*co*-4ГБ) в качестве прекурсоров исследованы алкандиолы с различной длиной цепи (1,4-бутандиол, 1,6-гександиол, 1,8-октандиол, 1,10-декандиол, 1, 12-додекандиол), γ -бутиролактон, соли 4-гидроксимасляной кислоты (Chanprateep et al., 2010). Однако, достижение высокого содержания 4ГБ в большинстве случаев проблематично и сопровождается снижением показателей продуктивности из-за токсического действия используемых прекурсоров. Лишь в немногих исследованиях показан выход бактериальной биомассы более 10,0 г/л при внутриклеточном содержании сополимера более 50 %. В работе (Thuoc et al., 2019) исследован синтез П(ЗГБ-*co*-4ГБ) галофильной бактерией *Salinivibrio* sp. M318 при росте на смеси отработанного рыбного жира и глицерина (основной источник углерода) в присутствии 4-бутандиола, γ -бутиролактона или 4-гидроксibuтирата натрия (прекурсоры 4ГБ). Синтезированный сополимер П(ЗГБ-*co*-4ГБ) (до 50 % к АСБ) содержал до 5,9 мол.% мономеров 4ГБ.

Еще один тип необычных сополимеров представляют собой серосодержащие ПГА – политиоэфиры (ПТЭ), в составе которых атомы серы расположены в основной углеродной цепи. ПТЭ отличаются от других типов ПГА: они характеризуются более сложными процессами кристаллизации по сравнению с другими типами ПГА, но проявляют более высокую термическую стабильность. Некоторые ПТЭ, в частности поли(3-меркаптопропионат) (П(ЗМП)), характеризуются отсутствием способности к биодegradации, но обладают антибактериальными свойствами (Kawada et al., 2003; Tanaka et al., 2004). В отличие от гомополимера П(ЗМП), сополимер поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-меркаптопропионат) (П(ЗГБ-*co*-ЗМП)) поддается биодegradации (Elbanna et al., 2003; 2004). Однако, синтез этих сополимеров изучен мало. Показано, что при росте на глюконовой кислоте и глюконате натрия в присутствии 3-меркаптопропионовой кислоты (прекурсор ЗМП) штамм *R. eutropha* H16 синтезирует П(ЗГБ-*co*-ЗМП) с содержанием мономеров ЗМП от 4,6 до 42,5 мол.% (Lutke-Eversloh et al., 2001; 2002). Литературные данные о синтезе этого типа ПГА на жиросодержащих субстратах отсутствуют.

Для эффективного биосинтеза различных сополимеров чрезвычайно важно не только достичь высокого содержания целевых мономеров, но и поддерживать высокие уровни как

концентрации биомассы, так и содержания полимера, минимизируя ингибирующие эффекты предшественников. Это делает актуальным поиск комбинаций основного углеродного субстрата и субстрата-прекурсора.

1.5 Свойства полигидроксиалканоатов

Уникальность полигидроксиалканоатов обусловлена их свойствами, в первую очередь, – это биосовместимость и способность к естественной биodeградации. Полимерные биоматериалы, используемые в медицине, в первую очередь должны обладать именно этими свойствами, поскольку напрямую контактируют с тканями организма. ПГА не вызывают негативной реакции со стороны организма, что отличает их от других полимеров (Williams, 2008), это обеспечило их применимость в клинической практике. В частности, это обусловлено тем, что 3-гидроксимасляная кислота (ЗГБ) является нормальным метаболитом, обнаруживаемым в крови человека (Mierziak et al., 2021). Биосовместимость ПГА была доказана в том числе на примере смесей П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) и поли(молочной кислоты). Исследования на фибробластах человека подтвердили высокую биосовместимость материала, о чем свидетельствовала активная пролиферация клеток (Hufenus et al., 2012).

Способность ПГА к биологическому разложению в различных условиях окружающей среды делает их уникальными по сравнению с другими полимерами. Микроорганизмы синтезируют внеклеточные ферменты, такие как ПГА-деполимеразы или ПГА-гидролазы, которые и обеспечивают деградацию ПГА. Семейства бактерий *Pseudonocardiaceae*, *Streptosporangiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae* и *Thermomonosporaceae* являются наиболее активными деструкторами П(ЗГБ) в экосистемах (Verlinden et al., 2007). Благодаря этой особенности ПГА рассматриваются в качестве «зеленой» альтернативы синтетическим полиолефинам.

Молекулярная масса ПГА является одним из важнейших факторов, определяющих их свойства, поскольку дает информацию о длине полимерных цепей и степени полимеризации, что влияет на механические свойства и биоразлагаемость. Детальные исследования молекулярной массы ПГА, весьма ограничены, несмотря на то что это базовая характеристика, влияющая на конечное применение этих полимеров. Молекулярные свойства ПГА – это весьма переменный параметр, который зависит от множества факторов, включая штаммовую специфику продуцента, тип и концентрацию источника углерода, активность ферментов цикла ПГА, условия культивирования, а также способ экстракции (Anderson et al., 1992; Tsuge, 2016). Обычно,

средневесовая (M_v) молекулярная масса ПГА находится в диапазоне от 10-50 до 3000 кДа (Sudesh et al., 2000). Предпочтительными являются ПГА с высокой молекулярной массой, поскольку показана корреляция между этим показателем и механической прочностью: при значениях средневесовой молекулярной массы менее 200 кДа полимер становится хрупким (Сох, 1994). Известно, что влияние источника углерода на молекулярную массу синтезируемых ПГА значительно. Штамм *Alcaligenes sp.* АК 201 на лауриновой кислоте синтезировал П(ЗГБ) со средневесовой молекулярной массой 304 кДа и полидисперсностью ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) 1,9, при росте на миристиновой кислоте эти показатели составили 1416 кДа и 3,1 соответственно, а при использовании стеариновой кислоты – 986 кДа и 1,9 (Akiyama et al., 1992). На величину молекулярной массы оказывает влияние не только источник углерода, но и его концентрация. Для штамма *Methylobacterium extorquens* NCIMB 9133 показано, что при увеличении концентрации метанола с 4,0 до 11,9 г/л средневесовая молекулярная масса снижается с 600 до 217 кДа (Taidi et al., 1994). В работе (Kawaguchi et al., 1992) показано, что молекулярно-массовое распределение П(ЗГБ), синтезируемого *R. eutropha* зависит от концентрации биогенных элементов (азота, магния, фосфора), а также от возраста культуры.

Еще одной важной характеристикой при изучении ПГА являются их термические свойства. ПГА – это полукристаллические соединения. Термические свойства аморфной фазы изучаются с точки зрения температуры стеклования ($T_{стекл}$), а свойства кристаллической фазы описываются температурой плавления ($T_{пл}$) (Grigore et al., 2019). Известно, что температура плавления полимеров ПГА прямо пропорциональна числу атомов углерода в боковой цепи полимера. Напротив, $T_{стекл}$ обратно пропорциональна длине боковой цепи. Показано, что увеличение количества атомов углерода с C_4 до C_7 в боковой цепи приводит к повышению $T_{пл}$ ПГА на 24 °С (с 45 до 69 °С), что сопровождается снижением $T_{стекл}$ (Gorі et al., 2018). Короткоцепочечные ПГА, как правило, имеют более высокое значение $T_{стекл}$, чем среднецепочечные, что способствует повышению их кристалличности и, следовательно, хрупкости. Наиболее изученный П(ЗГБ) характеризуется $T_{стекл}$ и $T_{пл}$ 4 и 180 °С соответственно, что делает его жестким и хрупким (Martin et al., 2003). Среднецепочечные ПГА имеют $T_{стекл}$ от – 25 °С до –65 °С, а $T_{пл}$ колеблется от 42 до 75 °С (Larrañaga et al., 2019). Такие ПГА менее кристаллические, чем короткоцепочечные, ввиду нерегулярных боковых групп, которые препятствуют плотной упаковке цепей в полимере.

Степень кристалличности (C_x) ПГА также является важным свойством. Известно, что C_x у коротко- и среднецепочечных ПГА различается: первые обладают более высокой степенью кристалличности в диапазоне от 60 до 80 % (Sanhueza et al., 2019), тогда как у вторых C_x может составлять всего 24 % (Rai et al., 2011). Значительное влияние на этот показатель оказывает мономерный состав полимеров. Поскольку с повышением C_x увеличивается хрупкость и

жесткость полимеров, многие исследования посвящены снижению этого показателя. Например, выявлено, что C_x сополимера (П(ЗГБ-*co*-ЗГГ)) зависит от доли мономеров ЗГГ (Tanadchangsang, 2014). Волова и соавт. показали, что скорость кристаллизации П(ЗГБ) намного выше, чем у сополиэфира П(ЗГБ-*co*-ЗГГ). Это позволило предположить, что включение мономеров ЗГГ в состав полимера значительно снижает степень и скорость кристаллизации полимера (Volova et al., 2021).

Таким образом, такие уникальные свойства ПГА как способность к биологическому разложению и биосовместимость делают их перспективными материалами для применения в самых различных сферах: в экологическом, сельскохозяйственном, биомедицинском и др. секторах. Тем не менее, несмотря на острую потребность в разрушаемых полимерных материалах и высокую привлекательность ПГА, существует ряд проблем на пути расширения областей применения и наращивания объемов производства этих полимеров. Главным сдерживающим фактором является высокая стоимость производства ПГА, определяемая, в первую очередь, углеродным субстратом, затраты на который составляют до 45-50 % от общей суммы. В зависимости от объемов производства и используемой технологии, стоимость гомополимера П(ЗГБ) оценивается в настоящее время от 3,0 до 6,5 \$/кг, что вдвое превосходит стоимость полилактида и от 3-х до 6-ти раз – стоимость синтетических полиолефинов (da Cruz Pradella, 2011). Это делает необходимым поиск и изучение новых доступных субстратов, среди которых весьма перспективными представляются жиросодержащие отходы различных производств. Изучение различных аспектов синтеза ПГА, в том числе сополимеров различного мономерного состава, с привлечением такого вида углеродного сырья позволит создать научно-практическую базу, позволяющую в дальнейшем расширить перспективы применения ПГА, в том числе за счет снижения стоимости их производства.

ГЛАВА 2 Объекты и методы исследования

2.1 Объект исследования

Для исследования использован природный штамм *Cupriavidus necator* В-10646 из коллекции бактерий лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза ИБФ СО РАН, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

C. necator – это вид грамотрицательных, палочковидных, факультативно хемолитоавтотрофных β -протеобактерий. Первоначально он описывался как *Hydrogenomonas eutropha* и в дальнейшем был предметом таксономических реклассификаций: *Alcaligenes eutrophus*, *R. eutropha*, *Wautersia eutropha* (Reinecke et al., 2009). Метаболическая универсальность этого таксона сделала его модельным объектом для синтеза ПГА. При гетеротрофном росте разнообразные углеводы, липиды и органические кислоты служат источником углерода и энергии, тогда как в отсутствие органических соединений, смесь H_2 , CO_2 и O_2 позволяет *C. necator* расти автотрофно. В зависимости от условий в среде обитания, *C. necator* может переключаться между автотрофией и гетеротрофией. Миксотрофный рост наблюдается, когда *C. necator* использует одновременно органические и неорганические субстраты в качестве источника углерода и энергии (Kärst et al., 1984). В качестве источника азота *C. necator* использует нитраты, соли аммония, мочевины и аминокислоты.

2.2 Состав питательной среды для культивирования бактерий

Во всех экспериментах в качестве питательной среды для роста микроорганизмов и синтеза ПГА использовалась минерально-солевая среда Шлегеля (Schlegel et al., 1961). На первом этапе готовили фосфатный буфер: Na_2HPO_4 (9,1 г/л) и KH_2PO_4 (1,5 г/л) растворяли в дистиллированной воде, после чего в раствор вносили источник углерода, в зависимости от условий эксперимента в концентрации 10-30 г/л, и автоклавировали. Отдельно готовили растворы компонентов, входящих в состав среды Шлегеля, – $MgSO_4$ (0,2 г/л), $C_6H_5O_7Fe$ (0,025 г/л) и раствор микроэлементов, который вносили в среду из расчета 3 мл исходного раствора на 1 л среды. Исходный раствор микроэлементов имел следующий состав (г/л): H_3BO_3 – 0,288, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,030, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,08, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,008, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,176, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$

– 0,050, NiCl_2 – 0,008. В качестве источника азота использовали хлорид аммония (NH_4Cl) в концентрации 0,7-1,0 г/л. Все растворы автоклавировали и вносили в фосфатный буфер непосредственно перед засевом культуры бактерий.

В качестве углеродного субстрата выступали следующие соединения:

- растительные масла – пальмовое, рыжиковое и масло семян подсолнечника рафинированное (раф.) и нерафинированное (нераф.);
- насыщенные жирные кислоты – лауриновая ($\text{C}_{12:0}$), миристиновая ($\text{C}_{14:0}$), пальмитиновая ($\text{C}_{16:0}$), стеариновая ($\text{C}_{18:0}$), а также моновенасыщенная олеиновая кислота ($\text{C}_{18:1}$);
- жировые отходы рыбопереработки, извлеченные из *Sprattus sprattus balticus* (килька балтийская), *Scomber scombrus* (скупбрия атлантическая), *Sander lucioperca* (судак обыкновенный);
- животные жиры, полученные из нутряного жира *Ovis aries* (баран домашний), *Bos taurus* (корова домашняя), *Sus domesticus* (свинья домашняя).

Жирные кислоты были использованы в виде химических реактивов (чистота 99 %, Merck, Малайзия); растительные масла – пальмовое (Малайзия), подсолнечные (Россия) и рыжиковое (Россия), были приобретены и использованы в готовом виде в качестве коммерческих товаров. Животные жиры были получены от частных фермерских хозяйств и вытоплены на водяной бане при температуре 80 °С до получения однородной консистенции. Жировые отходы рыбопереработки были предоставлены Калининградским техническим университетом. Жиросодержащее рыбное сырье было получено от рыбконсервных заводов ООО «РосКон» и АО «Калининградский тарный комбинат», источником которого выступали головы копчёной балтийской кильки (отходы производства консервов «Шпроты в масле»), смесь голов и хребтов скупбрии атлантической (отходы производства консервов «Скупбрия натуральная в масле»), внутренности судака обыкновенного (отходы производства филе и фарша).

Для синтеза сополимерных ПГА в состав среды дополнительно вносили в качестве прекурсоров валерат калия ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOK}$) (предшественник мономеров 3-гидроксивалерата), γ -валеролактон (предшественник 3- и 4-гидроксивалерата), ϵ -капролактон (предшественник 4-гидроксипропионата) и 3-меркаптопропионовую кислоту (предшественник 3-меркаптопропионата). Растворы валерата и меркаптопропионата калия готовили следующим образом: 10 мл валерьяновой кислоты ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$) (Alfa Aesar, Германия, чистота 99 %) и 3-меркаптопропионовую кислоту (Sigma-Aldrich, США, чистота 99 %) титровали 33-% раствором КОН до достижения pH ~7,0 (10 мл КОН), полученный раствор доводили до 100 мл дистиллированной водой, автоклавировали. γ -валеролактон (Sigma-Aldrich, США, чистота 99 %) и ϵ -капролактон (Alfa Aesar, Германия, чистота 99 %) вносили в питательную среду в готовом

виде. Дополнительно в качестве источника углерода была использована фруктоза (Panreac, E.U., чистота 98 %), которую вносили в среду в концентрации 15 г/л.

2.3 Анализ химического и жирнокислотного состава углеродных субстратов

Для исследованных источников углерода определяли жирнокислотный состав масел и жиров согласно Солтани и др. (Soltani et al., 2004), содержание углеводов, липидов и белков для жиров, полученных из отходов рыбопереработки – с использованием общепринятых методов, а также оценивали потребление бактериями жирных кислот в исследуемых субстратах в процессе культивирования.

Липиды экстрагировали из культуральной жидкости гексаном (1:1), интенсивно встряхивали на вортексе (Bio Vortex V1, Biosan, Латвия) и оставляли до разделения фаз. Верхнюю фазу отбирали, упаривали на ротационном испарителе (Rotavapor, Buchi, Швейцария). Полученный экстракт подвергали процедуре метанолиза: в грушевидную колбу, содержащую экстракт, добавляли 1 мл метилирующей смеси (смесь метанола и серной кислоты в соотношении 19:1) и каплю бензола, после чего помещали на водяную баню под обратные холодильники при 80 °C на 120 мин. По истечении времени в колбу добавляли 1 мл гексана и 2 мл дистиллированной воды, оставляли при 4 °C до разделения фаз. Полученную смесь промывали дистиллированной водой с использованием делительной воронки до значений pH ~7,0. Гексановую фракцию пропускали через слой б/вод. Na₂SO₄, растворитель выпаривали (Rotavapor, Buchi, Швейцария). Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали с помощью газового хроматографа, оснащенного масс-детектором (7890A/5975C Agilent Technologies, США) и капиллярной колонкой HP-5 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). В качестве газа-носителя использовали гелий (скорость потока 1 мл/мин); температурный режим был следующий: начальная температура 120 °C, затем повышение до 230 °C со скоростью 5 °C/мин, изотермический режим 5 мин, последующее повышение температуры до 310 °C со скоростью 10 °C/мин, изотермический режим 3 мин, температура инжектора 220 °C. Идентификацию жирных кислот и их содержание (% от суммы ЖК) проводили по масс-спектрам и временам удерживания соответствующих метиловых эфиров. Количественное определение ЖК в составе субстратов проводили, основываясь на площадях их пиков относительно внутреннего стандарта (нонановая кислота, C9:0) с заранее известной концентрацией.

2.4 Технология и условия культивирования бактерий

Культивирование бактерий выполняли в периодическом режиме в колбах объемом 0,5-1,0 л при коэффициенте заполнения 40 % от общего объема сосуда с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 (New Brunswick Scientific, США) при температуре 30 °С и орбитальной скорости вращения 200 об./мин в течение 48-72 ч. Инокулят готовили путем ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде Шлегеля при температуре 4 °С, и использовали для засева питательной среды при стартовой концентрации клеток в среде 0,1-0,2 г/л.

Для стимулирования и максимизации синтеза ПГА выращивание бактерий проводили в ранее разработанном двухстадийном периодическом режиме (Волова и др., 1992). В конце первого этапа (25-35 ч) концентрация источника азота в среде (исходно 0,7-1,0 г/л) выступала в роли лимитирующего фактора, ограничивающего рост клеток и синтез основных клеточных макромолекул, что стимулировало накопление ПГА; на втором этапе (через 35-40 ч) источник азота в среде был исчерпан и бактерии находились в безазотной среде. В экспериментах с использованием прекурсоров различных мономеров добавки осуществляли согласно дробной стратегии подачи на 0 и 24 ч роста культуры в разовой концентрации 1,0 г/л.

2.5 Контроль параметров роста культуры бактерий

В процессе роста бактерий периодически отбирали пробы для анализа. Оптическую плотность культуры бактерий измеряли на фотоэлектрокалориметре (UNICO 2100, США), для чего 1 мл культуры разводили 5 мл дистиллированной воды, помещали в кюветы (длина оптического пути 1 мм) и проводили измерения при длине волны $\lambda = 440$ нм. Концентрацию клеток (X, г/л) оценивали гравиметрическим методом. Для этого 20-25 мл культуры бактерий центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) в течение 5 мин при 6000 об./мин, надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали. Процедуру промывки повторяли дважды: сначала используя гексан для отмывки жировой фракции, а после – дистиллированную воду. Полученную биомассу переносили в бюксы с известной массой, помещали в сушильный шкаф (СШ-80-01, СПУ, Россия) при 105 °С на 24 ч. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе в течение 24 ч и взвешивали на

аналитических весах (Adventurer, «OHAUS», США). Вес биомассы определяли как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

Липолитическую активность ферментов измеряли, согласно рекомендациям (Takaç et al., 2008). Для этого 1 мл субстрата (0,5 %-ный раствор п-нитрофенилпальмитата в этаноле) добавляли к 1 мл фосфатного буфера (0,05M, pH = 8), содержащего 0,1 мл образца культуры, и перемешивали в течение 5 минут при 30 °C на магнитной мешалке (Heidolph, Германия). Гидролитическую реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,5 N раствора Na₂CO₃ с последующим центрифугированием (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия) в течение 10 мин. Липолитическую активность надосадочной жидкости определяли фотометрически (UNICO 2100, США) при длине волны $\lambda = 404$ нм и длине оптического пути 1 мм. Одну единицу активности фермента (Ед.) определяли как количество фермента, необходимое для получения 1 моль п-нитрофенола из п-нитрофенилпальмитата в минуту в условиях, упомянутых выше.

Остаточную концентрацию углеродных субстратов в среде, представленных в твердой фракции, определяли весовым методом, регистрируя разницу между исходным и конечным весом. Концентрацию углеродных субстратов, представленных в жидком виде – олеиновой кислоты и жировых отходов рыбопереработки, определяли следующим образом (Riedel et al., 2016): липидную составляющую питательной среды экстрагировали гексаном, для чего отбирали 10 мл среды и добавляли равный объем гексана, перемешивали на вортексе (Bio Vortex V1, Biosan, Латвия) и оставляли до разделения фаз. Верхнюю фазу отбирали в заранее взвешенные грушевидные колбы, растворитель выпаривали на ротационном испарителе (Rotavapor, Büchi, Швейцария) и оставляли до полного высыхания в эксикаторе на 24 ч. После этого колбу с субстратом взвешивали и рассчитывали остаточное содержание липидов, основываясь на разнице массы пустой колбы и колбы, содержащей экстракт.

2.6 Определение внутриклеточного содержания полигидроксиалканоатов и их мономерного состава

Содержание полимера в клетках бактерий *C. necator* В-10646 (% от веса АСБ) определяли методом газовой хроматографии (Braunegg et al., 1978) (газовый хроматограф Agilent 7890A, оснащенный масс-спектрометром Agilent 5975C, Agilent Technologies, США). Для этого, с целью получения метиловых эфиров ЖК, проводили метанолиз образцов сухой биомассы клеток: к навеске бактериальной биомассы (3,9-4,5 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (раствор бензойной кислоты в хлороформе, 0,5 г/л), 0,85 мл метанола и 0,15 мл H₂SO₄, полученную смесь

помещали на водяную баню (LOIP LB-161, Россия) при 80 °С под обратным холодильником на 160 мин, после окончания процедуры добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли при 4 °С до разделения фаз, после чего нижнюю фазу использовали для дальнейших исследований. Условия хроматографирования были следующими: газ-носитель – гелий, скорость 1,2 мл/мин; капиллярная колонка DB-35MS, длина – 30 м, диаметр – 0,25 мм; температура ввода пробы – 220 °С; начальная температура – 55 °С; подъем температуры до 310 °С со скоростью 10 °С/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °С; температура источника ионов – 230 °С; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 аму при 0,5 сек/скан. Идентификацию мономеров образующих ПГА, проводили по масс-спектрам и временам удерживания соответствующих метиловых эфиров жирных кислот.

2.7 Определение продукционных показателей роста бактерий и синтеза полигидроксиалканоатов

В ходе экспериментов следующие характеристики процесса культивирования и биосинтеза полимера были оценены. Регистрировали урожай биомассы клеток в культуре (X , г/л), внутриклеточное содержание и концентрацию в культуре ПГА (% от АСБ и г/л соответственно), рассчитывали продуктивность процесса по биомассе (P_X , г/л·ч) и полимеру ($P_{ПГА}$, г/л·ч), а также экономические коэффициенты по биомассе (Y_X , г/г) и полимеру ($Y_{ПГА}$, г/г).

Продуктивность процесса по биомассе (P_X) и полимеру ($P_{ПГА}$) рассчитывали по формуле:

$$P_{ПГА(X)} = q_s \cdot Y_{p/s} \cdot X, \quad (1)$$

где q_s – скорость потребления субстрата (метаболический коэффициент), г/(г/ч); $Y_{p/s}$ – экономический коэффициент по продукту, г/г; X – концентрация биомассы, г/л; P – продукт, г/л; S – субстрат, г.

Экономический коэффициент по биомассе определяли как количество сухой биомассы, получаемой из данного количества субстрата, согласно формуле:

$$Y_X = X/S_0 - S, \quad (2)$$

где X – концентрация биомассы, г/л; S_0 и S – начальная и конечная концентрация субстрата соответственно, г/л.

Экономический коэффициент по полимеру определяли как количество полимера, получаемого из данного количества субстрата, согласно формуле:

$$Y_{\text{ПГА}} = P/S_0 - S, \quad (3)$$

где P – концентрация полимера, г/л; S_0 и S – начальная и конечная концентрация субстрата соответственно, г/л.

2.8 Экстракция и очистка полученных образцов полигидроксиалканоатов

Экстракцию ПГА из клеточной биомассы бактерий проводили в несколько этапов. На первом этапе собирали и концентрировали клеточную биомассу центрифугированием (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия), далее обезжиривали полученную биомассу этиловым спиртом и для дальнейшей экстракции добавляли двойной объем метилена хлористого и оставляли на 72 ч при 30 °С. Полученную смесь фильтровали от компонентов клеток и упаривали на роторном испарителе (Rotavapor, Buchi, Швейцария), экстрагированный полимер осаждали гексаном и высушивали. С целью очистки полученных образцов от примесей, полимер перерастворяли метиленом хлористым и вновь осаждали гексаном до получения гомогенных образцов.

2.9 Определение свойств синтезированных полигидроксиалканоатов

Физико-химические свойства полимеров определяли, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию и дифференциальную сканирующую калориметрию согласно методам, описанным ранее (Volova et al., 2021).

Молекулярно-массовые характеристики ПГА определяли методом высокоэффективной жидкостной гельпроникающей хроматографии (Agilent 1200, Agilent Technologies, США) с использованием в качестве стандартов набора полистироловых стандартов (Sigma-Aldrich, США). Значение средней числовой молекулярной массы (M_n , Да) образцов находили по формуле:

$$M_n = \sum (N_i \cdot M_i / N), \quad (5)$$

где N_i – количество молекул массы i ; N – общее количество молекул; M_i – масса молекул длины i , Да.

Среднюю весовую молекулярную массу (M_w , Да) образцов определяли по формуле:

$$M_b = \sum (w_i \cdot M_i), \quad (6)$$

где w_i – доля массы, определяемая по формуле $N_i \cdot M_i / \sum (N_i \cdot M_i)$.

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различными размерами молекул, вычисляли из соотношения:

$$\bar{D} = M_b / M_n, \quad (7)$$

где M_b – средневесовая молекулярная масса, Да; M_n – среднечисловая молекулярная масса, Да.

Определение температурных характеристик полученных образцов полимера проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Температуру плавления ($T_{пл}$) и термической дегградации ($T_{дегр}$) определяли по эндотермическим пикам на термограммах. Навески образцов массой 4 мг в алюминиевых тиглях нагревали до 200 °С, затем охлаждали до –20 °С, выдерживали в течении 20 минут, затем снова нагревали до 320 °С. Термограммы анализировали с помощью программного обеспечения STARe Ver. 11.0. (Mettler Toledo, Швейцария).

Степень кристалличности полученных образцов ПГА рассчитывалась по следующей формуле:

$$C_x = (\Delta H_i) / (\Delta H_0), \quad (8)$$

где ΔH_i – удельная энтальпия плавления образца (Дж/г); ΔH_0 – удельная энтальпия расплавленного 100% кристаллизованного П(ЗГБ) (146 Дж/г) (Barham et al., 1984).

2.10 Статистический анализ результатов

Статистический анализ результатов проводили общепринятыми методами (Зайцев, 1973), в том числе с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel 2013 (Вер. 15.0.4420.1017). Каждый эксперимент проводился в пятикратной повторности. Были найдены средние арифметические значения, отклонения от среднего значения, дисперсия и стандартные отклонения. Для сравнения групп использовали критерий Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Часть статистических расчеты проводили в программе STATISTICA Trial Ver. 13.0, с использованием прикладных пакетов анализа данных.

ГЛАВА 3 Закономерности синтеза полигидроксиалканоатов на жирах растительного происхождения

Растительные масла рассматриваются как перспективный углеродный субстрат для культивирования продуцентов ПГА. Их использование может снизить затраты на производство этих полимеров. С точки зрения химической природы, как упоминалось выше, за исключением небольшого количества примесей, масла состоят из триацилглицеридов – жиров, имеющих глицериновый остов, связанный с тремя остатками жирных кислот. Они утилизируются микроорганизмами посредством секреции липолитических ферментов, которые последовательно гидролизуют масло в диглицериды, моноглицериды, глицерин и свободные жирные кислоты, которые и являются непосредственным источником углерода для роста бактерий.

Преимуществом растительных масел является высокое содержание углерода и эффективность их преобразования в ПГА. В качестве субстратов для производства ПГА рассматривались многие кулинарные масла – пальмовое, соевое, подсолнечное, оливковое, кокосовое, рапсовое, кукурузное и арахисовое. Непищевые масла также исследуются для биосинтеза ПГА: масло ятрофы, финиковое масло, масло африканского элеми, масло горького яблока, масло александрийского лавра и др. (Ciesielski et al., 2015).

3.1 Растительные масла как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов

В данном разделе рассматривается возможность применения четырех типов растительных масел для культивирования бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА: пальмовое, подсолнечное в двух вариантах (рафинированное и нерафинированное) и рыжиковое масла (Volova et al., 2020). Поскольку непосредственным источником углерода в составе масел выступают жирные кислоты, был определен и охарактеризован их жирнокислотный состав (Таблица 1).

Пальмовое масло характеризовалось наименьшим разнообразием и было представлено двумя основными жирными кислотами – пальмитиновой ($44,2 \pm 1,4$ %) и олеиновой ($39,6 \pm 1,6$ %), в меньшем количестве были обнаружены миристиновая, стеариновая и линолевая жирные кислоты ($0,9$ – $11,1$ %). Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в исследованном образце масла составило $0,97 \pm 0,10$.

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

Жирная кислота	Пальмовое масло	Рыжиковое масло	Подсолнечное масло раф.	Подсолнечное масло нераф.
Миристиновая C14:0	0,9±0,2	–	–	–
Пальмитиновая C16:0	44,2±1,4 ^{a*}	4,3±0,6 ^b	7,4±0,6 ^c	8,4±0,7 ^c
Стеариновая C18:0	4,2±0,1 ^a	1,4±0,2 ^b	3,1±0,2 ^c	2,9±0,3 ^c
Олеиновая C18:1ω9	39,6±1,6 ^a	18,2±1,0 ^b	24,5±1,6 ^c	22,8±1,0 ^c
Линолевая C18:2ω6	11,1±0,9 ^a	22,4±1,7 ^b	63,1±1,4 ^c	60,8±1,7 ^c
Линоленовая C18:3ω3	–	29,1±0,7	–	–
Арахидовая C20:0	–	3,6±0,5 ^a	0,4±0,2 ^b	0,4±0,1 ^b
Эйкозеновая C20:1ω9	–	11,3±1,1	–	–
Эйкозодиеновая C20:2ω6	–	1,1±0,2	–	–
Эйкозатриеновая C20:3ω3	–	1,4±0,4	–	–
Бегеновая C22:0	–	0,6±0,2 ^a	1,1±0,4 ^a	1,0±0,3 ^a
Докозеновая C22:1ω3	–	4,7±0,9	–	–
Докозодиеновая C22:2ω6	–	0,2±0,1	–	–
Докозатриеновая C22:3ω3	–	0,4±0,1	–	–
Тетракозановая C24:0	–	0,3±0,2 ^a	0,4±0,3 ^a	0,8±0,3 ^a
Нервоновая C24:1ω3	–	1,0±0,3	–	–
Гексакозановая C26:0	–	–	–	0,7±0,1
Октакозановая C28:0	–	–	–	1,1±0,2
Триаконтановая C30:0	–	–	–	1,1±0,2
Σ ЖК, г/г масла	0,60±0,03 ^a	0,64±0,04 ^a	0,61±0,03 ^a	0,62±0,03 ^a
Σ Насыщенных ЖК	49,3±1,2 ^a	10,2±0,5 ^b	12,4±1,6 ^c	16,4±2,2 ^c
Σ Насыщенных ЖК / Σ ненасыщенных ЖК	0,97±0,10 ^a	0,11±0,04 ^b	0,14±0,03 ^b	0,20±0,05 ^b
Σ Моноеновых ЖК	39,6±1,6 ^a	35,2±1,2 ^b	24,5±2,2 ^c	22,8±1,8 ^c
Σ Полиеновых ЖК	11,1±0,8 ^a	54,6±1,6 ^b	63,1±1,2 ^c	60,8±1,5 ^c
Σ Длинноцепочечных ЖК (>18 атомов С)	–	24,6±1,0 ^a	1,9±0,2 ^b	5,1±1,5 ^c

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Рыжиковое масло, напротив, обладало наибольшим разнообразием жирных кислот. Было идентифицировано 15 жирных кислот, среди которых преобладающими были ненасыщенные жирные кислоты с 18 атомами углерода (олеиновая (18,2±1,0 %), линолевая (22,4±1,7 %) и

линоленовая ($29,1 \pm 0,7$ %)), а также гондоиновая жирная кислота ($C_{20:1\omega 9}$), содержание которое было определено на уровне $11,3 \pm 1,1$ %, доля остальных жирных кислот не превышала 5%; соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот составило $0,11 \pm 0,04$.

Подсолнечное масло рафинированное было представлено 7 жирными кислотами с наибольшим среди всех исследованных масел содержанием линолевой кислоты ($63,1 \pm 1,4$ %), доля олеиновой кислоты составила $24,5 \pm 1,6$ %, а остальных жирных кислот – менее 10 %. Аналогично рыжиковому маслу, большая часть жирных кислот в составе растительного масла была представлена ненасыщенными жирными кислотами и соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в этом масле составило $0,14 \pm 0,03$. Жирнокислотный состав нерафинированного подсолнечного масла в целом был близок, однако были обнаружены длинноцепочечные кислоты $C_{26:0}$, $C_{28:0}$ и $C_{30:0}$ (0,7, 1,1 и 1,1 % соответственно). Общее содержание жирных кислот в составе растительных масел было близким и варьировало в диапазоне 0,60-0,64 г жирных кислот /г масла.

На следующем этапе необходимо было установить возможность роста штамма *C. necator* В-10646 на растительных маслах как на источнике углерода и определить концентрацию масел в среде, позволяющую достичь наиболее высоких показателей по урожаю биомассы бактерий и синтезу ПГА. Концентрация источника углерода в питательной среде, как известно, оказывает существенное влияние на рост микроорганизмов: низкие концентрации могут лимитировать рост бактерий, а высокие, напротив, вызывать ингибирование. Ввиду этого для каждого конкретного продуцента важно подобрать такие концентрации субстрата в питательной среде, которые обеспечат наиболее высокие выходы биомассы и ПГА.

Культуру бактерий *C. necator* В-10646 выращивали в жидкой питательной среде Шлегеля при 30 °С и использовании в качестве единственного источника углерода одного из охарактеризованных растительных масел (соответственно, пальмовое, рыжиковое, подсолнечное рафинированное и нерафинированное) в концентрации 10-30 г/л (Рисунок 5). В результате проведенных краткосрочных экспериментов (48 ч) установлено, что все четыре типа растительных масел поддерживают рост штамма и синтез ПГА, а при концентрации растительных масел в среде 15 г/л получены наиболее высокие показатели как по биомассе, так и по ПГА.

Эти предварительные эксперименты позволили продолжить исследование растительных масел и перейти к более детальному изучению роста штамма *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА при их использовании. В более длительных экспериментах (72 ч) исследованы рост продуцента и внутриклеточное содержание ПГА в динамике. Исследование выявило достаточно короткую лаг-фазу – исследуемый штамм практически сразу после засева среды утилизировал масла, не требуя времени на адаптацию к новому субстрату. Это было подтверждено анализом активности

липолитических ферментов, переводящих недоступные клеткам для поглощения ТАГ в смесь ДАГ, МАГ, глицерина и свободных жирных кислот. Показано, что минимальная липолитическая активность определяется уже на 2-4 ч культивирования и постепенно возрастает, достигая максимальных значений к 24 ч роста (до 11,5 Ед./мл). Несмотря на то, что на 24 ч роста накопление биомассы бактерий на различных маслах было близким (2,9-4,6 г/л), к концу культивирования урожай биомассы бактерий значительно отличался в зависимости от используемого растительного масла. Наибольшее содержание биомассы бактерий отмечено для пальмового масла – $7,1 \pm 0,3$ г/л, несколько ниже ($5,8 \pm 0,4$ г/л) для рыжикового масла. Самые низкие показатели отмечены для подсолнечного масла: концентрация клеток в культуре бактерий была на уровне 3,9-4,4 г/л (Рисунок 6).

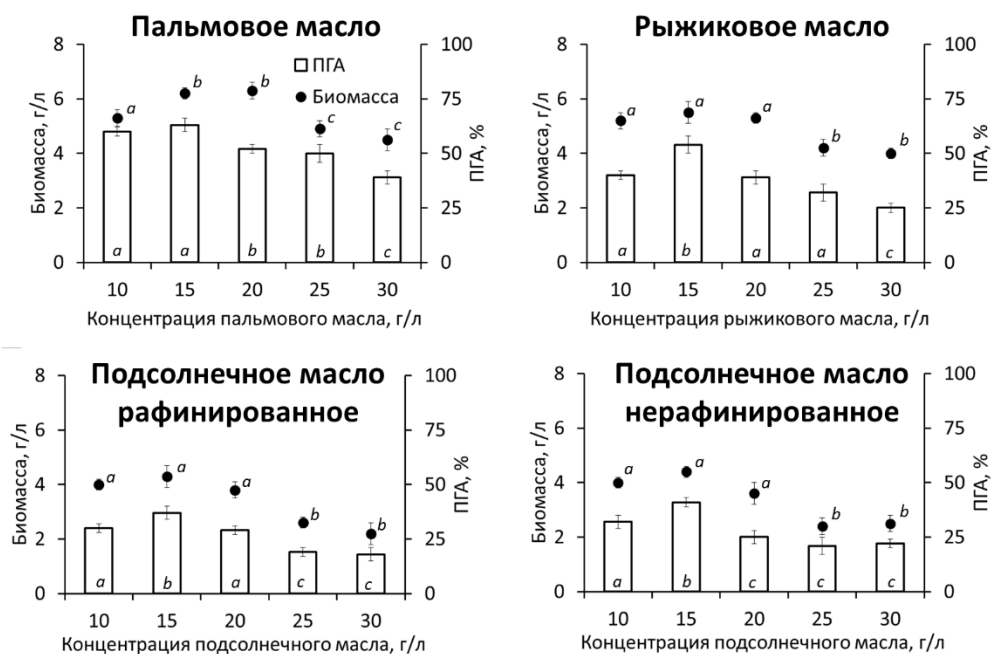


Рисунок 5 – Влияние концентрации растительных масел на урожай биомассы *C. necator* В-10646 и синтез ПГА (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Использование растительных масел как источника углерода обеспечило не только рост бактерий, но и внутриклеточную аккумуляцию ПГА (Рисунок 7), которая также варьировала в зависимости от субстрата. Аналогично выходам биомассы, максимальное внутриклеточное содержание ПГА в конце культивирования (72 ч) было получено при использовании пальмового масла и составило 72 ± 2 %, рыжиковое масло обеспечивало накопление ПГА до 58 ± 3 %, наименьшее содержание отмечено для подсолнечного масла (30-35 %).



Рисунок 6 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 при росте на растительных маслах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

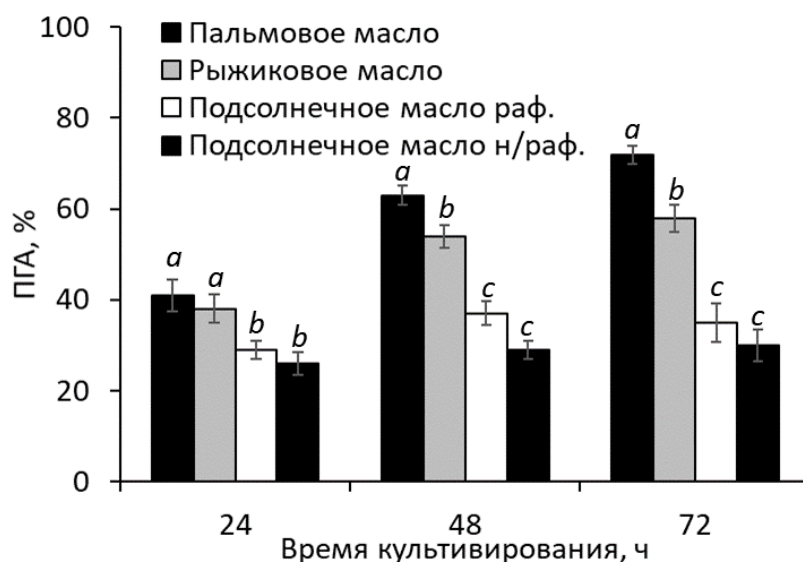


Рисунок 7 – Содержание ПГА в клетках бактерий *C. necator* В-10646 при росте на растительных маслах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Результаты, полученные в настоящей работе, сопоставимы с данными, полученными при изучении других природных штаммов бактерий различных родов (*Cupriavidus*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*), культивируемых на пальмовом масле в аналогичных условиях. В ряде исследований сообщалось о высоком внутриклеточном содержании ПГА (70-79 %), а выходы биомассы штамма *C. necator* Н16 лежали в диапазоне от 3,5 до 6,0 г/л (Budde et al., 2011; Kek et al., 2008; Lee et al., 2008). Более низкое содержание ПГА от 19-23 до 43-50 % и

концентрация биомассы от 1,8-2,7 до 4,8-5,1 г/л отмечены для представителей других таксонов: *Pseudomonas putida* PGA1 (Tan et al., 1997), *Burkholderia* sp. USM FLP (Alias et al., 2005); *Chromobacterium* sp. USM2 (Bhubalan et al., 2010). Данные по исследованию возможности применения подсолнечного масла в качестве субстрата для синтеза ПГА природными штаммами ограничены: лишь в одной работе (Lee et al., 2008) показано, что штамм *C. necator* H16 способен накапливать до 72 % ПГА при концентрации биомассы 4,7 г/л. Исследование рыжикового масла как субстрата для синтеза ПГА было проведено впервые.

Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на различных растительных маслах показаны в Таблице 2. В зависимости от используемого растительного масла экономический коэффициент по полимеру ($Y_{ПГА}$) и продуктивность процесса по биомассе (R_X) и полимеру ($R_{ПГА}$) отличались. Экономические коэффициенты по биомассе (Y_X) для всех исследованных растительных масел были близки (0,75-0,78 г биомассы/г масла). Самые высокие показатели $Y_{ПГА}$ были рассчитаны для пальмового и рыжикового масел и составили $0,54 \pm 0,03$ и $0,45 \pm 0,02$ г ПГА/г масла соответственно, а для подсолнечного масла $Y_{ПГА}$ были ниже практически вдвое и составили 0,24-0,29 г ПГА/г масла. Продуктивность процесса по биомассе и полимеру имела схожую тенденцию: максимальные значения R_X и $R_{ПГА}$ отмечены для пальмового масла ($0,099 \pm 0,005$ и $0,071 \pm 0,004$ г/л·ч соответственно), наименьшие значения отмечены для нерафинированного подсолнечного масла – $0,081 \pm 0,007$ и $0,025 \pm 0,005$ г/л·ч соответственно. Стоит отметить, что продукционные показатели для подсолнечного масла в обоих вариантах были рассчитаны на 48 ч роста, поскольку значимого прироста биомассы и ПГА к 72 ч не произошло.

Таблица 2 – Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на растительных маслах

Растительное масло	t, ч	X, г/л	ПГА, г/л	Y_X , г/г	$Y_{ПГА}$, г/г	R_X , г/л·ч	$R_{ПГА}$, г/л·ч
Пальмовое	72	$7,1 \pm 0,3^a$	$5,1 \pm 0,2^a$	$0,75 \pm 0,02^a$	$0,54 \pm 0,03^a$	$0,099 \pm 0,005^a$	$0,071 \pm 0,004^a$
Рыжиковое	72	$5,8 \pm 0,4^b$	$3,4 \pm 0,3^b$	$0,76 \pm 0,03^a$	$0,45 \pm 0,02^b$	$0,081 \pm 0,005^b$	$0,047 \pm 0,003^b$
Подсолнечное раф.	48	$4,3 \pm 0,4^c$	$1,6 \pm 0,3^c$	$0,78 \pm 0,04^a$	$0,29 \pm 0,03^c$	$0,090 \pm 0,006^{ab}$	$0,033 \pm 0,003^c$
Подсолнечное нераф.	48	$3,9 \pm 0,3^c$	$1,2 \pm 0,2^c$	$0,78 \pm 0,05^a$	$0,24 \pm 0,04^c$	$0,081 \pm 0,007^b$	$0,025 \pm 0,005^c$

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Растительные масла – это сложный и многокомпонентный по составу ростовой субстрат, потребление бактериями которого требует более детального рассмотрения. С этой целью была

исследована утилизация штаммом *C. necator* В-10646 отдельных жирных кислот, входящих в состав масел (Рисунке 8). Показано, что соотношение основных жирных кислот (C16:0; C18:0, C18:1 ω 9, C18:2 ω 6) в составе пальмового масла к концу культивирования (72 ч) не изменилось. Анализ остаточного содержания ЖК в культуральной среде подтвердил, что все кислоты утилизировались равномерно. При использовании рыжикового масла наблюдалось неравномерное потребление отдельных ЖК: полиеновые кислоты были утилизированы практически полностью, менее интенсивно – олеиновая кислота, а содержание насыщенных кислот не изменилось. 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 субстрата. Аналогичная картина изменения профиля жирных кислот отмечена для подсолнечного масла в обоих вариантах. Наиболее интенсивно бактерии использовали линолевую кислоту, несколько меньше – олеиновую, содержание насыщенных жирных кислот оставалось на прежнем уровне, что свидетельствует о том, что эти кислоты не утилизировались культурой бактерий. В результате такой избирательности соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК остаточного масла выросло практически втрое и составило $0,36 \pm 0,04$.

Исследования особенностей потребления ЖК в составе сложных ростовых субстратов немногочисленны, а опубликованные данные противоречивы. В работе (Riedel et al., 2012) сообщается, что основные ЖК в составе пальмового масла потреблялись штаммом *R. eutropha* Re2058/pCB113 преимущественно равномерно, что согласуется с результатами, полученными в настоящем исследовании. Однако, в другой работе (Budde et al., 2011) при культивировании штамма *R. eutropha* H16 на пальмовом масле авторы отметили, что доля олеиновой кислоты в среде к концу культивирования повышается, что свидетельствует о том, что именно эта кислота бактериями не используется, тогда как другие кислоты утилизируются активно. Вероятно, феномен неравномерного потребления ЖК в составе сложных субстратов обусловлен наличием различных по строению ЖК, а также штаммовой спецификой продуцентов. Согласно исследованию (Pavoncello et al., 2022), транспорт свободных жирных кислот в клетку зависит от длины углеродной цепи: короткоцепочечные (C4-C6) и среднецепочечные ЖК (C7-C11) поступают в клетку путем свободной диффузии, а для более длинных ЖК (>C12) требуются специализированные переносчики. Установлено, что в клетках грамотрицательных бактерий транспортным белком ЖК является FadL, который располагается на внешней стороне клеточной мембраны (Black et al., 2003). Вероятно, аналогичный механизм реализуется и у *C. necator*, а причина неравномерного использования ЖК может крыться именно в этом аспекте транспорта ЖК в клетку.

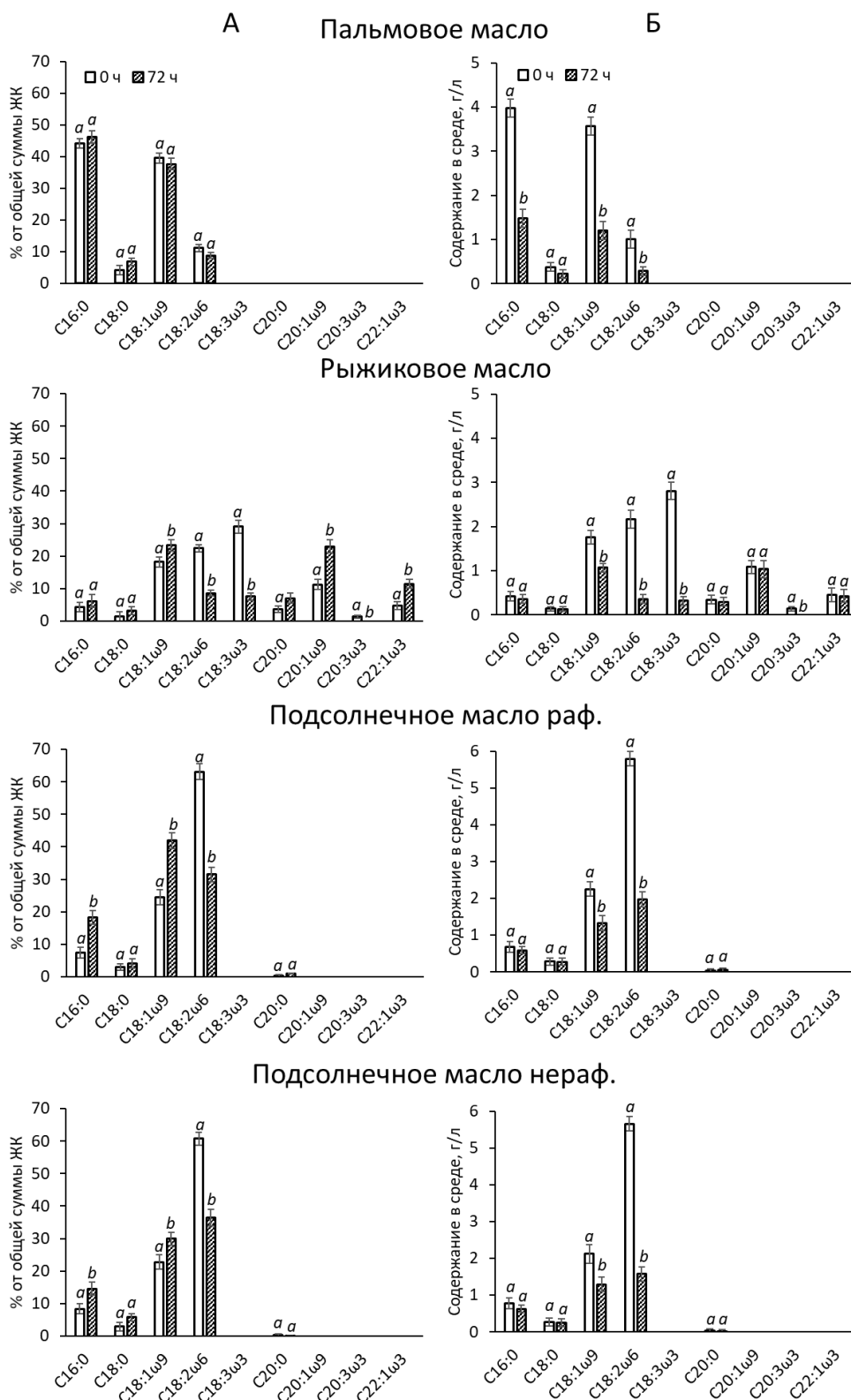


Рисунок 8 – Соотношение жирных кислот в составе растительных масел в начале и конце культивирования (А) и их содержание в среде (Б) (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Тем не менее, исследование закономерностей роста штамма бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА при использовании растительных масел как источника углеродного питания показало обнадеживающие результаты, особенно в случае применения пальмового масла, что позволяет рассматривать эту группу сложных липидных субстратов в качестве перспективного источника углерода для синтеза ПГА.

3.2 Жирные кислоты как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов

Выявленная избирательность потребления жирных кислот в составе растительных масел побудила провести исследование относительно способности исследуемого штамма к росту и синтезу ПГА на отдельных жирных кислотах. Рассмотрена возможность применения четырех насыщенных (лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0)) жирных кислот и мононенасыщенной олеиновой (C18:1) жирной кислоты в качестве моносубстратов для роста бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА (Zhila et al., 2024). Выбор этих кислот обусловлен их широким распространением в составе различных жировых субстратов – растительных масел, низкосортных животных жирах и отходах рыбопереработки, которые весьма активно исследуются в настоящее время в качестве углеродного субстрата для получения ПГА (Kek et al., 2008; Riedel et al., 2015). В предварительных экспериментах способность культуры бактерий *C. necator* В-10646 к росту и синтезу ПГА оценивали в экспериментах длительностью 48 ч, где указанный штамм выращивали в условиях, аналогичных для растительных масел, и диапазоне концентраций жирных кислот от 10 до 30 г/л (Рисунок 9). В результате исследования влияния стартовой концентрации жирных кислот в среде для штамма *C. necator* В-10646 показано, что для всех насыщенных кислот (C12:0-C18:0) и ненасыщенной олеиновой кислоты наиболее высокие концентрации биомассы и содержание полимера были получены при 15 г/л ЖК в среде.

Далее исследован рост штамма *C. necator* В-10646 и синтез ПГА в динамике в течение 72 ч с учетом подобранной ранее концентрации субстрата в питательной среде. Результаты оценки способности бактерий к росту при использовании насыщенных жирных кислот (C12:0, C14:0, C16:0 и C18:0) и ненасыщенной олеиновой жирной кислоты (C18:1) представлены на Рисунке 10. Все исследованные жирные кислоты поддерживали рост бактерий *C. necator* В-10646, который сопровождался синтезом и аккумуляцией в клетках полимера, однако, с удлинением углеродной цепи насыщенных жирных кислот наблюдалось снижение как урожая биомассы бактерий, так и накопления полимера.

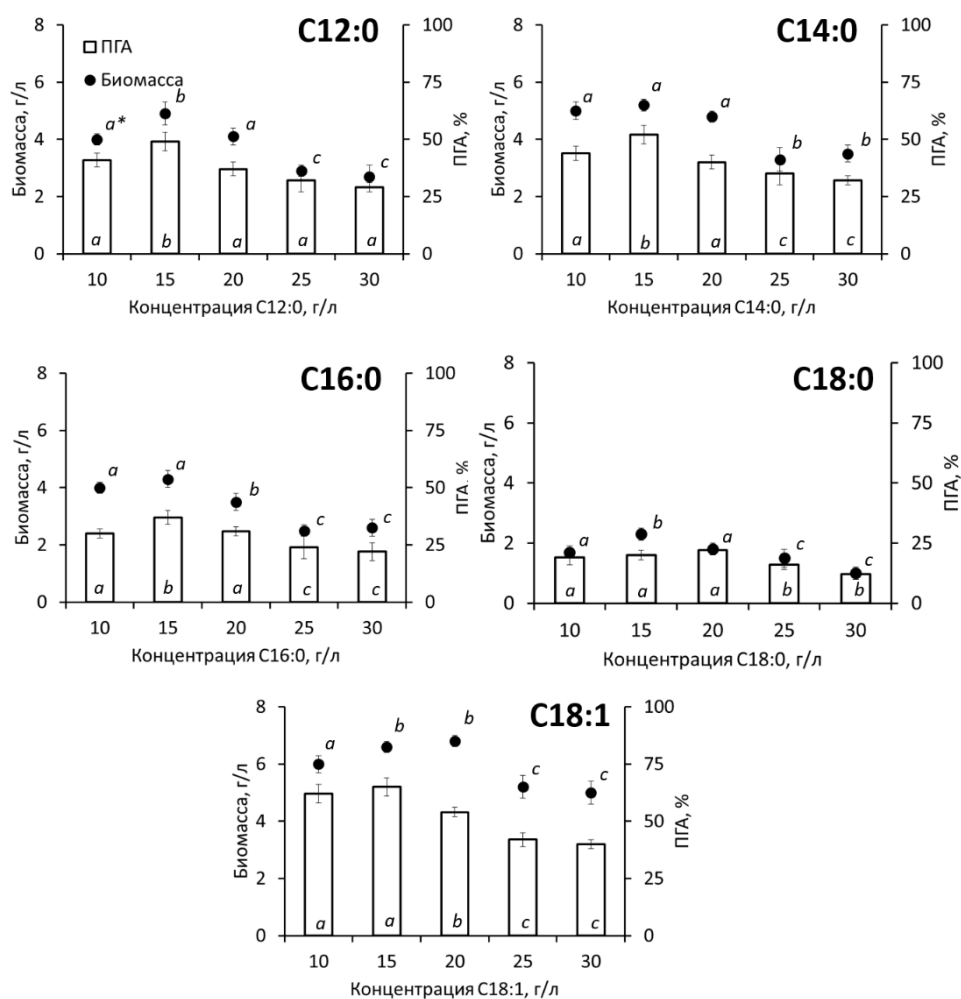


Рисунок 9 – Влияние концентрации жирных кислот на урожай биомассы *C. necator* B-10646 и синтез ПГА (*одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Самый высокий выход биомассы бактерий (X, г/л) к концу культивирования среди насыщенных жирных кислот был получен при росте бактерий на миристиновой кислоте и составил $7,5 \pm 0,4$ г/л. Несколько ниже ($6,7 \pm 0,3$ г/л) показатель зарегистрирован в случае роста бактерий на лауриновой кислоте. Наименьший урожай биомассы бактерий ($2,5 \pm 0,4$ г/л) отмечен на стеариновой кислоте. Рост бактерий на пальмитиновой кислоте был сопоставим с результатами, полученными на миристиновой и лауриновой кислотах, но только в течение первых 48 ч культивирования бактерий, а к 72 ч отмечено снижение этого показателя, что говорит о гибели части клеток в культуре. Использование в качестве углеродного субстрата моновенасыщенной олеиновой кислоты обеспечило наибольший урожай биомассы бактерий, превышающий значения, полученные для насыщенных жирных кислот. Концентрация биомассы бактерий ($6,6 \pm 0,3$ г/л), сопоставимая с полученными в конце культивирования значениями для

лауриновой и миристиновой кислот, была достигнута уже на 48 ч роста, а к 72 ч составил $8,2 \pm 0,3$ г/л, что близко к результатам, полученным на сахарах для данного штамма (Zhila et al., 2015).

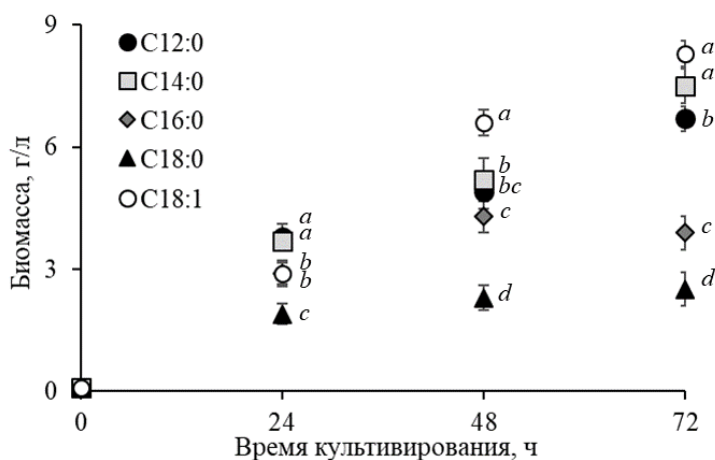


Рисунок 10 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646 при росте на жирных кислотах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Внутриклеточное содержание полимера в культуре бактерий *C. necator* B-10646 показано на Рисунке 11. Максимальное накопление ПГА среди насыщенных жирных кислот показано для миристиновой (74 ± 2 %) и лауриновой (75 ± 2 %) кислот, результаты, полученные для пальмитиновой (47 ± 3 %) и стеариновой (28 ± 4 %) кислот значительно уступают. Содержание ПГА при использовании олеиновой кислоты (85 ± 4 %) превысило значения, полученные для насыщенных ЖК, что сопоставимо с данными, полученным при использовании сахаров (Zhila et al., 2015).

Результаты сравнительного анализа продуктивности культуры *C. necator* B-10646 при росте на жирных кислотах представлены в Таблице 3. Самые высокие значения продукционных показателей получены при использовании олеиновой кислоты: продуктивность культуры *C. necator* B-10646 по биомассе бактерий (P_X) и полимеру ($P_{ПГА}$) составила, соответственно, $0,115 \pm 0,006$ 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. Показатели продуктивности, полученные при росте бактерий на миристиновой и лауриновой кислоте, были близки, но уступали результатам, полученным на олеиновой кислоте, хотя экономические коэффициенты по биомассе в этом случае были несколько выше – Y_X $0,71 \pm 0,04$ и $0,69 \pm 0,04$ г/г для миристиновой и лауриновой кислот соответственно. При росте бактерий на пальмитиновой кислоте продуктивность по биомассе и полимеру, а также $Y_{ПГА}$, рассчитанные на 48 ч роста, поскольку далее прироста биомассы и ПГА не отмечалось, снизились: P_X до $0,090 \pm 0,007$ и $P_{ПГА}$ до $0,033 \pm 0,004$ г/л·ч, и $Y_{ПГА}$

до $0,025 \pm 0,05$ г/г. Наименее продуктивным был процесс на стеариновой кислоте – все показатели были значительно ниже.

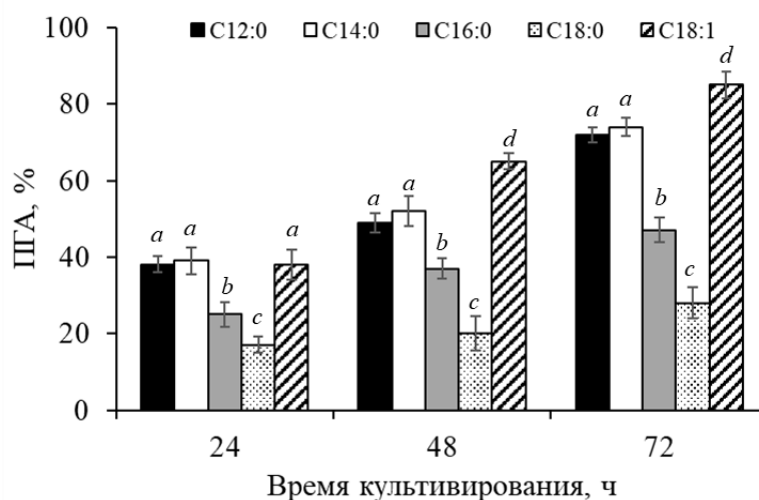


Рисунок 11 – Содержание ПГА в клетках бактерий *C. necator* B-10646 при росте на жирных кислотах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Таблица 3 – Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* B-10646 при росте на жирных кислотах

ЖК	t, ч	X, г/л	ПГА, г/л	Y _X , г/г	Y _{ПГА} , г/г	P _X , г/л·ч	P _{ПГА} , г/л·ч
C12:0	72	$6,7 \pm 0,3^a$	$5,0 \pm 0,4^a$	$0,69 \pm 0,04^a$	$0,52 \pm 0,07^a$	$0,093 \pm 0,005^a$	$0,069 \pm 0,004^a$
C14:0	72	$7,5 \pm 0,4^b$	$5,6 \pm 0,3^a$	$0,71 \pm 0,04^a$	$0,53 \pm 0,05^a$	$0,104 \pm 0,006^a$	$0,078 \pm 0,005^a$
C16:0	48	$4,3 \pm 0,4^c$	$1,6 \pm 0,2^b$	$0,66 \pm 0,05^a$	$0,25 \pm 0,05^b$	$0,090 \pm 0,007^b$	$0,033 \pm 0,004^b$
C18:0	48	$2,3 \pm 0,3^d$	$0,5 \pm 0,1^c$	$0,68 \pm 0,04^a$	$0,15 \pm 0,04^c$	$0,048 \pm 0,004^c$	$0,010 \pm 0,002^c$
C18:1	72	$8,3 \pm 0,3^a$	$7,1 \pm 0,4^d$	$0,65 \pm 0,06^a$	$0,55 \pm 0,05^a$	$0,115 \pm 0,006^d$	$0,099 \pm 0,003^d$

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Анализ литературных данных показал, что урожай биомассы бактерий и полимера при культивировании бактерий на различных жирных кислотах с длиной углеродной цепи от 12 до 18 атомов углерода также широко варьирует. Урожай биомассы и ПГА, полученные в культуре *C. necator* B-10646 при использовании олеиновой и миристиновой кислот, превосходят данные, имеющиеся в литературе для большинства бактерий различных таксонов, а также для близкородственных штаммов *Alcaligenes* sp. AK 201 (Akiyama et al., 1992) и *C. necator* DSM 454 (Povolo et al., 2015). Количественные показатели при культивировании *C. necator* B-10646 на

лауриновой кислоте, также превосходят аналогичные данные в культурах *A. hydrophila* и *A. salmocida* (Chen et al., 2012; 2013), *K. pneumoniae* (Chen et al., 2001), *Burkholderia* sp. (Chee et al., 2010) и *B. cereus* (Valappil et al., 2007), но несколько уступают данным для отдельных штаммов *P. putida*, в культуре которых получено до 10,6 г/л биомассы и до 91,0 % ПГА (Gumel, 2014). Опубликованные данные по росту бактерий и синтезу ПГА на пальмитиновой и стеариновой жирных кислотах ограничены и в целом по продукционным показателям уступают результатам, полученным в культуре *C. necator* В-10646 (Chen et al., 2012; Impallomeni et al., 2000; Povolito et al., 2015). Лишь в одной работе (Gumel, 2014) описаны результаты с более высоким внутриклеточным содержанием ПГА в культурах *P. putida* и *D. tsuruhatensis*, до 65,3 и 53,8 % соответственно.

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно заключить, что для штамма *C. necator* В-10646 наиболее эффективным субстратом из группы жирных кислот, обеспечивающим высокие выходы как биомассы, так и ПГА (до 8,2 г/л и 85 % ПГА соответственно), является моноеновая олеиновая кислота.

3.3 Заключение к главе

Исследована возможность природного штамма *C. necator* В-10646 к росту и синтезу ПГА при культивировании на жирах растительного происхождения. В результате сравнительного анализа углеродных субстратов, установлено, что наиболее эффективными с точки зрения продукционных показателей культуры бактерий, сопоставимых с результатами процесса на сахарах, являются: из группы растительных масел – пальмовое масло, из группы жирных кислот – олеиновая кислота. Показано, что указанные источники углерода позволяют достичь урожаев биомассы бактерий 6,5-8,3 г/л при внутриклеточном содержании ПГА на уровне 65-85 %. Для всех субстратов был установлен их жирнокислотный состав и выявлено избирательное и неравномерное потребление жирных кислот в составе растительных масел.

ГЛАВА 4 Закономерности синтеза полигидроксиалканоатов на жирах животного происхождения

Помимо растительных масел огромным потенциалом для биосинтеза ПГА обладают липиды животного происхождения, которые образуются, в частности, на предприятиях пищевой промышленности и убой скота. Побочные и сопутствующие продукты животного происхождения, в частности жировые отходы, как правило, являются дешевыми, доступны в больших количествах и поэтому могут рассматриваться как перспективный субстрат для получения биопластиков.

4.1 Жировые отходы рыбопереработки как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов

Жиры рыбного происхождения как субстрат для роста микроорганизмов и синтеза ПГА обладают достаточно высоким потенциалом. Общеизвестно, что рыбосодержащие продукты являются богатым источником полиеновых жирных кислот, среди которых эйкозапентаеновая, докозагексаеновая и другие жирные кислоты, обладающие высокой биологической ценностью. Несмотря на это, рассматривать чистый рыбий жир как субстрат для культивирования микроорганизмов нерационально, ввиду его высокой ценности для рациона человека, и, следовательно, высокой стоимости такого вида сырья. Однако, в процессе изготовления рыбных продуктов, рыбоперерабатывающая отрасль образует огромное количество отходов, которые сложно утилизировать. Такие отходы являются дешевыми, богаты липидами и могут быть рассмотрены как субстрат для культивирования микроорганизмов и синтеза ПГА.

Этот раздел работы освещает результаты исследования трех типов рыбных жиров, полученных из различных источников, в качестве углеродного субстрата для роста бактерий *C. necator* B-10646 и накопления ПГА: из голов копченой балтийской кильки (*Sprattus sprattus balticus*), из голов и хребтов свежей атлантической скумбрии (*Scomber scombrus*), а также из внутренних органов судака (*Sander lucioperca*). Это отходы рыбоконсервных заводов ООО «РосКон» и АО «Калининградский тарный комбинат» трех типов: отходы производства консервов «Шпроты в масле», производства консервов «Скумбрия натуральная в масле» и производства филе и фарша судака (Zhila et al., 2023c; 2023d).

Выбор этих отходов обусловлен их большими объемами. Мировой вылов кильки, используемой для производства консервов, составляет около 500 тыс. т в год (Sangkharak et al., 2021). Консервы из шпрот в больших объемах производятся в странах Балтии, Черного моря, Прикаспия, на Фарерских островах, в Норвегии, России. Только на рыбоперерабатывающих предприятиях Калининградской области в сутки образуется около 20 т рыбных отходов (головы, внутренности, хребты и другие рыбные отходы от разделки на пищевые цели) (Argiz et al., 2021). При этом, около 10 т отходов в сутки приходится только на головы копченой кильки. Отходы при переработке скумбрии составляют около 30-35 % от массы вылова (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2020). Отходы при изготовлении пищевой продукции из судака по нормативам могут достигать 60 % при производстве филейных продуктов (Единые нормы отходов, потерь, выхода готовой продукции и расхода сырья при производстве пищевой продукции из морских гидробионтов, 2002). Эти отходы непригодны для переработки в корма для сельского хозяйства и аквакультуры и вывозятся на городские полигоны ТБО и сжигаются. Это делает целесообразным поиск решений по использованию этих жиросодержащих отходов, в том числе в качестве потенциального сырья в процессах получения целевых биотехнологических продуктов.

Основными компонентами жировой фракции рыбных отходов, аналогично растительным маслам, преимущественно являются триацилглицериды. Состав такого сырья зависит не только от источника (головы, внутренности, плавники, хребты и др.), технологии и очистки, но и от видовой специфики рыб, их трофики и среды обитания. С целью оценки жиров, полученных из отходов рыбоперерабатывающей промышленности, в качестве субстрата для роста бактерий *S. necator* В-10646 и синтеза ПГА на первом этапе был определен их биохимический состав (Таблица 4).

Таблица 4 – Биохимический состав жиров, полученных из отходов рыбопереработки

Источник жира	Липиды, %	Сырой протеин, %	Углеводы, %
Килька балтийская	94,6±1,3 ^a	1,65±0,09 ^a	0,53±0,10 ^a
Скумбрия атлантическая	89,6±1,6 ^b	3,14±0,22 ^b	0,50±0,07 ^a
Судак обыкновенный	95,2±1,4 ^a	1,51±0,10 ^a	0,18±0,03 ^b

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

В составе исследованных жировых отходов выявлены некоторые различия. Наибольшее содержание липидов (94,6-95,2 %) характерно для жиров, полученных из кильки балтийской и судака обыкновенного. Содержание липидов в пробах жира, полученных из скумбрии, было

несколько ниже – 89,6 %. Содержание сырого протеина во всех образцах было близким (1,5-1,7 %), за исключением жира из скумбрии, который характеризовался более высокой долей сырого протеина (3,14 %). Содержание углеводов во всех исследованных образцах составило не более 0,5 %.

Как в случае с жирами растительного происхождения, непосредственным источником углеродного питания при использовании рыбных жиров выступают отдельные жирные кислоты, поэтому для всех исследованных типов рыбных жиров был определен и охарактеризован их жирнокислотный состав (Таблица 5). В образцах жира, полученного из кильки балтийской, преобладали пальмитиновая, олеиновая и докозагексаеновая жирные кислоты, доля которых составила, соответственно, $28,2 \pm 1,9$ и $25,4 \pm 1,0$ и $16,8 \pm 0,9$ %. Значимым было присутствие в составе таких кислот как миристиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая, тимнодоновая и нервоновая, содержание которых варьировало от 1,5 до 8,7 %; доля остальных кислот занимала менее 1 %. Соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным в этом образце жира составило $0,62 \pm 0,03$ при общем количестве полиеновых кислот $32,7 \pm 2,0$ %. Доля длинноцепочечных ЖК составила $29,3 \pm 2,6$ % от общей суммы. Жир, извлеченный из скумбрии атлантической, по соотношению доминирующих ЖК был близок к жиру, полученному из кильки балтийской. Содержание докозагексаеновой, пальмитиновой и олеиновой жирных кислот составило $16,9 \pm 0,3$, $26,2 \pm 0,8$ и $32,7 \pm 1,6$ %. Доля линоленовой кислоты ($0,8 \pm 0,1$ %) была ниже по сравнению с жиром, полученным из кильки, а эйкозеновая кислота не была идентифицирована в составе этого типа жира. Соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК составило $0,64 \pm 0,02$, что обусловлено высокой долей насыщенных ($39,2 \pm 1,5$ %) и низкой долей ненасыщенных ЖК; также отмечено более низкое содержание длинноцепочечных кислот – до $24,5 \pm 1,8$ %. Жир, полученный из судака обыкновенного, отличался от предыдущих образцов: среди доминирующих были пальмитиновая ($17,1 \pm 1,6$ %), пальмитолеиновая ($22,5 \pm 1,3$ %) и олеиновая ($26,8 \pm 0,8$ %) жирные кислоты. В отличие от других типов жира, содержание докозагексаеновой кислоты было значительно ниже – $6,7 \pm 1,2$ %. Для этого типа жира отмечено минимальное ($27,6 \pm 2,2$ %) и максимальное ($72,4 \pm 2,7$ %) суммарное содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, соответственно, что обеспечило самое низкое среди прочих типов жира соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным – $0,38 \pm 0,08$. Однако, это обусловлено, по большей части, высокой долей непосредственно моноеновых жирных кислот ($50,4 \pm 2,4$ %), тогда как доля полиеновых кислот была наименьшей ($22,0 \pm 0,9$ %) среди всех исследованных типов жира, причем содержание длинноцепочечных жирных кислот также было наименьшим – $18,2 \pm 1,9$ %. Содержание жирных кислот в исследованных типах жира было близким – 0,46-0,52 г ЖК/г жира.

Таблица 5 – Жирнокислотный состав рыбных жиров, исследованных в качестве источника углерода для синтеза ПГА (% от общей суммы жирных кислот)

Жирная кислота	Источник жира		
	Килька балтийская	Скумбрия атлантическая	Судак обыкновенный
Миристиновая C14:0	3,5±0,5 ^{a*}	2,8±1,2 ^a	3,2±0,7 ^a
Пентадекановая C15:0	0,5±0,2 ^a	0,6±0,2 ^a	0,6±0,1 ^a
Пальмитиновая C16:0	28,2±1,9 ^a	26,2±0,8 ^a	17,1±1,6 ^b
Пальмитолеиновая C16:1ω7	0,3±0,1 ^a	2,7±0,2 ^b	22,5±1,3 ^c
Гексадекадиеновая C16:2ω6	–	–	0,7±0,2
Маргариновая C17:0	–	0,7±0,1 ^a	0,8±0,3 ^a
Стеариновая C18:0	4,5±0,5 ^a	6,4±0,4 ^b	4,5±0,3 ^a
Олеиновая C18:1ω9	25,4±1,0 ^a	32,7±1,6 ^b	26,8±0,8 ^a
Линолевая C18:2ω6	2,5±0,5 ^a	0,4±0,2 ^b	–
Линоленовая C18:3ω3	4,3±0,7 ^a	0,8±0,1 ^b	3,3±0,3 ^a
Арахидиновая C20:0	0,3±0,2 ^a	0,3±0,2 ^a	–
Эйкозеновая C20:1ω9	1,1±0,1 ^a	–	–
Эйкозодиеновая C20:2ω6	0,4±0,1 ^a	0,2±0,1 ^a	–
Эйкозатриеновая C20:3ω3	–	–	0,1±0,02 ^a
Эйкозатетраеновая C20:4ω6	–	0,9±0,3 ^a	4,7±0,4 ^b
Тимнодоновая C20:5ω3	8,7±0,5 ^a	4,3±0,6 ^b	6,5±0,3 ^c
Бегеновая C22:0	0,5±0,2 ^a	0,4±0,1 ^a	–
Докозеновая C22:1ω9	–	–	–
Докозагексаеновая C22:6ω3	16,8±0,9 ^a	16,9±0,3 ^a	6,7±1,2 ^b
Нервоновая C24:1ω9	1,5±0,4 ^a	0,7±0,1 ^b	0,2±0,1 ^c
Прочие**	1,5±0,7 ^a	2,4±0,7 ^a	2,5±0,7 ^a
Σ ЖК (г/г жира)	0,51±0,03 ^a	0,46±0,03 ^a	0,52±0,04 ^a
Σ Насыщенных ЖК	38,3±2,5 ^a	39,2±1,5 ^a	27,6±2,2 ^b
Σ Насыщенных ЖК / Σ ненасыщенных ЖК	0,62±0,03 ^a	0,64±0,02 ^a	0,38±0,08 ^b
Σ Моноеновых ЖК	29,0±1,5 ^a	36,7±2,2 ^b	50,4±2,4 ^c
Σ Полиеновых ЖК	32,7±2,0 ^a	24,1±1,4 ^b	22,0±0,9 ^b
Σ Длинноцепочечных ЖК (>18 атомов С)	29,3±2,6 ^a	24,5±1,8 ^b	18,2±1,9 ^c

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$; ** – изо-, антеизо-, разветвленные ЖК.

Литературные данные о составе жирных кислот жировых отходов рыбопереработки, изучаемых в качестве субстратов для биосинтеза ПГА немногочисленны. В работе (Ashby et al., 2008) охарактеризованы гидролизаты сырого жира из субпродуктов минтая (*Gadus chalcogrammus*) (соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным – 0,35); показано, что они представлены жирными кислотами с длиной углеродной цепи от 14 до 22 атомов углерода,

причем преобладающим типом являются моноеновые жирные кислоты (28,0 %), а также кислоты с длиной цепи до 20 атомов углерода. Состав другого типа рыбных жиров включал 58,0 % белка и 19,0 % минеральных веществ и липидов; содержание пальмитиновой и олеиновой жирных кислот оценивалось до 22,0 %. В составе отработанного жира пангасиуса (*Pangasius bocourti*) (соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным – 0,84) преобладали олеиновая (до 38,6 %) и пальмитиновая (до 30,6 %) кислоты, значительным было содержание линолевой, стеариновой, миристиновой и пальмитолеиновой жирных кислот (до 9,0, 8,2, 4,2 и 2,5 % соответственно) (Loan et al., 2022; Thuoc et al., 2019; 2021). Сравнение исследованных типов жировых отходов с ранее опубликованными данными показало, что жир из балтийской кильки по составу схож с жиром из минтая, но содержит больше докозагексаеновой и пальмитиновой кислот; в нем также содержится линоленовая жирная кислота, а эйкозатетраеновая жирная кислота отсутствует. При сравнении составов отходов производства и обработки пангасиуса с жиром из кильки обнаружено, что отходы пангасиуса характеризуются низким содержанием полиеновых длинноцепочечных жирных кислот. В жировых отходах из скумбрии отмечено более низкое содержание полиеновых жирных кислот. Таким образом, исследованные типы жировых отходов переработки различны по своему биохимическому и жирнокислотному качественному и количественному составу и будут рассмотрены с точки зрения их потенциала в качестве субстрата для роста бактерий и биосинтеза ПГА.

Поскольку жиры из отходов переработки являются многокомпонентным и малоизученным субстратом для роста бактерий, необходимо определить концентрацию этого субстрата в питательной среде, позволяющую достигнуть наиболее высоких показателей по биомассе бактерий и внутриклеточному содержанию ПГА. Ввиду этого было исследовано влияние различных концентраций трех образцов жира (от 10 до 30 г/л) на рост бактерий *C. necator* В-10646 и синтез ПГА (Рисунок 12). Наиболее высокие выходы бактериальной биомассы (4,3-4,6 г/л) были получены при выращивании *C. necator* В-10646 на жире из кильки балтийской в диапазоне концентраций от 15 до 25 г/л, более высокая концентрация (30 г/л) подавляла рост бактерий – урожай биомассы снижался до $2,7 \pm 0,3$ г/л. Снижение концентрации этого жира до 10 г/л также ограничивало рост бактерий (до $2,2 \pm 0,2$ г/л). Максимальное содержание полимера в клетках (58-60 %) получено при аналогичных для биомассы бактерий концентрациях субстрата – 15-25 г/л. При более низких или высоких концентрациях содержание полимера не превышало 40 %. Близкие результаты получены при использовании жира, полученного из судака обыкновенного: концентрации этого субстрата в среде, способствующие достижению более высоких показателей по биомассе и ПГА, лежали в диапазоне 15-25 г/л. При исследовании жира, полученного из скумбрии атлантической, обнаружено, что концентрация субстрата в среде свыше 15 г/л вызывает снижение как урожая биомассы, так и накопления полимера в клетках

бактерий. Таким образом, концентрации рыбных жиров для роста бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА были выбраны следующие: 20 г/л для жиров, полученных из кильки и судака и 15 г/л для жира, полученного из скумбрии.

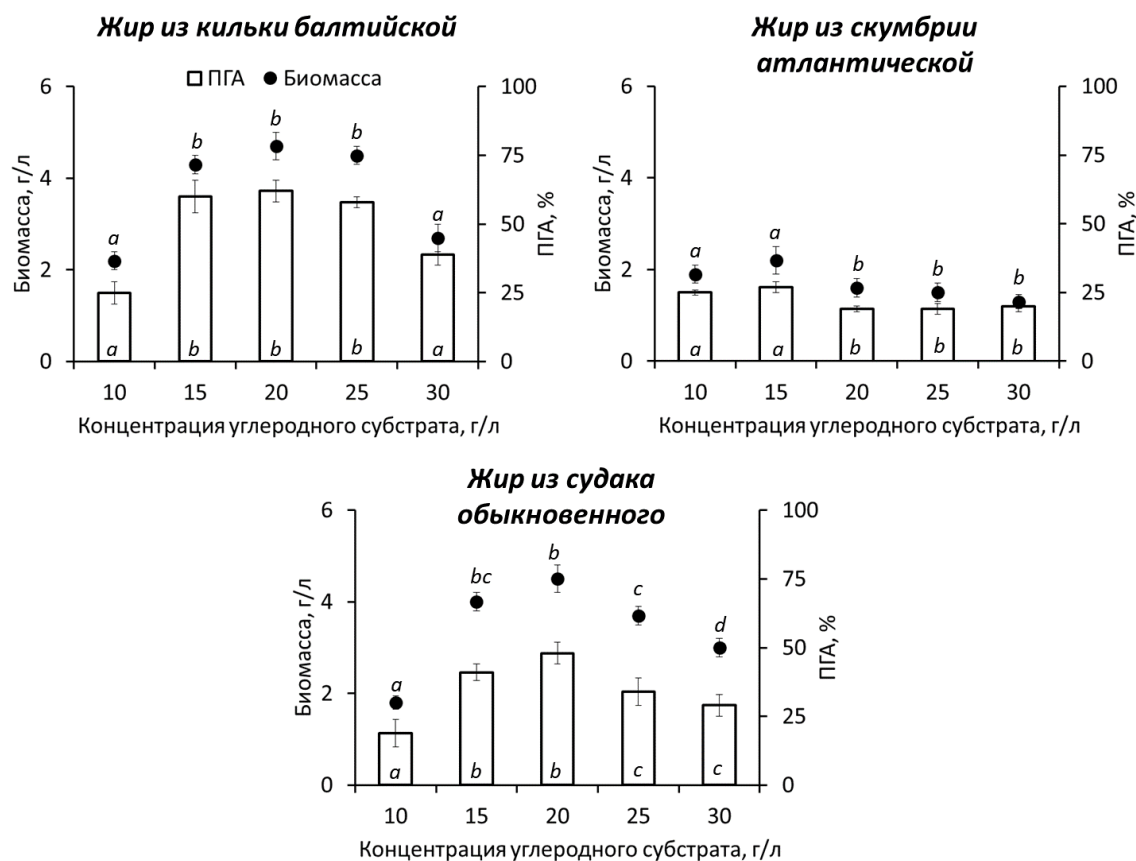


Рисунок 12 – Влияние концентрации рыбных жиров на урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 и синтез ПГА (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Данные по росту бактерий согласуются с липолитической активностью, которая достигала максимума через 12-24 часов культивирования. Самая высокая липазная активность (порядка 8,2-8,4 Ед./мл) зарегистрирована при росте бактерий на жире, полученном из кильки; для других жиров отмечена несколько сниженная (до 6,5-6,8 Ед./мл) активность.

На основании подобранных концентраций субстрата в среде были исследованы накопление биомассы и синтез ПГА штаммом *C. necator* В-10646 в динамике (72 ч) (Рисунок 13, 14), а также рассчитаны продукционные показатели (Таблица 6).



Рисунок 13 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646 при росте на рыбных жирах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Наиболее высокая концентрация биомассы бактерий *C. necator* B-10646 на протяжении культивирования отмечалась при росте штамма на жире из балтийской кильки – до $4,7 \pm 0,3$ г/л на 72 ч роста. Жир из судака обыкновенного позволил получить близкие результаты лишь к 48-72 ч роста (до $4,5 \pm 0,4$ г/л биомассы). Самая низкая концентрация биомассы была получена при культивировании бактерий на жире из скумбрии – до $2,2 \pm 0,3$ г/л. При анализе внутриклеточного содержания ПГА показано, что максимальные значения, до 65 ± 2 %, также достигаются при использовании жира из балтийской кильки. При росте бактерий на жире из судака обыкновенного и скумбрии атлантической содержание ПГА было значительно ниже – 48 ± 4 и 27 ± 2 % соответственно (Рисунок 14).

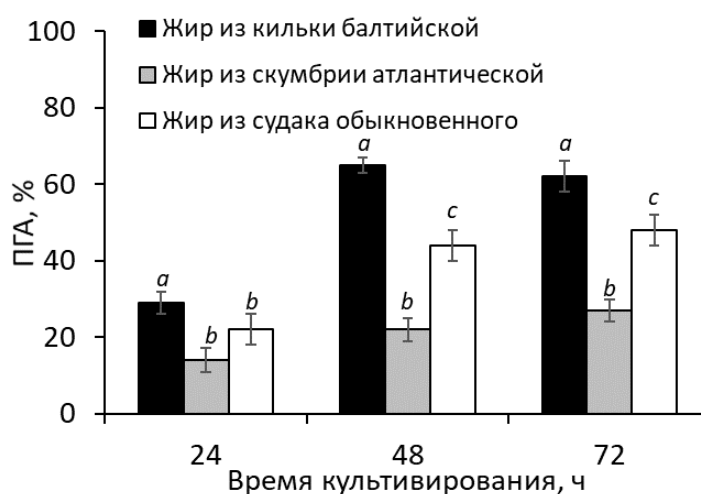


Рисунок 14 – Содержание ПГА в клетках бактерий *C. necator* B-10646 при росте на рыбных жирах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Наибольшую продуктивность процесса как по биомассе бактерий, так и по полимеру, рассчитанные на 48 ч роста, поскольку для большинства исследованных жиров далее значимого прироста биомассы и ПГА не отмечалось, обеспечивали жиры, полученные из кильки балтийской и судака обыкновенного. В первом случае эти показатели были самыми высокими и составили $0,094 \pm 0,006$ и $0,060 \pm 0,003$ г/л·ч по биомассе и ПГА соответственно; во втором случае продуктивность была несколько ниже, соответственно, $0,083 \pm 0,002$ и $0,030 \pm 0,004$ г/л·ч. Для жира из скумбрии атлантической P_X была значительно ниже – $0,031 \pm 0,004$ г/л·ч, а $P_{ПГА}$ уступала на порядок и составила $0,008$ г/л·ч.

Таблица 6 – Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на рыбных жирах

Источник жира	t, ч	X, г/л	ПГА, г/л	Y_X , г/г	$Y_{ПГА}$, г/г	P_X , г/л·ч	$P_{ПГА}$, г/л·ч
Килька балтийская	48	$4,5 \pm 0,3^a$	$2,9 \pm 0,3^a$	$0,52 \pm 0,05^a$	$0,34 \pm 0,03^a$	$0,094 \pm 0,006^a$	$0,060 \pm 0,003^a$
Скумбрия атлантическая	48	$1,6 \pm 0,4^b$	$0,4 \pm 0,1^b$	$0,48 \pm 0,03^a$	$0,13 \pm 0,02^b$	$0,031 \pm 0,004^b$	$0,008 \pm 0,002^b$
Судак обыкновенный	48	$4,0 \pm 0,4^a$	$1,8 \pm 0,4^a$	$0,45 \pm 0,02^a$	$0,21 \pm 0,02^a$	$0,083 \pm 0,002^a$	$0,031 \pm 0,004^a$

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Анализ экономических коэффициентов по биомассе (Y_X) и по полимеру ($Y_{ПГА}$) показал, что значимых отличий для всех исследованных жиров обнаружено не было – Y_X варьировал в диапазоне 0,45-0,52 г биомассы/г жира. Экономические коэффициенты по полимеру, напротив, отличались. Самые высокие значения $Y_{ПГА}$, аналогично данным по продуктивности процесса, показаны для жира, полученного из кильки балтийской ($0,34 \pm 0,03$ г ПГА/ г жира), несколько ниже – для жира из судака обыкновенного ($0,21 \pm 0,02$ г ПГА/г жира); при использовании жира из скумбрии $Y_{ПГА}$ был значительно ниже и составил $0,13 \pm 0,02$ г ПГА/г жира.

Аналогично растительным маслам, вопрос утилизации субстрата бактериями был рассмотрен более детально – оценивали изменение содержания основных жирных кислот в составе жиров в конце культивирования по сравнению с их исходным составом (Рисунок 15). Сравнение исходного состава ЖК в исследуемых жировых субстратах и его изменения в ходе развития культуры бактерий показало избирательность потребления ЖК. Это привело к изменению процентного соотношения отдельных кислот по сравнению с исходным составом жиров.

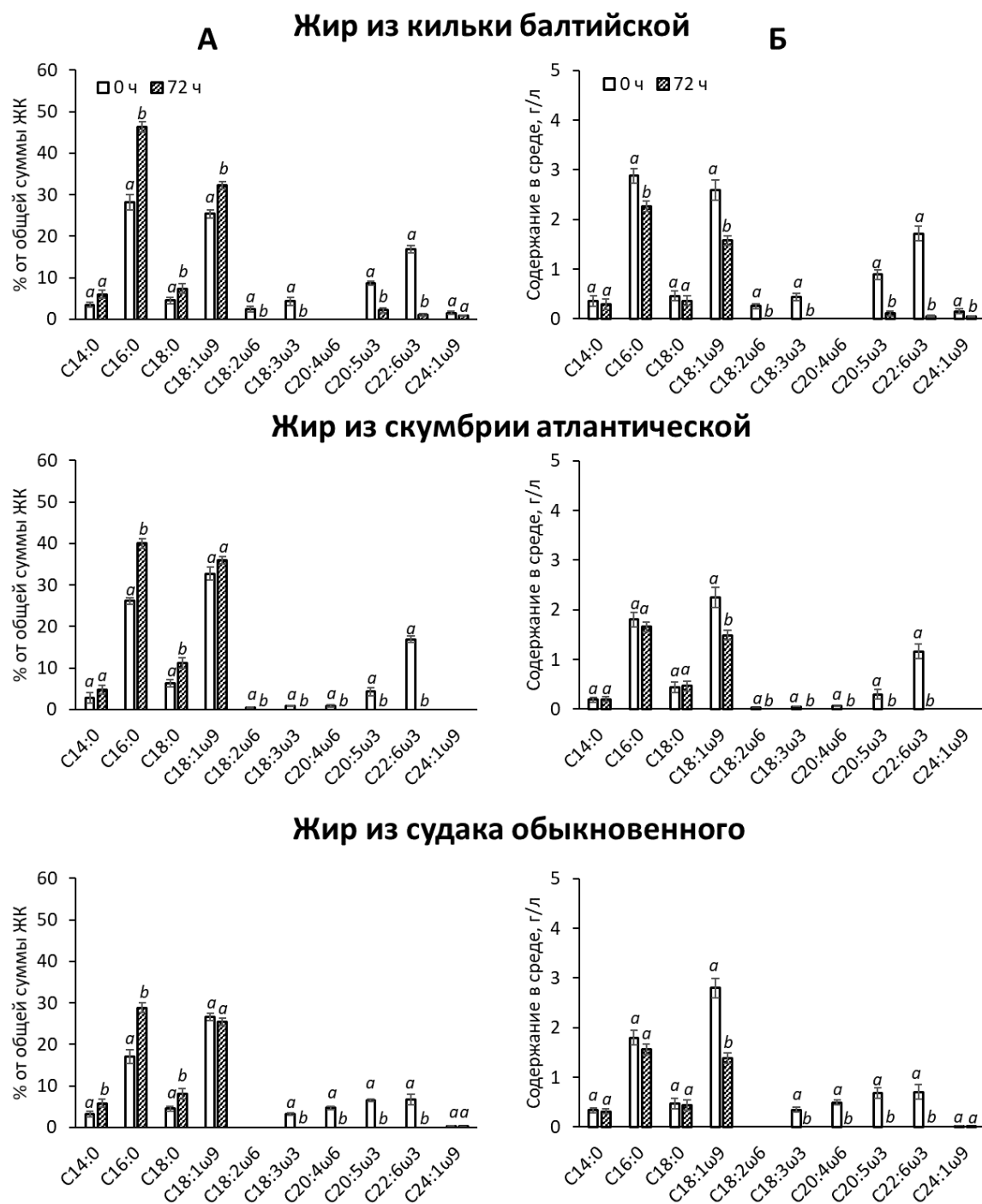


Рисунок 15 – Соотношение жирных кислот в составе рыбных жиров в начале и конце культивирования (А) и их содержание в среде (Б) (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Исследование процентного соотношения ЖК в составе жира из кильки балтийской, и их концентрации в среде в начале и конце культивирования показало, что бактерии в первую очередь утилизировали полиненасыщенные жирные кислоты – линолевую, линоленовую, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты, к концу культивирования (72 ч) они были

практически полностью исчерпаны. Менее эффективно бактерии использовали нервоновую, олеиновую и пальмитиновую кислоты. Содержание миристиновой и стеариновой кислот оставалось неизменным, что свидетельствует о том, что эти кислоты не утилизировались культурой бактерий. При использовании жиров, полученных из скумбрии и судака отмечена схожая динамика потребления жирных кислот культурой бактерий: насыщенные и моноеновые кислоты с длиной цепи 18 и менее атомов углерода также слабо потреблялись культурой бактерий или не утилизировались вовсе. Длинноцепочечные полиеновые эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты, а также линолевая и линоленовая кислоты были использованы культурой бактерий наиболее активно, олеиновая кислота – менее интенсивно. Таким образом, показано, что независимо от источника рыбного жира, штамм *C. necator* B-10646 избирательно утилизирует определенные жирные кислоты в составе комплексного субстрата, отдавая предпочтение длинноцепочечным полиеновым жирным кислотам, тогда как насыщенные и моноеновые кислоты с более короткой цепью (от 14 до 18 атомов углерода) утилизируются хуже или не используются вовсе.

Несмотря на то, что рыбные жиры в составе отходов рыбопереработки – это достаточно новый субстрат для синтеза ПГА, ввиду чего литературные данные по этому вопросу весьма ограничены, результаты, полученные в настоящем разделе работы, согласуются с имеющимися в литературе данными с использованием других типов рыбных отходов, а иногда превосходят таковые. Для близкородственного штамма *C. necator* TISTR 1095 показано накопление биомассы и полимера до 7,5 г/л и 50 %, соответственно, при использовании конденсата отходов переработки тунца в качестве углеродного субстрата (Sangkharak et al., 2021). Культивирование изолятов *Ralstonia* sp. в колбах на сыром рыбьем жире обеспечило более низкие урожаи биомассы бактерий (0,59-3,93 г/л), хотя содержание ПГА в клетках было достаточно высоким – 51-62 % (Thuoc et al., 2021). Также показано, что при культивировании различных штаммов *Pseudomonas* на гидролизированных жировых отходах переработки минтая концентрация биомассы продуцентов составляла 1,7-4,7 г/л при содержании полимера 6-53 % (Ashby et al., 2008), а штамм бактерий *B. subtilis* KP172548 при выращивании на экстракте жирных кислот из рыбных отходов синтезировал до 70 % ПГА при концентрации клеток в культуре до 2,3 г/л (Mohapatra et al., 2017).

Полученные в данном разделе результаты весьма перспективны и показывают, что отходы рыбоперерабатывающей промышленности могут стать крупномасштабным субстратом для производства биоразлагаемых пластиков. Достигнутые производственные показатели по выходу биомассы продуцента и ПГА существенно различаются в зависимости от источника жира – видовой принадлежности рыбы, части туши и способа предварительной обработки, что требует индивидуального подхода и детальной оптимизации как состава питательных сред, так и процесса культивирования в целом.

4.2 Жиры животного происхождения как субстрат для биосинтеза полигидроксиалканоатов

В данном разделе рассматривается применение низкосортных животных жиров, полученных из различных источников, в качестве углеродного субстрата для роста бактерий *C. necator* B-10646 и синтеза ПГА (Сапожникова, 2025). За редким исключением, например, рыбного жира, который по своей консистенции является жидким, животные жиры – это твердые жиры с высокой долей насыщенных жирных кислот в их составе. Это может стать осложняющим обстоятельством в микробных ферментациях, тем не менее, эта группа жиросодержащих источников углерода также может быть рассмотрена в качестве субстратов для биосинтеза ПГА. Для исследования были выбраны три низкосортных жира животного происхождения: бараний жир (*Ovis aries*), говяжий жир (*Bos taurus*) и свиной жир (*Sus domesticus*). Все отобранные жиры были проанализированы и их жирнокислотный состав был определен (Таблица 7).

Таблица 7 – Жирнокислотный состав низкосортных животных жиров, исследованных в качестве источника углерода для синтеза ПГА (% от общей суммы жирных кислот)

Жирные кислоты	Бараний жир	Свиной жир	Говяжий жир
Тридекановая C13:0	–	0,4±0,1	–
Миристиновая C14:0	3,3±0,4 ^{a**}	–	3,4±0,2 ^a
Пентадекановая C15:0	0,8±0,2 ^a	–	1,3±0,3 ^a
Пальмитиновая C16:0	24,7±1,1 ^a	23,3±2,0 ^a	25,1±1,5 ^a
Пальмитолеиновая C16:1	1,8±0,2 ^a	–	5,0±0,2 ^b
Маргариновая C17:0	1,7±0,3 ^a	0,3±0,1 ^b	1,9±0,3 ^a
Маргаринолеиновая C17:1	0,9±0,2	–	–
Стеариновая C18:0	26,3±1,1 ^a	39,0±1,5 ^b	24,3±1,2 ^a
Олеиновая C18:1ω9	35,8±1,0 ^a	36,3±1,2 ^a	37,4±2,0 ^a
Линолевая C18:2ω6	–	0,7±0,1	–
Линоленовая C18:3ω3	1,6±0,4 ^a	–	1,6±0,2 ^a
Прочие*	3,1±0,4	–	–
Σ ЖК (г/г жира)	0,58±0,2 ^a	0,58±0,3 ^a	0,60±0,3 ^a
Σ Насыщенных ЖК	59,9±1,5 ^a	63,0±2,0 ^b	56,0±1,1 ^c
Σ Насыщенных ЖК / Σ ненасыщенных ЖК	1,49±0,12 ^a	1,70±0,09 ^b	1,27±0,09 ^c
Σ Моноеновых ЖК	38,5±1,3 ^a	36,3±1,9 ^a	42,4±1,8 ^b
Σ Полиеновых ЖК	1,6±0,2 ^a	0,7±0,1 ^b	1,6±0,2 ^a

* – изо-, антеизо- жирные кислоты; ** – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Исследованные животные жиры несколько отличались по жирнокислотному составу. В составе бараньего жира обнаружено 13 различных жирных кислот, из которых доминирующими были насыщенные жирные кислоты – пальмитиновая ($24,7 \pm 1,1$ %) и стеариновая ($26,3 \pm 1,1$ %), а также моноеновая олеиновая кислота ($35,8 \pm 1,0$ %). Тетрадекановая (C14:0) и маргариновая (C17:0) кислоты составляли $3,3 \pm 0,4$ и $1,7 \pm 0,3$ % соответственно, доли пальмитолеиновой (C16:1 ω 7) и линоленовой (C18:3 ω 3) кислот было близкими и составляли около 1,7 %, доля остальных кислот в составе этого типа жира была менее 1 %. Свиной жир характеризовался менее разнообразным жирнокислотным составом и был представлен шестью различными жирными кислотами, среди которых большая часть также приходилась на пальмитиновую ($23,3 \pm 2,0$ %), стеариновую ($39,0 \pm 1,5$ %) и олеиновую ($36,3 \pm 1,2$ %) жирные кислоты; содержание остальных кислот было минорным и не превышало 1 %. Третий тип жира – говяжий, имел в составе 8 различных жирных кислот, где по-прежнему доминировали пальмитиновая ($25,1 \pm 1,5$ %), стеариновая ($24,36 \pm 1,2$ %) и олеиновая ($37,4 \pm 2,0$ %) кислоты. Среди исследованных типов низкосортных животных жиров более высокое соотношение насыщенных ЖК к ненасыщенным было у свиного жира ($1,70 \pm 0,09$), для остальных жиров – несколько ниже, 1,27-1,49, общее содержание жирных кислот составило 0,58-0,60 г/г жира.

В предварительных экспериментах способность культуры бактерий *C. necator* В-10646 к росту и синтезу ПГА оценивали в экспериментах длительностью 48 ч, где указанный штамм выращивали в диапазоне концентраций животных жиров от 10 до 30 г/л (Рисунок 16). При использовании в качестве источника углерода бараньего и говяжьего жиров наиболее высокие урожай биомассы и содержание ПГА были получены при концентрации 10-15 г/л. Для свиного жира значимых отличий по выходу биомассы и ПГА в зависимости от использованной концентрации жира обнаружено не было. Ввиду этого, для дальнейших исследований всех трех типов жиров была выбрана концентрация 15 г/л. Во всех случаях, аналогично использованию растительных масел и рыбных жиров, также была зарегистрирована липолитическая активность культуры бактерий в пределах 4,2-6,1 Ед./мл.

Рост бактерий *C. necator* В-10646 на низкосортных животных жирах иллюстрирует Рисунок 17. Наибольшие выходы бактериальной биомассы в процессе культивирования зафиксированы при использовании бараньего жира, ($3,3 \pm 0,4$ г/л), это превышает результаты, полученные при использовании говяжьего и свиного жиров – $2,4 \pm 0,3$ и $1,2 \pm 0,3$ г/л соответственно.

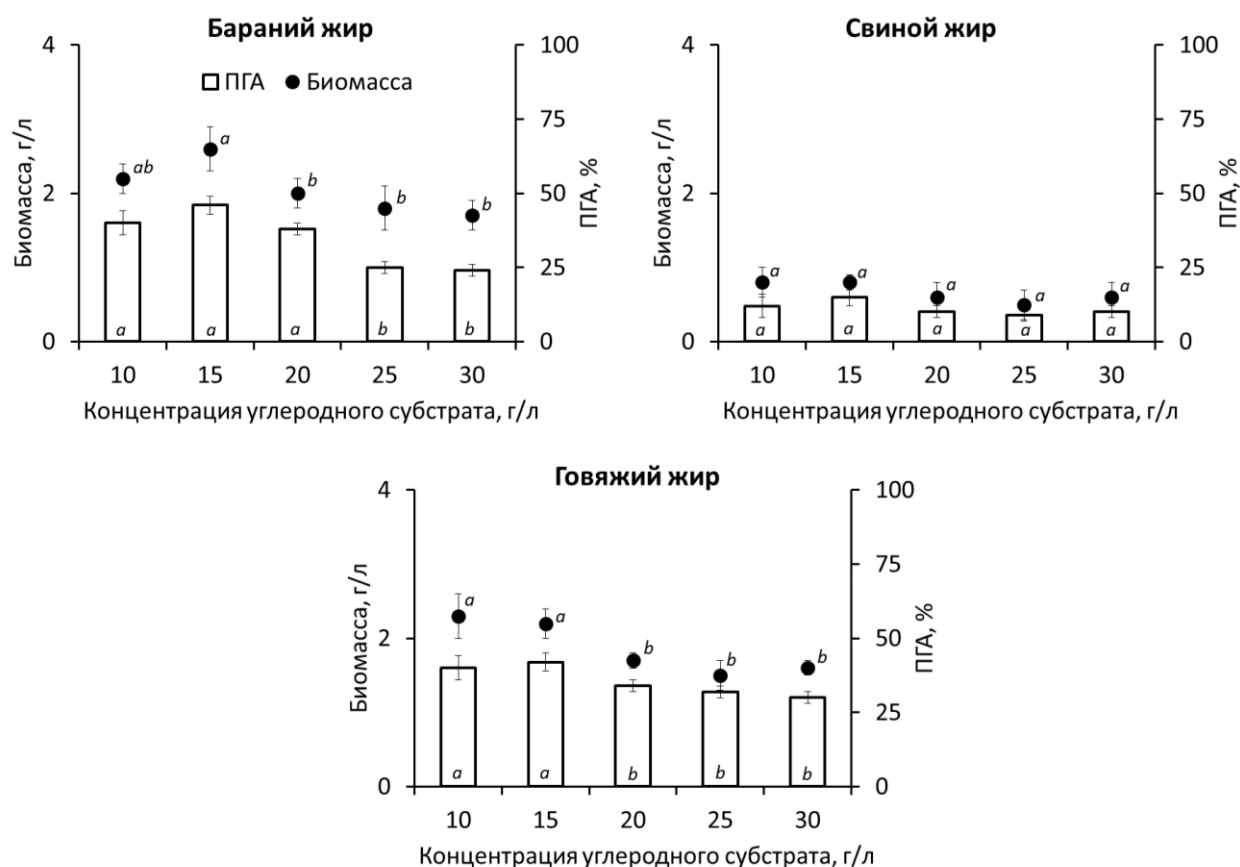


Рисунок 16 – Влияние концентрации низкосортных животных жиров на урожай биомассы *C. necator* В-10646 и синтез ПГА (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

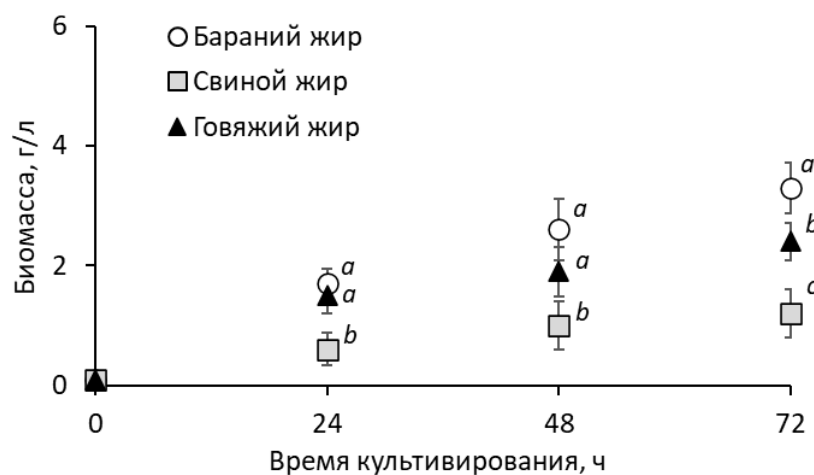


Рисунок 17 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646 при росте на низкосортных животных жирах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$)

Анализ внутриклеточного содержания ПГА при росте бактерий на низкосортных животных жирах показал следующее (Рисунок 18). Наиболее высокие результаты были получены при использовании бараньего и говяжьего жиров: содержание ПГА в клетках бактерий составило 64 ± 3 и 58 ± 4 % соответственно. Самое низкое содержание ПГА отмечено при росте бактерий на свином жире – этот показатель не превышал 12 % на протяжении всего процесса культивирования.

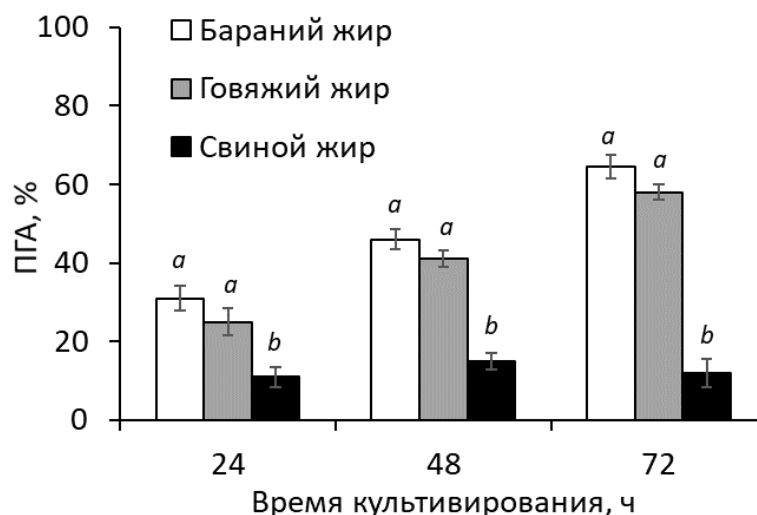


Рисунок 18 – Содержание ПГА в клетках бактерий *C. necator* B-10646 при росте на низкосортных животных жирах (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными при использовании рыжикового масла, но значительно уступают результатам при использовании миристиновой, лауриновой, олеиновой жирных кислот и пальмового масла. Литературные данные по использованию животных жиров как субстрата для синтеза ПГА немногочисленны. В работах сообщается о внутриклеточном содержании ПГА 11-23 % при культивировании штамма *C. necator* DSM545 на свином жире (Favaro et al., 2019); результаты, полученные при использовании рекомбинантного штамма *R. eutropha* Re2058/pCB113 более успешны: при использовании жиробелковой эмульсии свиного происхождения было получено до 1,5 г/л биомассы, содержащей около 60 % ПГА, масштабирование в 6,7-л ферментере обеспечило получение 52 г/л биомассы с содержанием ПГА 58 % (Gutschmann et al., 2023). При использовании других источников жира (жир из домашней птицы, смеси говяжьего, свиного и бараньего жиров) в качестве источника углерода для *R. eutropha* H16 получено до 4,5 г/л бактериальной биомассы и до 56-75 % ПГА (Riedel, 2016).

Результаты сравнительного анализа продукционных показателей культуры *C. necator* В-10646 при росте на трех типах низкосортных жиров животного происхождения представлены в Таблице 8. Для бараньего и говяжьего жира Y_X значимо не отличался и был в диапазоне 0,46-0,48 г биомассы/ г жира. Все остальные показатели ($Y_{ПГА}$, P_X и $P_{ПГА}$) при использовании бараньего жира превышали аналогичные, полученные на свином и говяжьим жирах, но уступали показателям, полученным при использовании растительных масел и рыбных жиров. Самые низкие продукционные показатели были получены при использовании свиного жира.

Таблица 8 – Продукционные показатели *C. necator* В-10646 при росте на низкосортных животных жирах

Животный жир	t, ч	X, г/л	ПГА, г/л	Y_X , г/г	$Y_{ПГА}$, г/г	P_X , г/л·ч	$P_{ПГА}$, г/л·ч
Бараний	48	$2,6 \pm 0,5^{a*}$	$1,2 \pm 0,2^a$	$0,48 \pm 0,05^a$	$0,22 \pm 0,05^a$	$0,054 \pm 0,006^a$	$0,025 \pm 0,003^a$
Говяжий	48	$1,8 \pm 0,4^a$	$0,7 \pm 0,2^b$	$0,46 \pm 0,07^a$	$0,18 \pm 0,03^a$	$0,038 \pm 0,005^b$	$0,015 \pm 0,003^b$
Свиной	48	$1,0 \pm 0,4^b$	$0,2 \pm 0,1^c$	$0,30 \pm 0,03^b$	$0,06 \pm 0,01^b$	$0,021 \pm 0,002^c$	$0,004 \pm 0,001^c$

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

На следующем этапе были проанализированы соотношение и содержание в среде жирных кислот в начале (0 ч) и в конце процесса культивирования (72 ч) при (Рисунок 19). Анализ изменений в жирнокислотном составе бараньего жира в начале и конце процесса культивирования показал, что линоленовая кислота была утилизирована из среды бактериями полностью, содержание олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот снизилось. Доли остальных кислот в составе этого субстрата остались практически неизменным. Потребление жирных кислот в составе говяжьего жира было аналогичным, за исключением наличия в исходном составе пальмитолеиновой кислоты, содержание которой также несколько снизилось к концу культивирования. В составе свиного жира использовались в первую очередь кислоты с 18-ю атомами углерода. Во всех случаях отмечено, что неравномерное потребление отдельных жирных кислот в составе животных жиров привело к увеличению соотношения насыщенных ЖК к ненасыщенным.

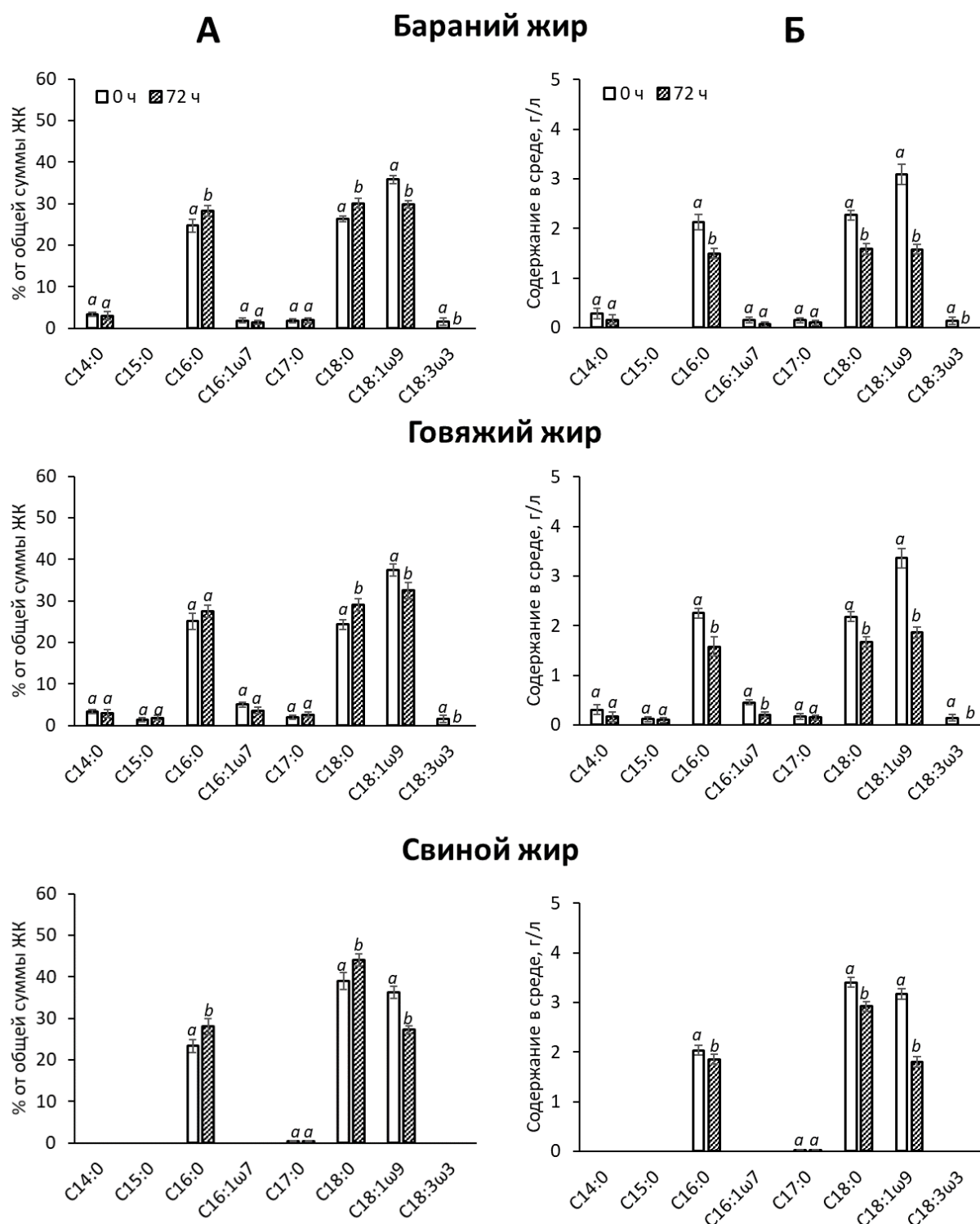


Рисунок 19 – Соотношение жирных кислот в составе животных жиров в начале и конце культивирования (А) и их содержание в среде (Б) (одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$)

Одной из потенциальных серьезных проблем применения ряда жиров животного происхождения является их гидрофобность и высокая температура плавления ($T_{пл}$ 35-55 °C), что затрудняет их потребление микроорганизмами, поскольку температура культивирования

составляет, как правило 30 °С. Другим осложняющим обстоятельством на пути внедрения такого типа субстратов является факт того, что такие сырьевые ресурсы могут быть востребованы как компоненты сельскохозяйственных кормов. Тем не менее, полученные результаты относительно бараньего и говяжьего жиров удовлетворительны и позволяют сделать вывод о перспективности низкосортных животных жиров как углеродного субстрата для биосинтеза ПГА. Вероятно, повысить продукционные показатели культуры возможно при масштабировании процесса в ферментерах большего объема, однако, это предмет отдельных исследований.

4.3 Заключение к главе

Исследована возможность применения жиров животного происхождения, в том числе жировых отходов рыбоперерабатывающей промышленности в качестве источников углерода для роста природного штамма *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА. Проанализирован биохимический и жирнокислотный состав трех рыбных жиров, являющихся отходами рыбопереработки – это жиры из кильки балтийской, скумбрии атлантической и судака обыкновенного, а также исследованы низкосортные животные жиры – бараний, говяжий и свиной. Все исследованные углеродные субстраты поддерживали рост бактерий и накопление ПГА. Для каждого типа источника углерода были определены концентрации субстрата в питательной среде, обеспечивающие наибольшие выходы биомассы и полимера. Установлено, что наиболее эффективным с точки зрения продукционных показателей культуры бактерий является жир, полученный из кильки балтийской. В ходе исследования получен широкий ряд образцов ПГА, это позволяет перейти к исследованию их состава и свойств.

ГЛАВА 5 Химический состав и свойства полигидроксиалканоатов, синтезированных на различных жиросодержащих субстратах

ПГА – это семейство полиэфиров с различной химической структурой, состав и свойства которых варьируют в достаточно широких пределах. Свойства ПГА определяются их строением, в первую очередь строением боковых цепей полимера и расстоянием между сложноэфирными группами в молекуле (Koller et al., 2020; Laycock et al., 2013). Состав синтезированных ПГА также зависит от особенностей организации внутриклеточной ферментной системы продуцентов и субстратной специфичности ПГА-синтазы – фермента, отвечающего за полимеризацию мономеров в цепи полиэфира. Фактором со стороны условий культивирования штамма-продуцента, влияющим на мономерный состав ПГА, является источник углерода. Ранее считалось, что бактерии рода *Cupriavidus* способны синтезировать ПГА, в состав которых входят мономеры только с короткой длиной цепи (3ГБ, 3ГВ, 4ГБ), но позже было установлено, что некоторые представители этого рода способны синтезировать ПГА, содержащие мономеры со средней длиной цепи (3ГГ и 3ГО) при культивировании на среде с соответствующими прекурсорами (Green et al., 2002). Способность синтезировать широкий спектр ПГА, включая мономеры с короткой и средней длиной цепи, делает такие штаммы особенно перспективными продуцентами этих биополимеров.

Данная глава посвящена исследованию состава и физико-химических свойств серии образцов, полученных в культуре бактерий *C. necator* В-10646 при использовании в качестве источника углеродного питания различных жиросодержащих субстратов: жирных кислот, растительных масел, низкосортных животных жиров и жиров, полученных из отходов перерабатывающей промышленности.

5.1 Характеристика мономерного состава полигидроксиалканоатов, синтезированных на различных жиросодержащих углеродных субстратах

Культивирование штамма *C. necator* В-10646 на различных жиросодержащих углеродных субстратах привело к различиям не только в продукционных показателях и эффективности использования субстрата (Глава 3 и 4), но также в мономерном составе синтезируемых полимеров (Таблица 9).

Таблица 9 – Мономерный состав образцов ПГА, синтезированных *C. necator* В-10646 на различных жиросодержащих источниках углерода

Источник углерода	Состав ПГА, мол.%		
	ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ
Лауриновая кислота C12:0	100,0	–	–
Миристиновая кислота C14:0	100,0	–	–
Пальмитиновая кислота C16:0	100,0	–	–
Стеариновая кислота C18:0	100,0	–	–
Олеиновая кислота C18:1	98,7±0,2	1,3±0,4	–
Пальмовое масло	97,2±0,2	1,9±0,3	0,9±0,4
Рыжиковое масло	97,8±0,2	1,7±0,2	0,5±0,2
Подсолнечное масло раф.	97,5±0,3	1,5±0,4	1,0±0,4
Подсолнечное масло нераф.	98,0±0,3	1,1±0,2	0,9±0,3
Бараний жир	96,1±0,2	3,3±0,2	0,6±0,1
Говяжий жир	96,6±0,4	3,0±0,1	0,4±0,2
Свиной жир	96,7±0,2	2,5±0,4	0,9±0,1
Жир из кильки балтийской	97,8±0,1	1,7±0,2	0,5±0,1
Жир из скумбрии атлантической	97,4±0,3	2,2±0,5	0,4±0,2
Жир из судака обыкновенного	98,0±0,1	1,5±0,5	0,5±0,1

Исследование мономерного состава синтезированных образцов ПГА показало, что при использовании насыщенных жирных кислот – лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой, как и в случае использования сахаров (Zhila et al., 2015), штамм *C. necator* В-10646 синтезировал гомополимер П(ЗГБ). В качестве примера на Рисунке 20А приведена ионная хроматограмма образца ПГА и масс-спектр ЗГБ, синтезированного при использовании миристиновой кислоты.

Полимер, синтезированный при использовании олеиновой кислоты в качестве единственного источника углерода, представлял собой двухкомпонентный сополимер поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат) с содержанием 3-гидроксивалерата 1,3±0,4 мол.% (Рисунок 20Б). Культивирование исследуемого штамма на растительных маслах, низкосортных животных жирах и жирах, полученных из отходов рыбопереработки, привело к синтезу трехкомпонентных сополимеров. Основным мономером в составе полученных образцов ПГА был по-прежнему 3-гидроксibuтират, помимо которого были обнаружены минорные включения мономеров 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата. Терполимеры П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-ЗГГ), состоящие из ЗГБ (97,2-97,8 мол.%) и минорных включений ЗГВ (1,5-1,9 мол.%) и ЗГГ (0,5-1,0

мол.%), были синтезированы при использовании растительных масел различного происхождения (Рисунок 21 на примере пальмового масла).

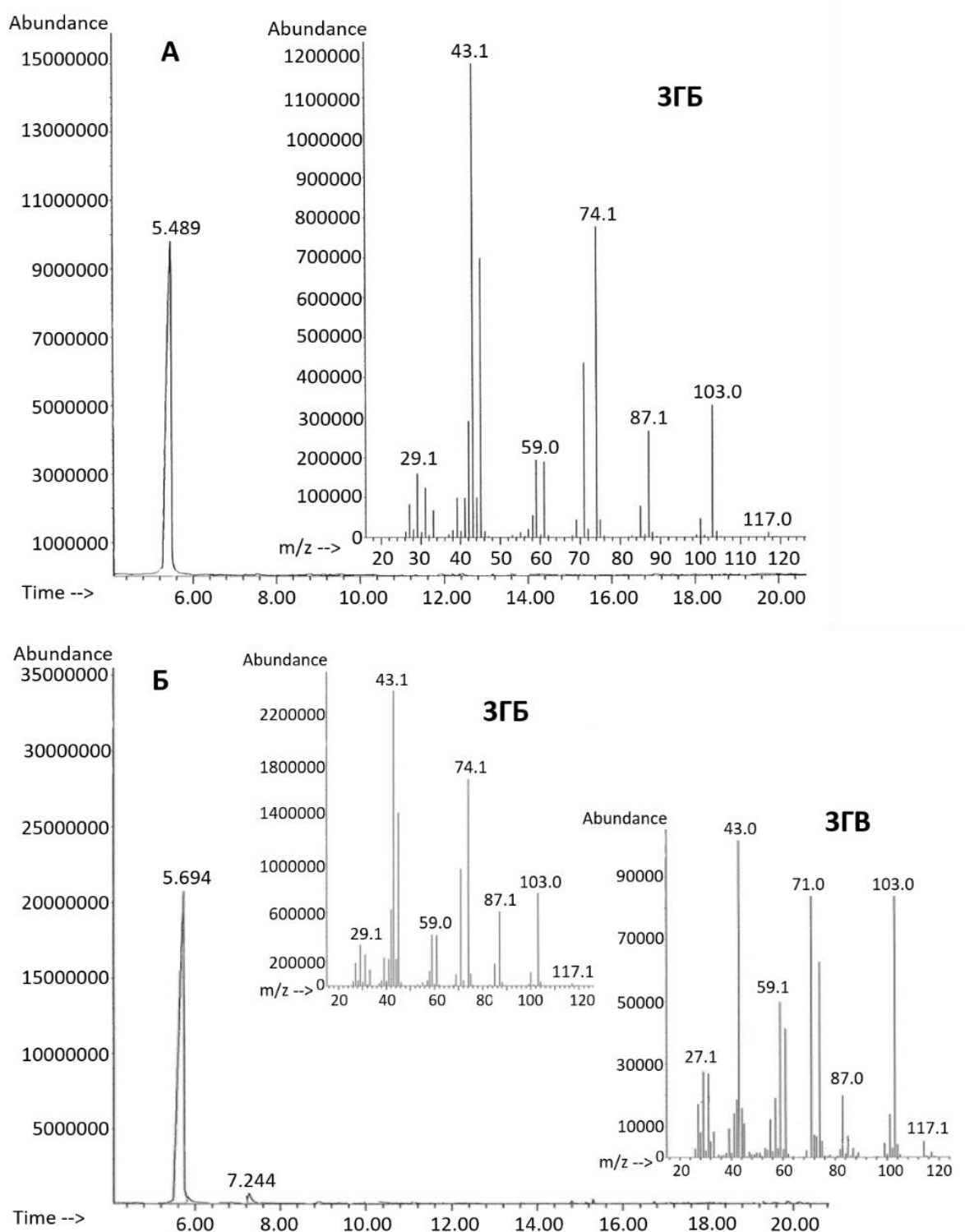


Рисунок 20 – Ионные хроматограммы образцов ПГА, синтезированных *C. necator* B-10646 на миристиновой (А) и олеиновой (Б) жирных кислотах, и масс-спектры метиловых эфиров 3-гидоксибутирата (5,489-5,694 мин) и 3-гидроксивалерата (7,244 мин)

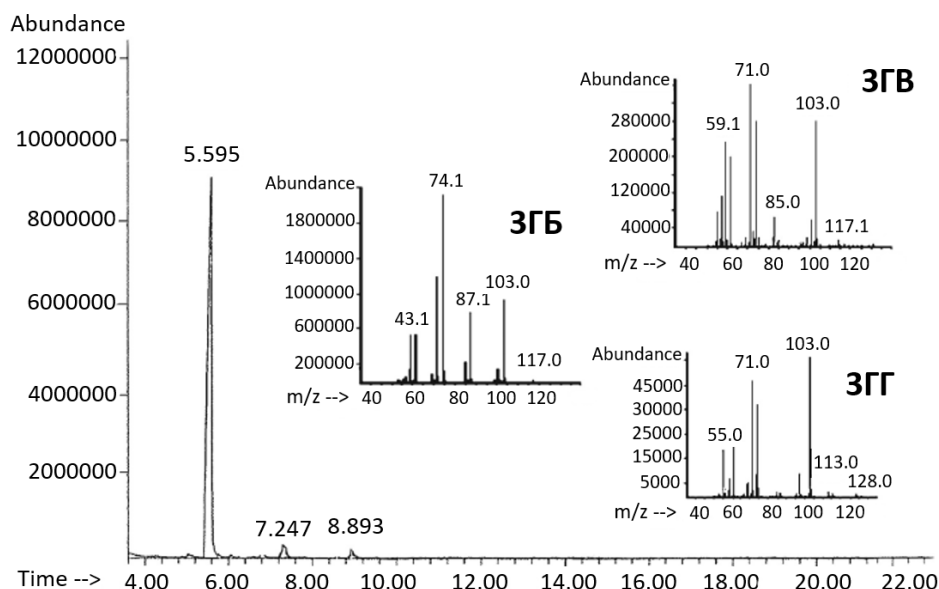


Рисунок 21 – Ионная хроматограмма образца ПГА, синтезированного *C. necator* В-10646 при использовании пальмового масла, и масс-спектры метиловых эфиров 3-гидроксibuтирата (5,595 мин), 3-гидроксивалерата (7,247 мин) и 3-гидроксигексаноата (8,893 мин)

Аналогично растительным маслам, использование низкосортных животных жиров, позволило получить сополимеры П(3ГБ-*co*-3ГВ-*co*-3ГГ) (Рисунок 22), где доминирующим мономером был также 3ГБ (96,1-96,7 мол.%), содержание мономеров 3ГВ составляло 2,5-3,3 мол.%, а среднецепочечных мономеров 3ГГ – 0,4-0,6 мол.%.

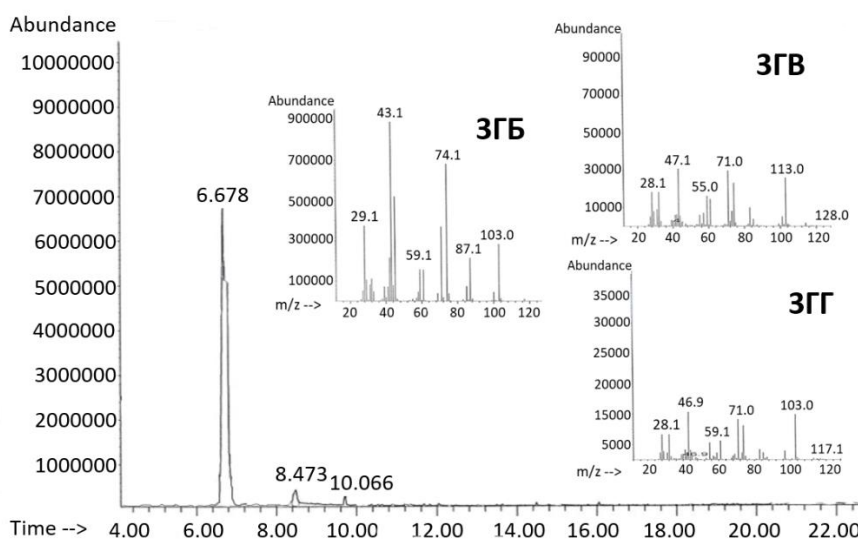


Рисунок 22 – Ионная хроматограмма образца ПГА, синтезированного *C. necator* В-10646 при использовании бараньего жира и масс-спектры метиловых эфиров 3-гидроксibuтирата (6,678 мин), 3-гидроксивалерата (8,473 мин) и 3-гидроксигексаноата (10,066 мин)

При использовании жиросодержащих отходов рыбопереработки также были синтезированы трехкомпонентные сополимеры – П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-ЗГГ), с содержанием мономеров ЗГБ 97,4-98,0 мол.%, ЗГВ 1,5-2,2 мол.% и ЗГГ 0,4-0,5 мол.%, что сопоставимо с результатами, полученными при использовании олеиновой кислоты и растительных масел (Рисунок 23).

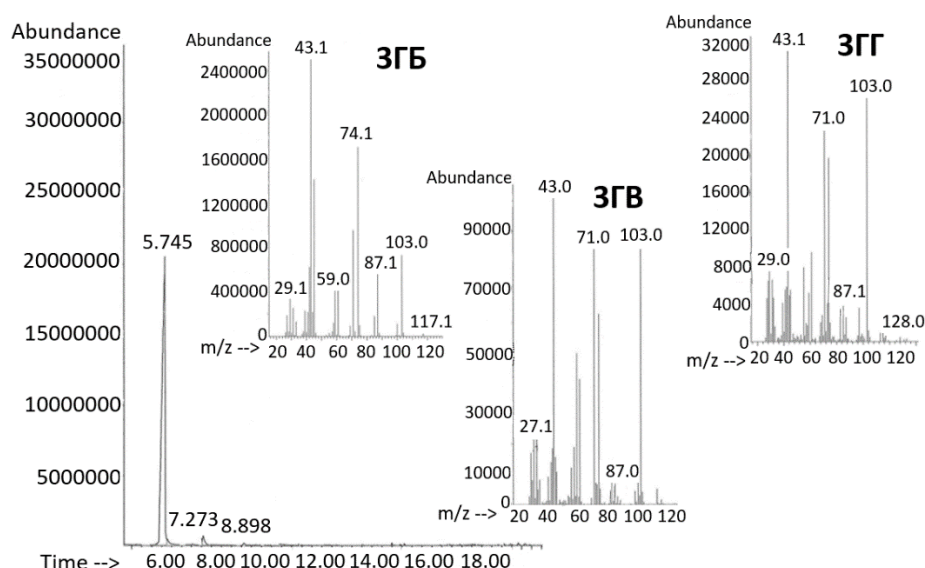


Рисунок 23 – Ионная хроматограмма образца ПГА, синтезированного *C. necator* В-10646 при использовании жира кильки балтийской и масс-спектры метиловых эфиров 3-гидроксibuтирата (5,745 мин), 3-гидроксивалерата (7,273 мин) и 3-гидроксигексаноата (8,898 мин)

Полученные результаты в целом согласуются с имеющимися в литературе. В случае использования насыщенных жирных кислот в качестве углеродного субстрата для штаммов *Alcaligenes* sp. АК 201, *C. necator* DSM 545 и *Burkholderia* sp. также был показан синтез гомополимера П(ЗГБ) (Akiyama et al., 1992; Chee et al., 2010; Povolo et al., 2015). В отношении мононенасыщенной олеиновой кислоты данные неоднозначны: ряд авторов сообщали о синтезе сополимера П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) с содержанием мономеров ЗГВ 2-70 мол.% штаммами *A. eutrophus* H16 и *D. acidovorans* DSM39 (Eggink et al., 1992 Romanelli et al., 2014), хотя имеются данные по синтезу гомополимерных образцов П(ЗГБ) у штаммов *C. necator* DSM 545 и *Burkholderia* sp. (Chee et al., 2010; Schneider et al., 2010).

Способность природных штаммов при использовании сложных и многокомпонентных углеродных субстратов, таких как растительные масла и животные жиры, к включениям в основную полимерную цепь ПГА короткоцепочечных мономеров ЗГВ и среднецепочечных ЗГГ, также описана в литературе. Показано, что природные штаммы *C. necator* и *B. cepacia*

синтезируют сополимеры при росте на пальмовом масле (Rodrigues et al., 2018). Потенциал использования отходов пищевой промышленности в последнее время активно исследуется, в том числе и для получения сополимерных ПГА (Brigham et al., 2018). Однако, среди опубликованных данных, информация о получении сополимерных ПГА при использовании отходов рыбопереработки ограничена. Показан синтез двухкомпонентного сополимера П(3ГБ-*co*-3ГВ) штаммом *C. necator* TISTR 1095 с содержанием мономеров 3ГВ 20 мол.% (Sangkharak et al., 2021); о синтезе трёхкомпонентных сополимеров П(3ГБ-*co*-3ГВ-*co*-3ГГ) ранее не сообщалось.

Поскольку наличие в составе ПГА мономеров, отличных от 3-гидроксibuтирата способствует улучшению физико-механических свойств полимеров (Koller et al., 2017; Lee et al., 2008), увеличение доли включений таких мономеров является важной задачей, решение которой позволит расширить сферу применения ПГА. Добиться этого позволяет внесение в питательную среду субстратов предшественников (прекурсоров), обеспечивающих включение целевых мономеров и определяющих свойства конечного продукта и возможные области его применения.

5.2 Синтез сополимерных полигидроксиалканоатов на жиросодержащих источниках углерода в присутствии прекурсоров

ПГА значительно различаются по своим физическим и химическим характеристикам: гидрофобность, температура плавления, деградации, степень кристалличности в значительной степени определяются составом мономеров (Chen, 2010). Известно более 150 различных мономеров, входящих в состав ПГА, что позволяет варьировать их физико-химические и механические свойства и получать изделия для различных сфер применения. Из всего многообразия отдельный интерес вызывают сополимеры, содержащие мономеры 3-гидроксивалерата (3ГВ), 4-гидроксивалерата (4ГВ), 4-гидроксibuтирата (4ГБ), а также тиополиэфиры, которые содержат мономеры 3-меркаптопропионата (3МП). Регулируя соотношение мономеров в составе ПГА, можно адаптировать их свойства для производства изделий широкого спектра: от гибких пленок до жестких формованных изделий, применимых во многих аспектах жизнедеятельности человека. Большинство природных штаммов-продуцентов, способных синтезировать ПГА с высокими выходами, в частности бактерии р. *Cupriavidus*, чаще всего синтезируют гомополимер П(3ГБ), а для синтеза сополимерных ПГА в питательную среду необходимо вносить прекурсоры соответствующих мономеров. Такие соединения, как правило, токсичны в больших концентрациях и ограничивают как рост продуцента, так и накопление ПГА, поэтому обычно вносятся в питательную среду лишь в качестве дополнительного источника

углерода. Коммерциализация таких полимеров осложняется дополнительными затратами на прекурсоры, что актуализирует поиск дешевых сырьевых ресурсов, выступающих в качестве основного источника углеродного питания. В данном разделе будет рассмотрена потенциальная возможность синтеза сополимеров нескольких типов, содержащих макровключения мономеров 3ГВ, 4ГВ, 4ГБ и 3МП, штаммом бактерий *C. necator* В-10646 при росте на жиросодержащих углеродных субстратах как на основном источнике углерода.

5.2.1 Биосинтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 3-гидроксивалерата, на жиросодержащих источниках углерода

Данный раздел работы посвящен изучению возможности синтеза сополимерных ПГА, содержащих мономеры 3-гидроксивалерата, штаммом бактерий *C. necator* В-10646 при росте на жиросодержащих субстратах, потенциал которых для синтеза ПГА был описан в предыдущих главах. Для исследования были отобраны углеродные субстраты, обеспечившие наиболее высокие показатели продуктивности культуры как по урожаю биомассы бактерий, так и по выходу ПГА: из группы жирных кислот – олеиновая кислота, из группы растительных масел – пальмовое масло, из группы животных жиров – жир из кильки балтийской (отход рыбопереработки) (Volova et al., 2025b). В качестве сравнения культивирование проводили с использованием фруктозы как основного источника углерода. Валерат калия (прекурсор мономеров 3ГВ) вносили в концентрации 1,0 г/л на 0 и 24 ч роста культуры.

Результаты роста бактерий и синтеза ПГА показаны на Рисунке 24. Выходы биомассы бактерий *C. necator* В-10646 при внесении в питательную среду валерата калия, несколько уступали результатам, полученным при использовании аналогичных субстратов в качестве единственных источников углерода. Тем не менее, наиболее высокие значения к 48 ч роста культуры были получены при использовании в качестве основного углеродного субстрата олеиновой кислоты – $6,0 \pm 0,3$ г/л биомассы, что сопоставимо с результатами, полученными при использовании фруктозы ($6,2 \pm 0,5$ г/л) в контрольном эксперименте. При росте культуры бактерий на более сложных и комплексных источниках углерода (пальмовое масло и жир из балтийской кильки) выходы биомассы были значительно ниже, 3,1-3,8 г/л.

Внутриклеточное содержание ПГА также несколько отличалось в зависимости от используемого субстрата и было ниже значений, полученных при культивировании продуцента на моносубстратах, на 10-15 %. Наибольшее внутриклеточное содержание ПГА в конце культивирования (48 ч) достигнуто при использовании олеиновой кислоты (58 ± 3 %), что

сопоставимо с результатами, полученными при росте на фруктозе (62 ± 3 %). Несколько ниже значения получены для пальмового масла – 48 ± 4 %. Наименьшее содержание ПГА в клетках бактерий было получено в случае использования жира из балтийской кильки (42 ± 3 %).

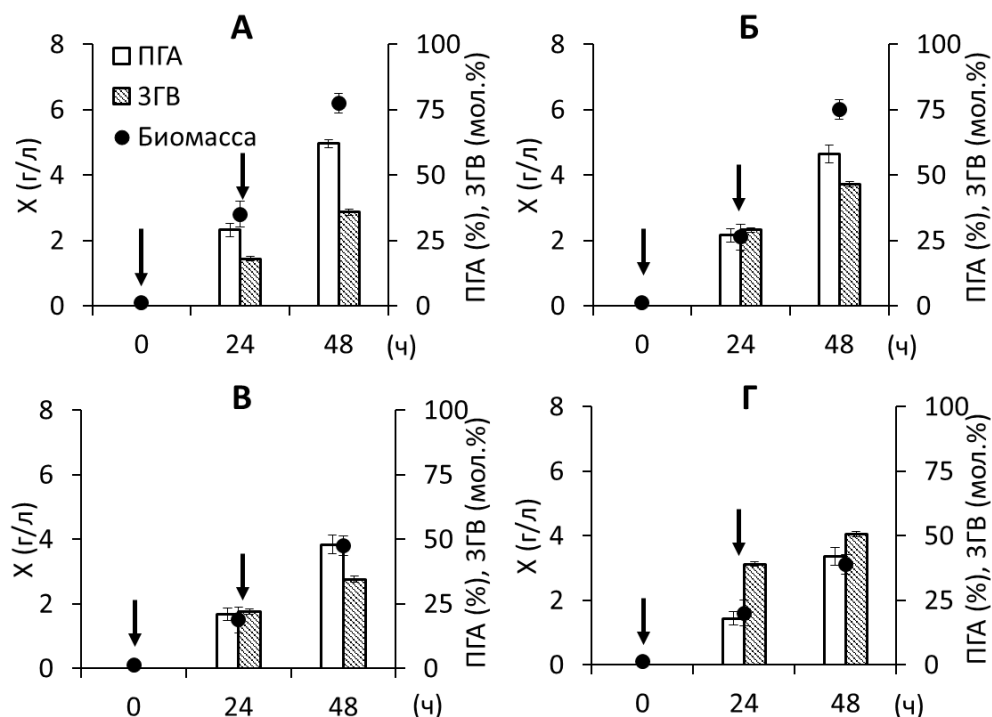


Рисунок 24 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646, содержание ПГА и включение мономеров 3ГВ при росте на фруктозе (А), олеиновой кислоте (Б), пальмовом масле (В) и жире из кильки балтийской (Г) с добавлением валерата калия на 0 и 24 ч в концентрации 1,0 г/л, время добавок прекурсора отмечено стрелками

Исследование мономерного состава полученных образцов ПГА подтвердило включение в состав полимера мономеров 3-гидроксивалерата (Рисунок 25), содержание которых варьировало в зависимости от основного источника углерода. Использование жиросодержащих углеродных субстратов – олеиновой кислоты и жира из кильки балтийской, позволило повысить долю мономеров 3ГВ в составе ПГА до 46,5-50,6 мол.% по сравнению с культивированием на фруктозе, где включение 3ГВ достигало $35,9 \pm 1,2$ мол.%. Использование пальмового масла в качестве основного источника углерода привело к включениям 3ГВ, не превышающим результаты, полученные в контрольном эксперименте с фруктозой.

Анализ продукционных показателей культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на различных углеродных субстратах (Таблица 10) показал, что наибольшая среди исследованных источников углерода и сопоставимая с процессом на фруктозе продуктивность по биомассе, полимеру и выходу мономеров 3ГВ, соответственно $P_X = 0,125 \pm 0,007$, $P_{\text{ПГА}} = 0,073 \pm 0,003$, $P_{3\text{ГВ}} =$

0,033±0,003 г/л·ч, получена на олеиновой кислоте. Результаты, полученные при использовании пальмового масла и жира из кильки балтийской, уступали: продуктивность по биомассе, полимеру и 3ГВ была ниже практически в 1,5-2 раза. Подобный эффект, по всей видимости, обусловлен сложностью и многокомпонентностью растительных масел и животных жиров, по сравнению с индивидуальными субстратами.

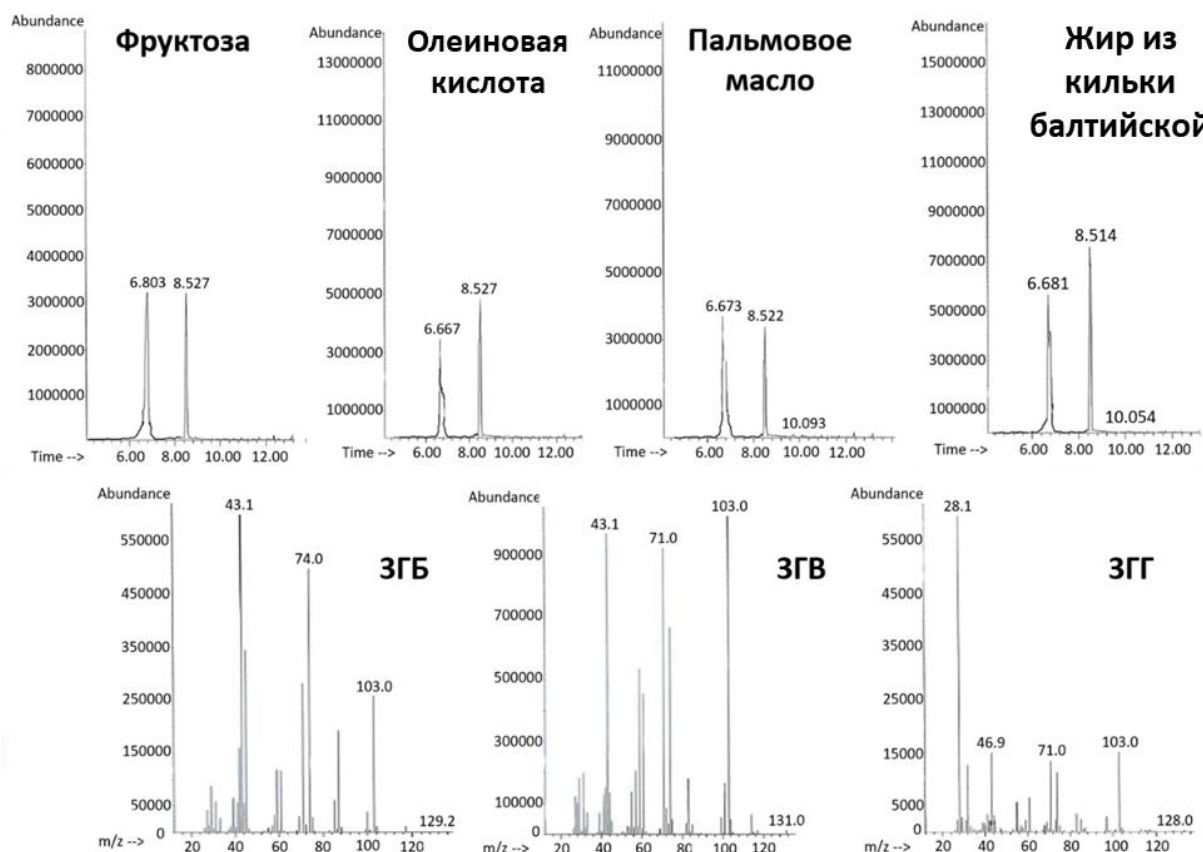


Рисунок 25 – Ионные хроматограммы образцов ПГА, синтезированных *C. necator* В-10646 при росте на жиросодержащих углеродных субстратах с добавлением валерата калия, и масс-спектры метиловых эфиров 3-гидроксибутирата (6,667-6,681 мин), 3-гидроксивалерата (8,514-8,527 мин) и 3-гидроксигексаноата (10,054-10,093 мин)

Полученные в настоящей работе данные в целом сопоставимы с опубликованными в литературе, а некоторых случаях превышают их. В работе (Huong et al., 2017) сообщается о синтезе ПГА, содержащих мономеры 3ГВ, штаммом *Cupriavidus* sp. USMAA1020 при использовании жирных кислот и валерьяновой кислоты. При использовании миристиновой кислоты выходы биомассы и ПГА составили 3,9 г/л и 30 % ПГА соответственно, при невысоком включении 3ГВ 4 мол.%; замена основного источника углерода на олеиновую кислоту способствовала повышению

показателей по биомассе бактерий (10,5 г/л) и содержанию ПГА (50 %), однако включение ЗГВ при этом снижалось (0,5 мол.%).

Таблица 10 – Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на различных жиросодержащих углеродных субстратах и фруктозе с добавлением валерата калия на 0 и 24 ч в концентрации 1,0 г/л

Источник углерода	X, г/л	ПГА, г/л	ЗГВ, мол.%	P _X , г/л·ч	P _{ПГА} , г/л·ч	P _{ЗГВ} , г/л·ч
Фруктоза	6,2±0,5 ^{a*}	3,8±0,3 ^a	35,9±1,2 ^a	0,129±0,010 ^a	0,079±0,004 ^a	0,029±0,005 ^a
Олеиновая кислота	6,0±0,3 ^a	3,5±0,2 ^a	46,5±1,1 ^b	0,125±0,007 ^a	0,073±0,003 ^a	0,033±0,003 ^a
Пальмовое масло	3,8±0,4 ^b	1,8±0,4 ^b	34,5±0,8 ^a	0,079±0,005 ^b	0,038±0,005 ^b	0,013±0,002 ^b
Жир из кильки балтийской	3,1±0,3 ^b	1,3±0,2 ^b	50,6±1,6 ^c	0,065±0,009 ^b	0,027±0,002 ^b	0,015±0,001 ^b

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Культивирование штамма *C. necator* H16 на различных растительных маслах с добавлением валерата натрия позволяет получить 3,3-6,1 г/л биомассы при внутриклеточном содержании ПГА 64-89% и включениями ЗГВ 3-14 мол.%; в частности, пальмовое масло как основной источник углерода обеспечило 3,3 г/л биомассы, содержащей 64 % ПГА при доле мономеров ЗГВ 10 мол.% (Lee et al., 2008). Сообщается, что галофильная бактерия *Salinivibrio* sp. M318 при использовании жиросодержащих отходов рыбы Баса и валерата натрия способна накапливать до 11,6 г/л биомассы с содержанием 52,4 % ПГА при включении мономеров ЗГВ 24,7 мол.% (Thuoc et al., 2019).

Таким образом, жировые углеродные субстраты, в частности олеиновая кислота, пальмовое масло и жир из кильки балтийской – это перспективный источник углерода для синтеза сополимеров, содержащих макровключения мономеров 3-гидроксивалерата.

5.2.2 Синтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 3-и 4-гидроксивалерата, на жиросодержащих источниках углерода

Другим типом сополимеров являются более сложные по составу, содержащие помимо 3-гидроксивалерата мономеры 4-гидроксивалерата. Они относятся к необычным и малоизученным

типам ПГА. Полимеры, имеющие в составе мономеры 3- и 4-гидроксивалерата характеризуются улучшенными механическими свойствами, это способствует облегчению их переработки в изделия – они обладают пониженной температурой плавления и степенью кристалличности, более гибки (Lee et al., 2008). Поэтому увеличение содержания мономеров 3- и 4-гидроксивалерата в составе полимеров является важной задачей, решение которой позволит расширить область применения ПГА.

Культуру бактерий выращивали в условиях, аналогичных ранее проведенным экспериментам. В качестве прекурсора мономеров 3- и 4-гидроксивалерата использовали γ -валеролактон, который ранее подробно исследован для синтеза П(3ГБ-*co*-3ГВ-*co*-4ГВ) штаммом *C. necator* В-10646 при росте на фруктозе (Zhila et al., 2022). γ -валеролактон, аналогично валерата калия, в питательную среду вносили дробно во избежание ингибирования роста бактерий: две добавки прекурсора по 1,0 г/л каждая на 0 и 24 ч роста бактерий соответственно (суммарно подано 2,0 г/л γ -валеролактона). Результаты роста бактерий и синтеза ПГА показаны на Рисунке 26. Присутствие в питательной среде γ -валеролактона привело к снижению урожая биомассы *C. necator* В-10646 по сравнению с внесением валерата калия. Во всех случаях выходы биомассы были ниже практически вдвое и составили 3,8, 3,0, 2,0 и 1,2 г/л для фруктозы, олеиновой кислоты, пальмового масла и жира из кильки балтийской соответственно, что свидетельствует о более сильном ингибирующем рост эффекте данного прекурсора.

Внутриклеточное содержание ПГА, напротив, оставалось на том же уровне, что и при использовании валерата калия в качестве прекурсора. Наибольшее внутриклеточное содержание ПГА в конце культивирования (48 ч) отмечено при использовании олеиновой кислоты (55 ± 4 %), что сопоставимо с результатами, полученными при росте на фруктозе (61 ± 3 %). В случае применения в качестве основного источника углерода более сложных и комплексных субстратов (пальмового масла и жира из кильки балтийской) содержание ПГА не отличалось значимо и было на уровне 41 %.

При анализе мономерного состава полученных образцов ПГА выявлено, что включения мономеров 4-гидроксивалерата были обнаружены только в образцах ПГА, синтезированных штаммом *C. necator* В-10646 при росте на фруктозе, а в образцах ПГА, полученных при использовании жиросодержащих источников углерода, включений этого мономера обнаружено не было. По всей видимости, использование жиросодержащих углеродных субстратов – олеиновой кислоты, пальмового масла и жира из кильки балтийской, невозможно в целях получения сополимеров, содержащих одновременно мономеры 3- и 4-гидроксивалерата.

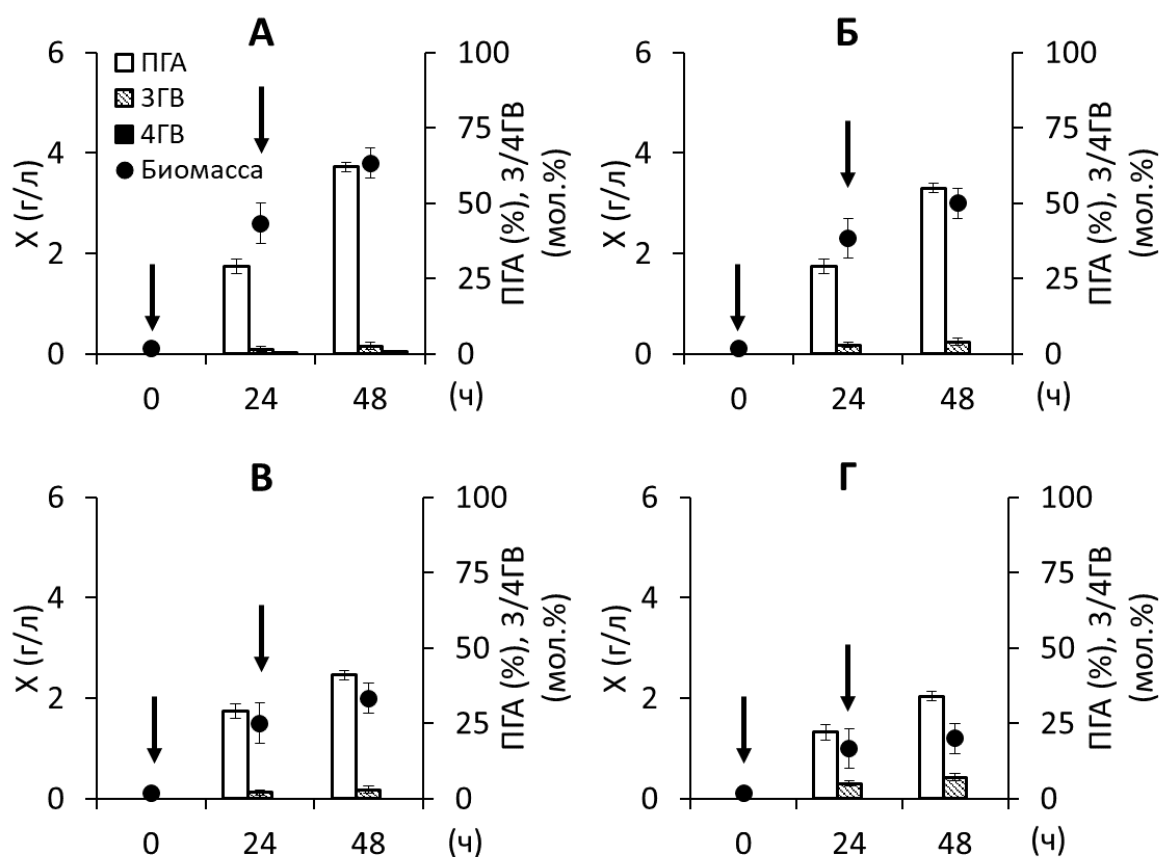


Рисунок 26 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646, содержание ПГА и включение мономеров 3ГВ и 4ГВ при росте на фруктозе (А), олеиновой кислоте (Б), пальмовом масле (В) и жире из кильки балтийской (Г) с добавлением γ -валеролактона на 0 и 24 ч в концентрации 1,0 г/л, время добавок прекурсора отмечено стрелками

Анализ литературных источников показал, что основной массив данных по синтезу сополимеров, содержащих мономеры 3ГВ и 4ГВ, получен при использовании в качестве основного источника углерода сахаров, глицерина и левоулиновой кислоты (Tanadchangsang et al., 2013; Wang et al., 2013); информация о синтезе такого типа сополимеров при использовании жиросодержащих источников углерода не обнаружена. Исключение составляет работа (Muzaianah et al., 2013), где сообщается о синтезе ПГА, содержащих мономеры 3ГВ и 4ГВ, штаммом *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 при использовании олеиновой кислоты и γ -валеролактона. Показано, что автором удалось достичь включений 3ГВ от 9 до 55 мол.% 3ГВ и лишь 1-2 мол.% 4ГВ, хотя о выходах биомассы продуцента и внутриклеточном содержании ПГА не сообщается. Таким образом, использование группы жиросодержащих источников углерода для синтеза сополимеров, содержащих мономеры 3- и 4-гидроксивалерата при использовании γ -валеролактона в качестве прекурсора нецелесообразно.

5.2.3 Синтез полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-гидроксибутирата, на жиросодержащих источниках углерода

Жиросодержащие субстраты также были рассмотрены в качестве основного источника углерода для синтеза сополимеров, содержащих мономеры 4-гидроксибутирата, штаммом бактерий *C. necator* В-10646. Для синтеза мономеров 4-гидроксибутирата в среду вносили ϵ -капролактон, эффективность которого как прекурсора была показана ранее (Volova et al., 2025a; Zhila et al., 2023b). Для снижения токсического для клеток эффекта прекурсор вносили порционно: по 1,0 г/л на 0 и 24 ч роста бактерий соответственно – суммарно 2,0 г/л ϵ -капролактона. Накопление биомассы и полимера в указанных условиях культивирования иллюстрирует Рисунок 27.

Наибольший урожай биомассы, сопоставимый с данными по культивированию бактерий на фруктозе ($5,8 \pm 0,5$ г/л), был получен при использовании олеиновой кислоты в качестве основного источника углерода – $5,5 \pm 0,3$ г/л биомассы. Использование пальмового масла и жира из кильки балтийской, как и в случае культивирования исследуемого штамма в присутствии валерата калия и γ -валеролактона, привело к значимо меньшим выходам биомассы бактерий – в пределах 2,7-3,1 г/л. Внутриклеточное содержание ПГА варьировало в меньшей зависимости от основного источника углерода – к 48 ч роста бактерий внутриклеточное накопление ПГА достоверно не отличалось. При росте бактерий на олеиновой кислоте и жире из кильки балтийской результаты были наиболее близки к контрольному варианту на фруктозе (58 ± 3 %) и достигали 55-56 % ПГА внутриклеточно. При культивировании штамма на пальмовом масле содержание ПГА составило 50 %.

Во всех полученных образцах ПГА были обнаружены включения мономеров 4-гидроксибутирата, что подтверждено данными газовой хроматографии и масс-спектрометрии (Рисунок 28). При внесении в питательную среду ϵ -капролактона и использовании в качестве основного источника углерода фруктозы штамм бактерий *C. necator* В-10646 синтезировал двухкомпонентный сополимер П(ЗГБ-*co*-4ГБ), а при культивировании на пальмовом масле – 3-х компонентный П(ЗГБ-*co*-4ГБ-*co*-3ГГ) с близким содержанием 4ГБ $5,1 \pm 0,6$ и $4,6 \pm 0,3$ мол.% соответственно; кроме этого, в случае использования пальмового масла, мономеры 3-гидроксивалерата, характерные для процесса культивирования на этом субстрате как на единственном источнике углерода или с добавлением валерата калия, идентифицированы не были. При использовании олеиновой кислоты в качестве основного углеродного субстрата, бактерии синтезировали трехкомпонентный полимер поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-4-гидроксибутират) – П(ЗГБ-*co*-3ГВ-*co*-4ГБ), содержащий $1,7 \pm 0,2$ мол.%

мономеров 3ГВ и $2,5 \pm 0,2$ мол.% мономеров 4ГБ. Культивирование бактерий на жире, полученном из кильки балтийской, привело к синтезу четырехкомпонентного сополимера поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-4-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксигексаноат) (П(3ГВ-*co*-3ГВ-*co*-4ГБ-*co*-3ГГ)), содержащего $1,9 \pm 0,3$, $7,4 \pm 0,4$ и $0,2 \pm 0,1$ мол.% мономеров 3ГВ, 4ГБ и 3ГГ соответственно, причем включение мономеров 4ГБ было самым высоким среди всех исследованных субстратов.

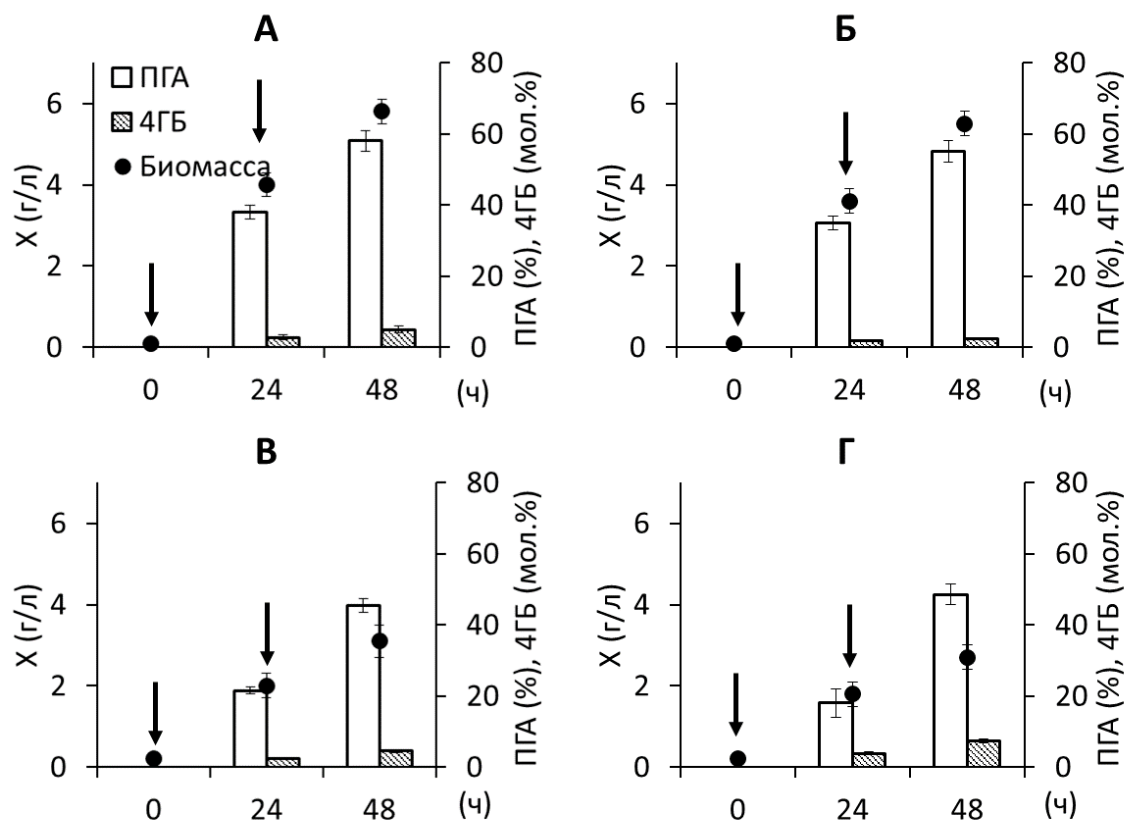


Рисунок 27 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* В-10646, содержание ПГА и включение мономеров 4ГБ при росте на фруктозе (А), олеиновой кислоте (Б), пальмовом масле (В) и жире из кильки балтийской (Г) с добавлением ϵ -капролактона на 0 и 24 ч в концентрации 1,0 г/л, время добавок прекурсора отмечено стрелками

Продуктивность культивирования штамма *C. necator* В-10646 при росте в среде, содержащей ϵ -капролактон, отличалась в зависимости от основного источника углерода (Таблица 11). Продуктивность по биомассе (R_x), полученная при росте бактерий на олеиновой кислоте, была сопоставима с процессом на фруктозе и составила $0,115$ г/л·ч; при использовании пальмового масла и жира из кильки балтийской этот показатель был практически вдвое ниже, на уровне $0,056$ - $0,065$ г/л·ч. При оценке продуктивности по ПГА, показано, что при использовании олеиновой кислоты $R_{\text{ПГА}}$ не уступала данным, полученным в контроле ($0,063 \pm 0,005$ и $0,071 \pm 0,006$ г/л·ч соответственно), при росте на более сложных по составу субстратов эта величина была ниже

в 1,3 и более раз и не превышала $0,031 \pm 0,012$ г/л·ч. Не смотря на различия по R_X и $R_{ПГА}$, значимых отличий в продуктивности процесса по выходу 4ГБ ($R_{4ГБ}$) обнаружено не было – этот показатель составил 0,001-0,003 г/л·ч.

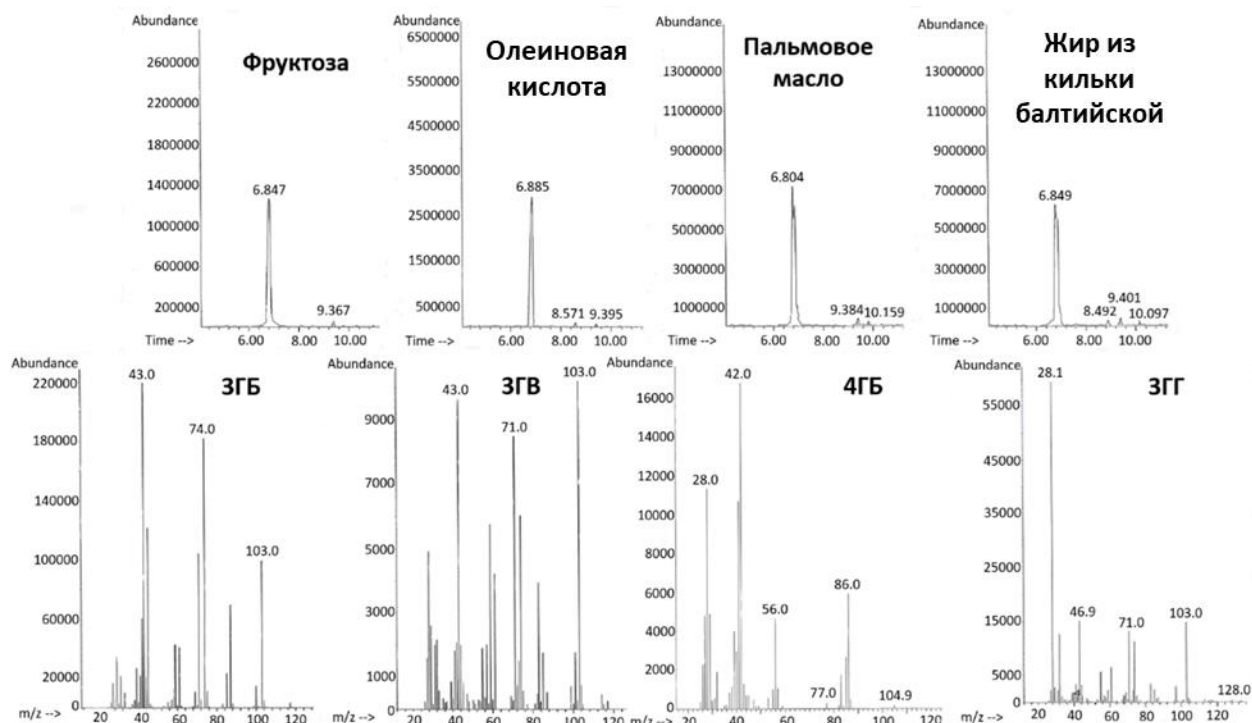


Рисунок 28 – Ионные хроматограммы образцов ПГА, синтезированных *C. necator* В-10646 при росте на жиросодержащих углеродных субстратах с добавлением ϵ -капролактона, и масс-спектры метиловых эфиров 3-гидроксibuтирата (6,804-6,885 мин), 3-гидроксивалерата (8,492-8,571 мин), 4-гидроксibuтирата (9,367-9,401 мин) и 3-гидроксигексаноата (10,097-10,159 мин)

Таблица 11 – Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на различных жиросодержащих углеродных субстратах с добавлением ϵ -капролактона на 0 и 24 ч в концентрации 1,0 г/л

Источник углерода	X, г/л	ПГА, г/л	4ГБ, мол. %	R_X , г/л·ч	$R_{ПГА}$, г/л·ч	$R_{4ГБ}$, г/л·ч
Фруктоза	$5,8 \pm 0,5^a$	$3,4 \pm 0,5^a$	$5,1 \pm 0,6^a$	$0,121 \pm 0,008^a$	$0,071 \pm 0,006^a$	$0,003 \pm 0,0015^a$
Олеиновая кислота	$5,5 \pm 0,3^a$	$3,0 \pm 0,3^a$	$2,5 \pm 0,2^b$	$0,115 \pm 0,004^a$	$0,063 \pm 0,005^a$	$0,002 \pm 0,0010^a$
Пальмовое масло	$3,1 \pm 0,4^b$	$1,6 \pm 0,2^b$	$4,6 \pm 0,3^a$	$0,065 \pm 0,006^b$	$0,033 \pm 0,006^b$	$0,001 \pm 0,0005^a$
Жир из кильки балтийской	$2,7 \pm 0,3^b$	$1,5 \pm 0,2^b$	$7,4 \pm 0,4^c$	$0,056 \pm 0,003^b$	$0,031 \pm 0,012^b$	$0,002 \pm 0,0010^a$

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Согласно литературным данным, урожай биомассы и полимера, а также включение мономеров 4ГБ варьирует в зависимости от используемого штамма и комбинации основной источник углерода/прекурсор. В работе (Rahayu et al., 2008) показано, что культивирование *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 на олеиновой кислоте с добавлением γ -бутиролактона или 1,4-бутандиола обеспечивает урожай биомассы и содержание ПГА, соответственно, 4,7-5,8 г/л и 39-44 %, при включении мономеров 4ГБ 8-27 мол.%, а комбинация олеиновой кислоты и γ -бутиролактона – 4,6 г/л биомассы, содержащей 30 % П(3ГБ-*co*-4ГБ), при включении 4ГБ 12 мол.%. Культивирование этого штамма на пальмовом масле и γ -бутиролактоне обеспечило 4,6 г/л биомассы продуцента, 39 % ПГА при включении 4ГБ 12 мол.%. Другой штамм *Cupriavidus* sp. USMANM13 при использовании олеиновой кислоты и γ -бутиролактона или 1,4-бутандиола накапливал внутриклеточно 43-71 % ПГА с содержанием 4ГБ 11-21 мол.%, а при замене олеиновой кислоты на лауриновую – 31-61 % ПГА с включениями 4ГБ 4-5 мол.% (Ramachandran et al., 2013). Соевое масло в комбинации с γ -бутиролактоном обеспечивало синтез штаммом *Ralstonia eutropha* КСТС 2662 сополимера П(3ГБ-*co*-4ГБ) до 95 % к АСБ с содержанием мономеров 4ГБ 6,3-10 мол.% в ферментере (Park et al., 2011). При использовании в качестве основного источника углерода отходов обработки пангасиуса и ряда прекурсоров для синтеза сополимеров, содержащих 4ГБ, галофильной бактерией *Salinivibrio* sp. M318 выходы биомассы бактерий и содержание полимера составляли 9,8-10,7 г/л и 49,2-54,6 % ПГА, а содержание мономеров 4ГБ составляло 5,0-5,6 мол.% (Thuoc et al., 2019).

Таким образом, исследованные жирные углеродные субстраты (олеиновая кислота, пальмовое масло и жир из кильки балтийской) могут рассматриваться как основной источник углерода для синтеза сополимеров, содержащих макровключения мономеров 4-гидроксibuтирата, при использовании в качестве прекурсора ϵ -капролактона.

5.2.4 Синтез серосодержащих полигидроксиканоатов на жировых источниках углерода

Обычно, сополимерные ПГА представляют собой основную цепь, состоящую из 3-гидроксibuтирата, к которой присоединяются другие мономеры, такие как, например, 3-, 4-гидроксивалерат или 4-гидроксibuтират. Однако, существует и другой класс ПГА – политииоэфир, в сополимерах атомы серы являются частью основной цепи полимера. Такие ПГА демонстрируют необычные свойства, одно из которых – затруднение процессов кристаллизации по сравнению с большинством известных типов ПГА. Температура плавления

поли(3-меркаптопропионата) (П(ЗМП)) близка к температуре плавления П(ЗГБ), но П(ЗМП) проявляет более высокую термическую стабильность. Также было показано, что сополимеры этого типа обладают антибактериальными свойствами (Kawada et al., 2003). В качестве прекурсоров, необходимых для синтеза серосодержащих мономеров, используют различные соединения: 3-меркаптопропионовую кислоту, 3,3'-дитиодипропионовую кислоту или 3,3'-тиодипропионовую кислоту, подробно синтез таких сополимеров был изучен в культуре исследуемого в настоящей работе штамма при его культивировании на фруктозе в качестве основного источника углерода (Zhila et al., 2023a).

В данном разделе работы рассматривается потенциальная возможность синтеза серосодержащих сополимеров штаммом *C. necator* В-10646 при использовании жиросодержащих углеродных субстратов. Для этого в качестве прекурсора мономеров 3-меркаптопропионата использовали 3-меркаптопропионовую кислоту, в качестве контрольного эксперимента культуру бактерий выращивали с использованием фруктозы как основного источника углерода (Zhila et al., 2023a). 3-меркаптопропионовую кислоту, аналогично другим рассмотренным прекурсорам вносили дробно: две добавки по 1,0 г/л каждая на 0 и 24 ч роста бактерий соответственно (суммарно подано 2,0 г/л 3-меркаптопропионовой кислоты).

Результаты роста бактерий и накопления ПГА показаны на Рисунке 29. При замене фруктозы на жиросодержащие источники углерода (олеиновая кислота, пальмовое масло и жир из кильки балтийской) во всех случаях отмечалось снижение как урожая биомассы бактерий, так и накопления ПГА. Добавление в питательную среду 3-меркаптопропионовой кислоты привело к тому, что концентрация клеток в культуре бактерий не превышала 1,6 г/л, в то время как при использовании фруктозы этот показатель достигал 4,2 г/л биомассы. Внутриклеточное содержание ПГА, также значительно уступало результатам, полученным на фруктозе (58 %), и составило 28, 13 и 11 % ПГА для олеиновой кислоты, пальмового масла и жира из кильки балтийской, соответственно.

Анализ мономерного состава образцов ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода, показал лишь минорные включения мономеров 3-меркаптопропионата, не превышающие 1,0 мол.%, в то время как в образце ПГА, полученном при использовании фруктозы доля мономеров ЗМП составляла порядка 22,0 мол.%. По всей видимости, аналогично результатам, полученным при использовании γ -валеролактона, жиросодержащие углеродные субстраты – олеиновая кислота, пальмовое масло и жир из кильки балтийской, не способны обеспечить высокие включения мономеров 3-меркаптопропионата, и, следовательно не могут рассматриваться как субстраты для синтеза серосодержащих сополимеров штаммом *C. necator* В-10646.

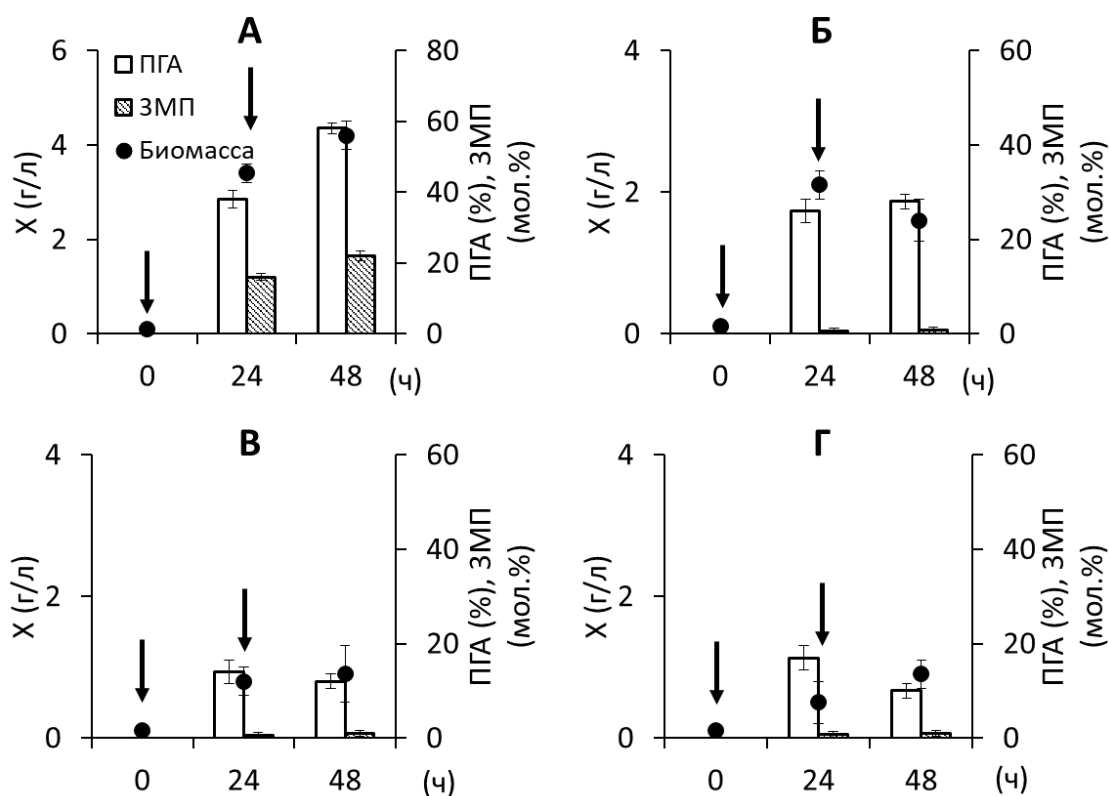


Рисунок 29 – Урожай биомассы бактерий *C. necator* B-10646, содержание ПГА и включение мономеров 3МП при росте на фруктозе (А), олеиновой кислоте (Б), пальмовом масле (В) и жире из кильки балтийской (Г) с добавлением 3-меркаптопропионовой кислоты на 0 и 24 ч в концентрации 1,0 г/л, время добавок прекурсора отмечено стрелками

Согласно литературным данным, наиболее часто в качестве основного источника углерода для синтеза серосодержащих ПГА в присутствии 3-меркаптопропионовой кислоты бактериями, принадлежащими таксону *Cupriavidus*, рассматриваются такие соединения как глюкоза, фруктоза, глюконовая кислота и ее соли: при их использовании авторам ряда работ удалось синтезировать ПГА с содержанием мономеров 3МП до 40-45 мол.% (Lutke-Eversloh et al., 2001; 2002). Применение жиросодержащих источников углерода, таких как соевое, касторовое, кукурузное масла, для синтеза серосодержащих ПГА также описано, однако, в качестве прекурсора мономеров 3МП была использована 3,3'-тиодипропионовая кислота, что позволило авторам получить сополимеры с содержанием 3МП до 39,0 мол.% (Kamei et al., 2007).

Таким образом, использование группы жиросодержащих источников углерода для синтеза сополимеров, содержащих момеры 3-меркаптопропионата, при использовании 3-меркаптопропионовой кислоты в качестве прекурсора представляется неэффективным ввиду низкого содержания мономеров 3МП в составе сополимеров.

5.3 Молекулярно-массовые характеристики полигидроксиспиртов, синтезированных при использовании жиродержащих углеродных субстратов

Молекулярно-массовые свойства полимеров – это одна из основных характеристик высокомолекулярных соединений, влияющая на переработку полимеров в изделия и их механические свойства. Молекулярная масса ПГА является весьма вариативным параметром, существенно зависящим от режима и продолжительности процесса культивирования, процедуры экстракции полимера и других факторов, поэтому данные о молекулярной массе таких полимеров могут различаться на порядок по данным разных авторов (Laycock et al., 2013). Известно, что механическая прочность ПГА существенно снижается, если его средневесовая молекулярная масса менее 200 кДа, поэтому при низких значениях этого параметра (M_w 200 кДа) полимер достаточно хрупкий (Сох, 1994).

Образцы полимеров, экстрагированных из клеток бактерий, выращенных на жиродержащих углеродных субстратах и очищенных до гомогенного состояния, показали достаточно широкую вариабельность таких показателей как средневесовая (M_w) (от 306 до 780 кДа) и среднечисловая (M_n) (83-190 кДа) молекулярная масса при значениях полидисперсности ($\bar{D}$) 2,8-5,5 (Таблица 12, Рисунок 30). Наиболее высокие показатели M_w были получены для образцов ПГА, синтезированных при использовании в качестве единственного источника углерода растительных масел (Рисунок 30Б) – рыжикового и подсолнечного (740-780 кДа); кроме этого, для данной группы образцов характерна достаточно высокая степень полидисперсности – до 4,4. Несколько ниже M_w зарегистрирована для полимеров, полученных на пальмовом масле и жирах из кильки балтийской и скумбрии атлантической – 663-670 кДа, полидисперсность этих образцов также была высока – до 5,5 единиц. При использовании олеиновой кислоты M_w значительно отличалась от прочих образцов ПГА и составила 519 ± 16 кДа с полидисперсностью образцов $4,0 \pm 0,4$.

Образцы ПГА, синтезированные при использовании пальмитиновой, стеариновой кислот (Рисунок 30А), говяжьего жира (Рисунок 30В), а также жировых отходов рыбоперерабатывающей промышленности (жиры из скумбрии атлантической и судака обыкновенного) характеризовались средними значениями M_w (399-460 кДа) при значениях $\bar{D}$ от $2,8 \pm 0,2$ до $4,1 \pm 0,4$; несколько ниже этот показатель был для лауриновой и миристиновой кислот, а также для бараньего жира (306-365 кДа).

Таблица 12 – Молекулярно-массовые характеристики образцов ПГА, синтезированных *C. necator* В-10646 на жиросодержащих источниках углерода

Источник углерода	Молекулярно-массовые характеристики		
	М _в , кДа	М _ч , кДа	Đ
Лауриновая кислота	306±28 ^{a*}	83±9 ^a	3,7±0,2 ^a
Миристиновая кислота	365±33 ^{ad}	99±7 ^a	3,7±0,2 ^a
Пальмитиновая кислота	424±21 ^c	121±5 ^b	3,5±0,3 ^a
Стеариновая кислота	447±36 ^c	154±7 ^c	2,9±0,1 ^b
Олеиновая кислота	519±16 ^d	131±14 ^{bd}	4,0±0,4 ^a
Пальмовое масло	670±11 ^e	129±13 ^{bd}	5,2±0,2 ^{cd}
Рыжиковое масло	740±14 ^f	168±10 ^c	4,4±0,7 ^{ac}
Подсолнечное масло раф.	780±46 ^f	190±8 ^e	4,1±0,4 ^a
Подсолнечное масло нераф.	775±39 ^f	179± ^e	4,4±0,4 ^{ac}
Бараний жир	312±26 ^a	112±5 ^b	2,8±0,2 ^b
Говяжий жир	399±31 ^{bcg}	144±16 ^{cd}	2,8±0,2 ^b
Жир из кильки балтийской	663±14 ^e	121±6 ^b	5,5±0,2 ^d
Жир из скумбрии атлантической	460±41 ^g	159±9 ^c	2,9±0,1 ^b
Жир из судака обыкновенного	401±18 ^{bcg}	98±7 ^a	4,1±0,4 ^a

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Анализ литературных данных показывает, что молекулярная масса ПГА может составлять от нескольких сотен до миллионов Да. Как упоминалось выше, эти характеристики зависят от технических особенностей культивирования и последующей экстракции, вида используемого продуцента и типа углеродного сырья. Опубликованные данные работы (Akiyama et al., 1992), по использованию жирных кислот в качестве источника углерода для роста штамма *Alcaligenes* sp. АК 201 и синтеза ПГА, согласуются с результатами, полученными в настоящей работе – М_в образцов полимеров, синтезированных с использованием лауриновой кислоты составляла 304 кДа и при замене на кислоты с более длинной углеродной цепью также зафиксировано увеличение этого показателя. Средневесовая молекулярная масса образцов ПГА, синтезированных штаммами *C. necator* IPT 026 и *B. ceracia* IPT 119 при использовании пальмового масла, как показано в работе (Rodrigues et al., 2018), значительно уступает результатам, полученным в настоящей работе – синтезированные образцы характеризовались

средневесовой молекулярной массой 173-389 кДа и более низкими значениями полидисперсности 1,6-2,5.

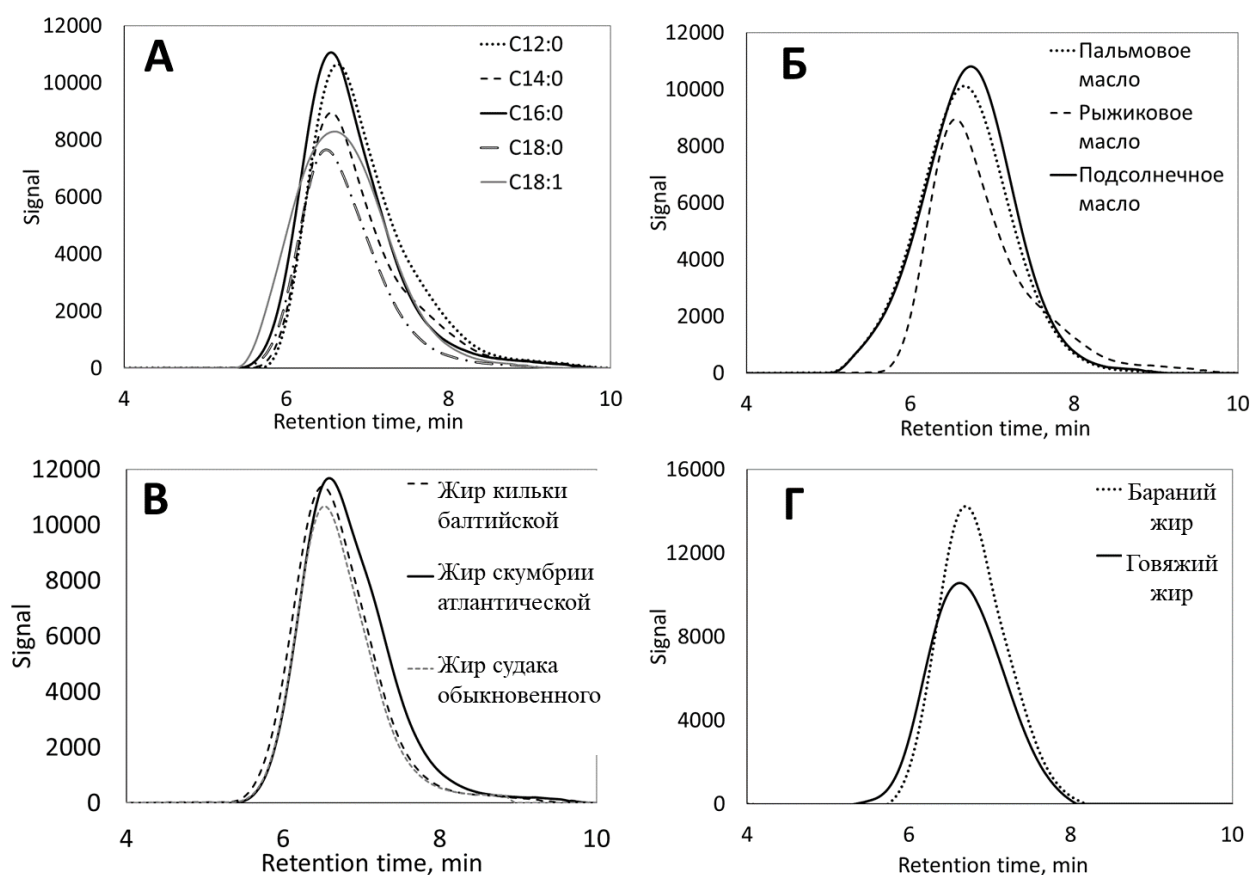


Рисунок 30 – Хроматограммы распределения молекулярной массы образцов ПГА, синтезированных *S. necator* В-10646 при использовании в качестве источника углерода жирных кислот (А), растительных масел (Б), рыбных жиров (В) и низкосортных животных жиров (Г)

Относительно использования отходов рыбопереработки большинство работ показали сходные с полученными в данном исследовании молекулярно-массовые характеристики синтезированных ПГА: среднечисловая молекулярная масса (M_n) 84-206 кДа и полидисперсность 2,0-2,6 (Sangkharak et al., 2021). В работе (Thuoc et al., 2021) показано, что умеренно галофильная бактерия *Salinivibrio* sp. M318 (VTCC910086) синтезировала ПГА с молекулярно-массовыми характеристиками от 200 до 630 для M_v при полидисперсности 1,4-2,0.

Анализ молекулярно-массовых характеристик сополимерных образцов ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода с добавлением прекурсоров показал следующее. С увеличением доли 3ГВ или появлением в составе ПГА мономеров 4ГБ молекулярная масса достоверно снижается во всех случаях, за исключением образца ПГА, синтезированного на жире из кильки балтийской при добавлении ϵ -капролактона (Таблица 13,

Рисунок 31). Анализ образцов ПГА, содержащих мономеры 4-гидроксивалерата и 3-меркаптопропионата не проводился ввиду низкого содержания или отсутствия соответствующих мономеров в составе сополимеров (менее 1,0 мол.%).

Среди сополимеров, синтезированных с добавлением валерата калия, наибольшие значения M_v характерны для ПГА, синтезированных на жире из кильки балтийской (327 ± 32 кДа). Использование олеиновой кислоты и пальмового масла обеспечило получение полимеров с более низкими значениями M_v (276 ± 15 и 258 ± 24 кДа соответственно). Полидисперсность ($\bar{D}$) полученных образцов ПГА была близкой и варьировала в диапазоне 3,1-3,5 (Рисунок 31А, Таблица 13).

Таблица 13 – Молекулярно-массовые характеристики образцов ПГА, синтезированных *C. necator* В-10646 на жиросодержащих источниках углерода в присутствии прекурсоров мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидоксибутирата

Основной источник углерода	Состав, мол.%				M _в , кДа	M _ч , кДа	Đ
	ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ	4ГБ			
Без добавления прекурсора							
Олеиновая кислота	98,7	1,3	–	–	519±16 ^{a*}	131±14 ^a	4,0±0,4 ^a
Пальмовое масло	97,2	1,9	0,9	–	670±11 ^c	129±13 ^a	5,2±0,2 ^b
Жир из кильки балтийской	97,8	1,7	0,5	–	663±14 ^c	121±6 ^a	5,5±0,2 ^b
+ Валерат калия							
Олеиновая кислота	53,5	46,5	–	–	276±15 ^b	79±4 ^b	3,5±0,1 ^c
Пальмовое масло	65,3	34,5	0,2	–	258±24 ^b	83±2 ^b	3,2±0,3 ^c
Жир из кильки балтийской	49,2	50,6	0,2	–	327±32 ^d	99±12 ^b	3,2±0,2 ^c
+ ε-капролактон							
Олеиновая кислота	95,8	1,7	–	2,5	281±12 ^b	119±16 ^a	2,4±0,1 ^d
Пальмовое масло	94,7	–	0,7	4,6	374±32 ^d	155±23 ^a	2,4±0,2 ^d
Жир из кильки балтийской	84,5	1,9	0,2	7,4	609±42 ^{ac}	278±11 ^c	2,2±0,2 ^d

* – одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий при сравнении групп по критерию Манна-Уитни на уровне $p < 0,05$.

Молекулярно-массовые характеристики ПГА – это наиболее вариabельный параметр, зависящий от множества факторов, включая штамм-продуцент, источник углеродного и азотного питания, условия культивирования, мономерный состава, способ экстракции и др. Ввиду этого, данные, описанные в литературе для сополимеров, содержащих 3ГВ и полученных на жировых субстратах, варьируют. Показано, что получены ПГА со значениями M_v 630-740 кДа при полидисперсности 1,7-3,9 (Lee et al., 2008, Thuoc et al., 2019).

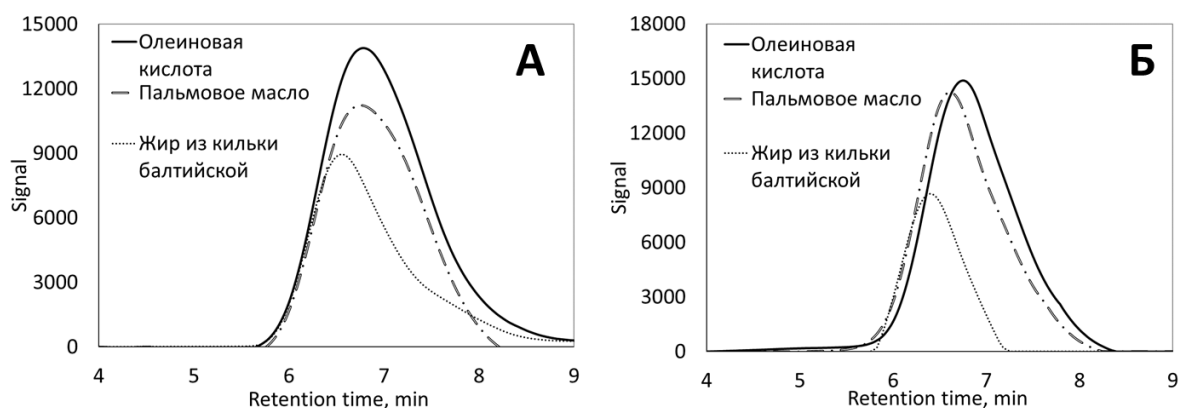


Рисунок 31 – Хроматограммы распределения молекулярной массы образцов ПГА, синтезированных на жиросодержащих субстратах в присутствии прекурсоров: ПГА, содержащие макровключения мономеров 3-гидроксивалерата (А), и 4-гидроксибутирата (Б)

Анализ молекулярно-массовых характеристик ПГА, синтезированных в присутствии ϵ -капролактона показал, что культивирование штамма на жире из кильки балтийской обеспечило синтез четырехкомпонентного сополимера, характеризующегося как самой высокой средневесовой молекулярной массой (до 609 ± 42 кДа), так и самым высоким включением 4ГБ ($7,4 \pm 0,4$ мол.%). При использовании пальмового масла и включении мономеров 4ГБ 4,6 мол.% M_v и M_w были ниже в 1,6 и 1,8 раз, составив, соответственно, 374 ± 32 и 155 ± 23 кДа. При использовании олеиновой кислоты величина M_v была самой низкой (281 ± 12 кДа), как и включение 4ГБ ($2,5 \pm 0,2$ мол.%). В отношении полидисперсности полученных образцов ПГА показано, что значимых отличий обнаружено не было – этот показатель лежал в диапазоне 2,2-2,5 (Таблица 13, Рисунок 31Б).

Опубликованные в литературе данные относительно молекулярно-массовых характеристик ПГА, содержащих мономеры 4ГБ, при использовании в качестве основного источника углерода жиросодержащих субстратов несколько противоречивы. Так, при культивировании *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 на олеиновой кислоте с различными прекурсорами мономеров 4ГБ полученные образцы сополимеров имели M_v 424-468 кДа при значениях полидисперсности 1,9-2,0 (Rahayu et al., 2008). В другой работе (Ramachandran et al., 2013) сообщается о синтезе П(3ГБ-co-4ГБ) штаммом *Cupriavidus* sp. USMAHM13 при росте на жирных кислотах с соответствующими прекурсорами; полученные сополимеры имели средневесовую молекулярную массу 21-35 кДа при $\bar{D} = 1,7-2,0$.

Сравнение полученных данных с опубликованными в литературе иллюстрирует большое разнообразие в части молекулярно-массовых характеристик получаемых полимеров в ответ на использование различных продуцентов, субстратов и условий культивирования, тем не менее,

средневесовая молекулярная масса полученных образцов ПГА превышает 200 кДа, что позволяет перерабатывать такие ПГА в изделия различными способами.

5.4 Термические свойства и кристалличность образцов полигидроксиалканоатов, синтезированных на жиросодержащих углеродных субстратах

Температурные свойства ПГА и их способность к кристаллизации в нативном состоянии являются важными параметрами, определяющими термомеханические свойства и, следовательно, возможность переработки в изделия из расплавов. Наличие разрыва между температурой начала плавления ($T_{пл}$) и температурой начала термического разложения ($T_{дегр}$) – это важное технологическое свойство полимеров, поскольку позволяет получать продукты на их основе различными методами переработки. Результаты анализа термического поведения синтезированных образцов ПГА, полученных при использовании жиросодержащих углеродных субстратов в качестве источника углерода показаны в Таблице 14 и на Рисунке 32.

Таблица 14 – Термические характеристики и степень кристалличности образцов ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода

Источник углерода	$T_{пл}$, °C	$T_{дегр}$, °C	C_x , %
Лауриновая кислота	169±6	288±12	70±5
Миристиновая кислота	169±7	285±10	73±5
Пальмитиновая кислота	170±6	285±17	71±4
Стеариновая кислота	166±10	283±17	68±4
Олеиновая кислота	165±9	286±19	66±4
Пальмовое масло	171±8	286±20	66±5
Рыжиковое масло	170±8	271±15	70±3
Подсолнечное масло раф.	170±9	281±16	65±6
Подсолнечное масло нераф.	171±7	282±19	67±4
Бараний жир	165±8	266±18	65±5
Говяжий жир	160±8	269±16	64±6
Жир из кильки балтийской	160±7	284±13	71±4
Жир из скумбрии атлантической	155±9	251±19	72±3
Жир из судака обыкновенного	169±5	277±14	71±5

Исследование термического поведения образцов ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода, показало следующее. Существенных различий между образцами ПГА выявлено не было – показаны близкие температуры плавления ($T_{пл}$). Для ПГА, полученных при использовании жирных кислот этот показатель составил 165-170 °С, растительных масел – 170-171 °С, животных жиров – 160-165 °С, жировых отходов рыбопереработки – 155-169 °С, причем, в случае использования жира из кильки балтийской, где был получен сополимерный образец ПГА (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-ЗГГ)), выявлено наличие двух пиков в области плавления при температурах 160 и 168 °С. В качестве примера на Рисунке 32 приведены термограммы образцов, полученных на насыщенных жирных кислотах.

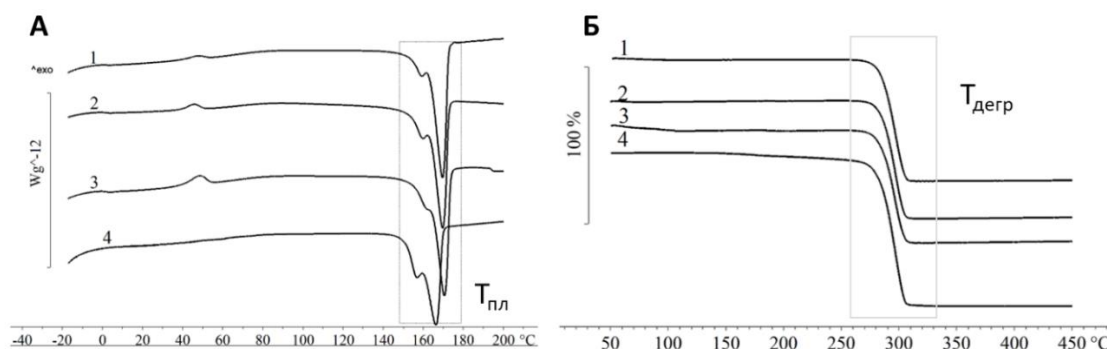


Рисунок 32 – Температурные характеристики образцов ПГА, синтезированных на насыщенных жирных кислотах – кривые ДСК (А) и термостабильность (ТГА) (Б): 1 – лауриновая, 2 – миристиновая, 3 – пальмитиновая, 4 – стеариновая жирные кислоты

В отношении температуры термического разложения ($T_{дегр}$) синтезированных полимеров значимых отличий также обнаружено не было: $T_{дегр}$ для образцов ПГА, синтезированных на жирных кислотах, лежала в диапазоне 283-288 °С, на растительных маслах – 271-286 °С, на животных жирах – 266-269 °С, а на жирах, полученных из отходов рыбопереработки – 251-284 °С. Стоит также отметить, что во всех случаях разрыв между температурой начала плавления и температурой начала термического разложения составил порядка 100 °С (96-121 °С), что свидетельствует о наличии достаточного широкого технологического окна для переработки полученных расплавов в изделия различными способами.

Анализ температурных характеристик сополимеров, содержащих включения мономеров ЗГВ, синтезированных при внесении валерата калия, показал, что $T_{пл}$ снижается с увеличением содержания ЗГВ в составе сополимера и составляет 167, 166 и 168 °С для олеиновой кислоты, пальмового масла и жира из кильки балтийской соответственно. Также небольшое снижение этого показателя, хоть и менее выраженное, характерно для сополимеров, содержащих мономеры 4ГБ в своем составе. В отношении температуры термического разложения выраженного снижения этого показателя у синтезированных образцов ПГА не выявлено. Для всех образцов показано, что разрыв между $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ составляет более 100 °С (Таблица 15).

Таблица 15 – Термические характеристики и степень кристалличности образцов ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода в присутствии прекурсоров мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутирата

Основной источник углерода	Состав, мол.%				T _{пл} , °C	T _{дегр} , °C	C _x , %
	ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ	4ГБ			
Без добавления прекурсора							
Олеиновая кислота	98,7	1,3	–	–	165±9	286±19	66±4
Пальмовое масло	97,2	1,9	0,9	–	171±8	286±20	66±5
Жир из кильки балтийской	97,8	1,7	0,5	–	160±7	284±13	71±4
+ Валерат калия							
Олеиновая кислота	53,5	46,5	–	–	167±9	279±14	40±4
Пальмовое масло	65,3	34,5	0,2	–	166±7	283±17	39±5
Жир из кильки балтийской	49,2	50,6	0,2	–	168±7	285±16	43±5
+ε-капролактон							
Олеиновая кислота	95,8	1,7	–	2,5	156±10	283±16	53±5
Пальмовое масло	94,7	–	0,7	4,6	161±9	285±16	47±3
Жир из кильки балтийской	84,5	1,9	0,2	7,4	167±9	274±17	49±4

Полигидроксиалканоаты по своей природе являются полукристаллическими полимерами, поскольку кристаллизация происходит не во всех областях материала. Степень кристалличности (C_x) – наименее изученный аспект ПГА несмотря на то, что этот параметр напрямую определяет механические и физические свойства полимера. Анализ степени кристалличности синтезированных образцов ПГА, показал, что более высокая степень кристалличности характерна для жиров, полученных из отходов рыбопереработки (71-72 %) и при использовании жирных кислот (66-73 %). Небольшое снижение степени кристалличности до 64-65 % отмечено для сополимерных образцов П(3ГБ-*co*-3ГВ-*co*-3ГГ), полученных на животных жирах и растительных маслах.

При увеличении содержания мономеров 3-гидроксивалерата (в случае внесения в питательную среду валерата калия) в составе сополимеров отмечено снижение степени кристалличности ПГА практически вдвое – до 40±4, 39±5 и 43±5 % для олеиновой кислоты, пальмового масла и жира из кильки балтийской соответственно. Также показано, что даже невысокое содержание мономеров 4ГБ (2,5-7,4 мол.%) в составе сополимеров приводит к выраженному снижению степени кристалличности этих образцов ПГА (ПГА, синтезированные при добавлении ε-капролактона) – до 53±5, 47±3 и 49±4 % для олеиновой кислоты, пальмового масла и жира из кильки балтийской (Таблица 15).

В доступной литературе данные о температурных характеристиках ПГА, полученных на отдельных жирных кислотах, ограничены. Большая часть опубликованных данных относится к многокомпонентным сополимерам, содержащим средне- и длинноцепочечные мономеры, которые синтезируются представителями *Pseudomonas*; T_{пл} таких сополимеров находится в

диапазоне 52-77 °C (Gumel, 2014). В целом, полученные в работе результаты наиболее близки к температурным характеристикам ПГА, синтезируемых штаммом *D. tsuruhatensis* Bet002 на индивидуальных жирных кислотах ($T_{пл}$ 173,2-177,4 °C; $T_{дегр}$ 289,8-391,8 °C) (Gumel, 2014). Данные по термическому поведению образцов ПГА, синтезированных на растительных маслах, согласуются с опубликованными в литературе: сообщается о синтезе ПГА, имеющими $T_{пл}$ 159-170 °C и $T_{дегр}$ на уровне 280 °C (Chuah et al., 2013; Pérez-Arauz et al., 2019). Использование жиров из отходов рыбной отрасли обеспечило синтез ПГА с температурами плавления 132-170 °C штаммами *Salinivibrio* sp. M318 (Thuoc et al., 2019) и *B. subtilis* (Mohapatra et al., 2017), причем в первом случае авторы также отметили наличие двух пиков в области плавления, при 132-141 и 150-160 °C, а во втором – температура начала термической деградации оценивалась на уровне 300 °C. Данных относительно степени кристалличности образцов ПГА, синтезированных при использовании жиросодержащих источников углерода, в доступной литературе не обнаружено.

5.5 Заключение к главе

Исследованы мономерный состав ПГА, синтезированных на жиросодержащих источниках углерода, а также возможность природного штамма *C. necator* B-10646 синтезировать полимеры, содержащие мономеры 3-гидроксивалерата, 4-гидроксивалерата, 4-гидроксипропионата и 3-меркаптопропионата при культивировании на жиросодержащих источниках углерода и соответствующих прекурсорах. С привлечением современных широко используемых методов были исследованы физико-химические свойства линейки образцов ПГА различного мономерного состава, полученных на жиросодержащих источниках углерода (жирные кислоты, растительные масла, рыбные и животные жиры, в том числе с добавлением прекурсоров). В зависимости от источника углерода молекулярно-массовые характеристики синтезированных образцов ПГА отличались, варьируя в диапазоне 258-780 кДа для средневесовой молекулярной массы и при полидисперсности 2,3-5,5. Анализ термического поведения показал, что синтезированные образцы характеризовались значениями температуры плавления и термической деградации в диапазоне 155-171 и 259-288 °C соответственно. Степень кристалличности синтезированных ПГА составила 64-78 %. При включении в состав ПГА мономеров 3ГВ (34,5-50,6 мол.%) и 4ГВ (2,5- 7,4 мол.%) $T_{пл}$ составила 156-168 °C при сниженных значениях C_x (до 39-53 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненная работа посвящена исследованию микробного биосинтеза разрушаемых ПГА при использовании жиросодержащих субстратов различного происхождения, включая жировые отходы рыбоперерабатывающей промышленности, хемолитоорганотрофными водородокисляющими бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

Основным препятствием на пути успешной коммерциализации и интеграции ПГА во многие сферы жизнедеятельности человека является высокая стоимость их производства. Затраты на источник углеродного питания для продуцента – это одна из наиболее значимых статей расходов при промышленном производстве этих биопластиков, и по разным оценкам она может достигать 40-45 % от суммы всех затрат. Ввиду этого, поиск, привлечение и разработка дешевого сырья для производства ПГА является центральным звеном в структуре направлений исследований этих биоматериалов.

В представленной работе рассмотрены различные группы жиросодержащих углеродных субстратов на предмет пригодности и эффективности их использования в качестве источника углерода для роста штамма бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА. В результате сравнительного анализа жиросодержащих субстратов, установлено, что наиболее эффективными с точки зрения продукционных показателей культуры бактерий, сопоставимых с результатами процесса на сахарах, являются: из группы жирных кислот – олеиновая кислота, из группы растительных масел – пальмовое масло, из группы жиров животного происхождения – жир, извлеченный из кильки балтийской (отход рыбопереработки). Показано, что указанные источники углерода позволяют достичь урожаев биомассы бактерий до 8,3 г/л при внутриклеточном содержании ПГА на уровне 65-85 %.

С применением различных источников углерода синтезирована линейка полимеров различного мономерного состава: П(ЗГБ), П(ЗГБ-со-ЗГВ), П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-ЗГГ). Показано, что тип используемого источника углерода влияет на мономерный состав и молекулярно-массовые характеристики ПГА: получены образцы со значениями средневесовой молекулярной массы от 258 до 780 кДа при полидисперсности 2,3-5,5, температура плавления которых варьировала от 155 до 171 °С, температура термической деградации – от 259 до 288 °С, степень кристалличности лежала в диапазоне 64-78 %.

Особо ценным для ПГА является возможность синтеза полимеров различного состава, различающихся базовыми свойствами. В представленной работе показана способность штамма *C. necator* В-10646 синтезировать сополимерные ПГА, содержащие макровключения мономеров 3-гидроксивалерата (до 50,6 мол.%) и 4-гидроксibuтирата (до 7,4 мол.%) при культивировании

на жиросодержащих источниках углерода и соответствующих прекурсорах. В зависимости от использованного основного источника углерода и прекурсора, а также от включений мономеров 3ГВ и 4ГБ, полученные образцы ПГА обладали средневесовой молекулярной массой 258-609 кДа и полидисперсностью 2,2-3,5, $T_{пл}$ 156-168 °С, а также пониженной степенью кристалличности – до 39-53 %, что позволяет рассматривать данные гетерополимеры для изготовления изделий различными методами с последующим применением в различных сферах жизнедеятельности человека.

Таким образом, результаты выполненной работы свидетельствуют о перспективности привлечения жиросодержащих источников углерода для синтеза ПГА. Рассмотренная группа углеродных субстратов способствует снижению стоимости производства ПГА по сравнению с сахаросодержащими субстратами, количественные затраты которых в 1,5 раза превышают таковые на жирах, а материальные – в 1,6 раз (при ориентировочной стоимости сахаров 146 руб./кг и пальмового масла – 90 руб./кг). Особенно значима возможность использования отходов пищевой промышленности, стоимость которых еще ниже, в качестве нового и малоисследованного субстрата для продуктивного синтеза разрушаемых биополимеров. Проведенные исследования 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* В-10646; результаты позволили разработать и реализовать биотехнологические процессы синтеза полимеров на новых субстратах с высокими выходами (до 85 ± 4 % к АСБ).

2. Показана высокая эффективность усвоения бактериями исследованных жировых субстратов при значениях экономического коэффициента по урожаю биомассы до $0,78 \pm 0,05$ 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 ($8,3 \pm 0,3$ г/л), пальмовом масле ($7,1 \pm 0,3$ г/л) и жировых отходах рыбопереработки ($4,7 \pm 0,2$ г/л).

3. Выявлены особенности мономерного состава ПГА в зависимости от использованного субстрата, заключающиеся в синтезе гомополимера П(ЗГБ) 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* В-10646 субстратов-прекурсоров позволили разработать продуктивные процессы и синтезировать сополимерные ПГА с макровключениями мономеров 3-гидроксивалерата (до 50,6 мол.%) и 4-гидроксипутирата (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 $73 \pm 4\%$), 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЗГБ – 3-гидроксibuтират

ЗГВ – 3-гидроксивалерат

ЗГГ – 3-гидроксигексаноат

ЗГО – 3-гидроксioктаноат

4ГБ – 4-гидрокибутират

4ГВ – 4-гидроксивалерат

Д – полидисперсность

$R_{ПГА}$ – продуктивность по ПГА

R_X – продуктивность по биомассе

Y_X – экономический коэффициент по биомассе

$Y_{ПГА}$ – экономический коэффициент по ПГА

X – биомасса

АПБ – ацилпереносящий белок

АСБ – абсолютно сухая биомасса

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ДАГ – диацилглицериды

ДСК – дифференциально сканирующая калориметрия

ЖК – жирные кислоты

КоА – кофермент ацетилирования

МАГ – моноацилглицериды

M_v – средневесовая молекулярная масса

M_n – среднечисловая молекулярная масса

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

П(ЗГБ) – поли(3-гидроксibuтират)

П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат)

П(ЗГБ-*co*-ЗМП) - поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-меркаптопропионат)

П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-ЗГГ) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-3-гидроксигексаноат)

П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-4ГБ) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-4-гидроксibuтират)

П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-4ГВ) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-4-гидроксивалерат)

П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-4ГБ-*co*-ЗГГ) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-4-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксигексаноат)

П(ЗГБ-*co*-3ГО) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксиоктаноат)

П(ЗГБ-*co*-4ГБ) – поли(3-гидроксibuтират-*co*-4-гидроксибутират)

П(ЗГГ) – поли(3-гидроксигексаноат)

П(ЗГО) – поли(3-гидроксиоктаноат)

П(ЗМП) – поли(3-меркаптопропионат)

П_{ЗГВ} – продуктивность по мономерам ЗГВ

П_{4ГБ} – продуктивность по мономерам 4ГБ

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПТЭ – политиоэфиры

СПМ – сырое пальмовое масло

СПЯМ – сырое пальмоядровое масло

С_х – степень кристалличности

ТАГ – триацилглицериды

ТГА – термогравиметрический анализ

Т_{дегр} – температура начала термической деградации

Т_{пл} – температура начала плавления

Т_{стек} – температура стеклования

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова Т. Г. Влияние условий роста на накопление полиоксибутирата водородными бактериями / Т. Г. Волова, Г. С. Калачева, В. М. Константинова, А. П. Пузырь // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Vol. 28. – P. 221-230.
2. Галузина Т. В. Структура и свойства полигидроксиалканоатов, синтезируемых *Methylobacterium extorquens* G10, из метанола и его смеси с пентанолом / Т. В. Галузина, В. А. Герасин, Н. В. Доронина, В. А. Ежов, Ю. А. Троценко, С. В. Киприанов, А. О. Иванова, М. П. Филатова, Б. Ф. Шклярчук // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2015. – Т. 57. – №. 6. – С. 511-511.
3. Единые нормы отходов, потерь, выхода готовой продукции и расхода сырья при производстве пищевой продукции из морских гидробионтов [Электронный ресурс] : утв. Госкомрыболовством РФ 29.04.2002. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/499053305> (дата обращения 11.08.2025)
4. Зайцев Г. Н. Методика биометрических расчетов. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г.Н. Зайцев. – М.: Наука. – 1973. – 293 с.
5. 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. 1–9.
6. Akiyama M. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation / M. Akiyama, T. Tsuge, Y. Doi // Polymer Degradation and Stability. – 2003. – Vol. 80. – №. 1. – P. 183-194.
7. Akiyama M. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids / M. Akiyama, Y. Taima, Y. Doi // Applied microbiology and biotechnology. – 1992. – Vol. 37. – P. 698-701.
8. Alfio V. G. From fish waste to value: an overview of the sustainable recovery of omega-3 for food supplements / V. G. Alfio, C. Manzo, R. Micillo // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – №. 4. – P. 1002.
9. Alias Z. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique / Z. Alias, I. K. P. Tan // Bioresource technology. – 2005. – Vol. 96. – №. 11. – P. 1229-1234.
10. Al-Shahib W. Fatty acid content of the seeds from 14 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L / W. Al-Shahib, R. J. Marshall // International journal of food science and technology. – 2003. – Vol. 38. – №. 6. – P. 709-712.

11. Anderson A. J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A. J. Anderson, E. A. Dawes // Microbiological reviews. – 1990. – Vol. 54. – №. 4. – P. 450-472.
12. Anderson A. J. Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus* / A. J. Anderson, D. R., Williams, B. Taidi, E. A. Dawes, D. F. Ewing // FEMS microbiology reviews. – 1992. – Vol. 9. – P. 93-101.
13. Anis S. N. S. *In vivo* and *in vitro* depolymerizations of intracellular medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas putida* Bet001 / S. N. S. Anis, A. M. S. Mohamad, K. Simarani // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. – Vol. 47. – №. 8. – P. 824-834.
14. Anitha N. N. N. Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and Their Applications / N. N. N. Anitha, R. K. Srivastava // Environmental and Agricultural Microbiology: Applications for Sustainability / B. B. Mishra, S. K. Nayak, S. Mohapatra, D. Samantaray. – Scrivener Publishing LLC, 2021. – Chapter 7. – P. 151-181.
15. Anjum A. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements / A. Anjum, M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M.N. Anjum, S. Tabasum // International journal of biological macromolecules. – 2016. – Vol. 89. – P. 161-174.
16. Argiz L. Open-culture biotechnological process for triacylglycerides and polyhydroxyalkanoates recovery from industrial waste fish oil under saline conditions / L. Argiz, R. Gonzalez-Cabaleiro, D. Correa-Galeote, A. V. del Rio, A. Mosquera-Corral // Separation and Purification Technology. – 2021. – Vol. 270. – P. 118805.
17. Ashby R. D. Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from crude Alaskan pollock (*Theragra chalcogramma*) oil / R. D. Ashby, D. K. Solaiman // Journal of Polymers and the Environment. – 2008. – Vol. 16. – P. 221-229.
18. Asiri F. A novel recirculating aquaculture system for sustainable aquaculture: Enabling wastewater reuse and conversion of waste-to-immune-stimulating fish feed / F. Asiri, K. H. Chu // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2020. – Vol. 8. – №. 49. – P. 18094-18105.
19. Barham P. J. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate / P. J. Barham, A. Keller, E. L. Otun, P. A. Holmes // Journal of Materials Science. – 1984. – Vol. 19. – P. 2781-2794.
20. Basiron Y. Palm oil production through sustainable plantations / Y. Basiron // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2007. – Vol. 109. – №. 4. – P. 289-295.
21. Beeby M. Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha* / M. Beeby, M. Cho, J. Stubbe, G. J. Jensen // Journal of bacteriology. – 2012. – Vol. 194. – №. 5. – P. 1092-1099.

22. Behera S. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications / S. Behera, M. Priyadarshane, D. S. Vandana // *Chemosphere*. – 2022. – Vol. 294. – P. 133723.
23. Bhubalan K. Cloning and expression of the PHA synthase gene from a locally isolated *Chromobacterium* sp. USM2 / K. Bhubalan, Y. C. Kam, K. H. Yong, K. Sudesh // *Mal J Microbiol*. – 2010. – Vol. 6. – P. 81-90.
24. Black P. N. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification / P. N. Black, C. C. DiRusso // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – Vol. 67. – P. 454-472.
25. Braunegg G. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass / G. Braunegg, B. Y. Sonnleitner, R. M. Lafferty // *European journal of applied microbiology and biotechnology*. – 1978. – Vol. 6. – P. 29-37.
26. Brigham C. J. Elucidation of β -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression / C. J. Brigham, C. F. Budde, J. W. Holder, Q. Zeng, A. E. Mahan, C.K. Rha, A. J. Sinskey // *Journal of bacteriology*. – 2010. – Vol. 192. – №. 20. – P. 5454-5464.
27. Brigham C. J. The potential of polyhydroxyalkanoate production from food wastes / C. J. Brigham, S. L. Riedel // *Applied Food Biotechnology*. – 2018. – Vol. 6. – №. 1. – P. 7-18.
28. Budde C. F. Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium / C. F. Budde, S. L. Riedel, F. Hübner, S. Risch, M. Popović, C. Rha, A. J. Sinskey // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2011. – Vol. 89. – P. 1611-1619.
29. Carpine R. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: can cyanobacteria meet this challenge? / R. Carpine, G. Olivieri, K. Hellingwerf, A. Pollio // *Processes*. – 2020. – Vol. 8. – №. 3. – P. 323.
30. Carr N. G. The occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii* / N.G. Carr // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*. – 1966. – Vol. 120. – №. 2. – P. 308-310.
31. Chanprateep S. Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) / S. Chanprateep, K. Buasri, A. Muangwong, P. Utiswannahkul, // *Polymer Degradation and Stability*. – 2010. – Vol. 95. – №. 10. – P. 2003-2012.
32. Chee J. Y. Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols / J. Y. Chee, Y. Tan, M. R. Samian, K. Sudesh // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2010. – Vol. 18. – P. 584-592.

33. Chen B. Y. Exploring two-stage fermentation strategy of polyhydroxyalkanoate production using *Aeromonas hydrophila* / B. Y. Chen, J. Y. Hung, T. J. Shiau, Y. H. Wei // Biochemical engineering journal. – 2013. – Vol. 78. – P. 80-84.
34. Chen B. Y. Feasibility study on polyhydroxybutyrate production of dye-decolorizing bacteria using dye and amine-bearing cultures / B. Y. Chen, T. J. Shiau, Y. H. Wei, W. M. Chen // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. – 2012. – Vol. 43. – №. 2. – P. 241-245.
35. Chen G. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) / G. Chen, G. Zhang, S. Park, S. Lee // Applied microbiology and biotechnology. – 2001. – Vol. 57. – P. 50-55.
36. Chen G. Q. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates // Plastics from bacteria / G. Q. Chen. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – P. 17-37.
37. Chen Y. J. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7 / Y. J. Chen, Y. C. Huang, C. Y. Lee // Journal of bioscience and bioengineering. – 2014. – Vol. 118. – №. 2. – P. 145-152.
38. Chowdhury B. Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate / B. Chowdhury, M. E. John // Thermochimica Acta. – 1998. – Vol. 313. – №. 1. – P. 43-53.
39. Chuah J. A. Characterization of site-specific mutations in a short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase: *in vivo* and *in vitro* studies of enzymatic activity and substrate specificity / J. A. Chuah, S. Tomizawa, M. Yamada, T. Tsuge, Y. Doi, K. Sudesh, K. Numata // Applied and environmental microbiology. – 2013. – Vol. 79. – №. 12. – P. 3813-3821.
40. Ciesielski S. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production / S. Ciesielski, J. Możejko, N. Pisutpaisal // Journal of Cleaner Production. – 2015. – Vol. 106. – P. 408-421.
41. Cox M. K. Properties and applications of polyhydroxyalkanoates / M. K. Cox // Studies in Polymer Science. – Elsevier, 1994. – Vol. 12. – P. 120-135.
42. da Cruz Pradella J. G. Economics and industrial aspects of PHA production / G. J. da Crua Pradella // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2011. – Vol. 164. – №. 6. – P. 867.
43. Dai Z. W. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion / Z. W. Dai, X. H. Zou, G. Q. Chen // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. – №. 17. – P. 3075-3083.
44. Desuoky A. M. Biosynthesis of polyhydroxyalkanotes in wildtype yeasts / A. M. Desuoky, A. B. D. El-Haleem, S. A. Zaki, A. T. Abuelhamd, A. Amara, G. M. S. Aboelreesh // Journal of Applied Sciences and Environmental Management. – 2007. – Vol. 11. – №. 3.
45. Dietrich K. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries / K. Dietrich, M. J. Dumont, L. F. Del Rio, V. Orsat // New biotechnology. – 2019. – Vol. 49. – P. 161-168.

46. Doi Y. Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate / Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, K. Soga // *Macromolecules*. – 1988. – Vol. 21. – №. 9. – P. 2722-2727.
47. Eggink G. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida* / G. Eggink, H. van der Wal, G. N. Huijberts, P. de Waard // *Industrial crops and products*. – 1992. – Vol. 1. – №. 2-4. – P. 157-163.
48. Elbanna K. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly (3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate) / K. Elbanna, T. Lutke-Eversloh, S. Van Trappen, J. Mergaert, J. Swings, A. Steinbuchel, // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2003. – Vol. 53. P. 1165-1168.
49. Elbanna K. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases / K. Elbanna, T. Lütke-Eversloh, D. Jendrossek, H. Luftmann, A. Steinbüchel // *Archives of microbiology*. – 2004. – Vol. 182. – P. 212-225.
50. Elustondo P. Identification of the polyhydroxybutyrate granules in mammalian cultured cells / P. Elustondo, E. Zakharian, E. Pavlov // *Chemistry & biodiversity*. – 2012. – Vol. 9. – №. 11. – P. 2597-2604.
51. European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. Canned Sprat in the EU [Электронный ресурс]. – Publications Office of the Euro-pean Union: Luxembourg, 2020. – Режим доступа: <https://euagenda.eu/publications/european-market-observatory-for-fisheries-and-aquaculture-products-sprat-in-the-eu> (дата обращения 23.07.2025)
52. Favaro L. Bacterial production of PHAs from lipid-rich by-products / L. Favaro, M. Basaglia, J. E. G. Rodriguez, A. Morelli, O. Ibraheem, V. Pizzocchero, S. Casella // *Applied Food Biotechnology*. – 2019. – Vol. 6. – №. 1. – P. 45-52.
53. Fukui T. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain / T. Fukui, Y. Doi // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1998. – Vol. 49. – №. 3. – P. 333-336.
54. Ghosh S. Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei* / S. Ghosh, R. Gnaim, S. Greiserman, L. Fadeev, M. Gozin, A. Golberg // *Bioresource technology*. – 2019. – Vol. 271. – P. 166-173.
55. Gopi S. Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics / S. Gopi, M. Kontopoulou, B. A. Ramsay, J. A. Ramsay // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – Vol. 119. – P. 1248-1255.

56. Green P. R. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* / P. R. Green, J. Kemper, L. Schechtman, L. Guo, M. Satkowski, S. Fiedler, B. H. Rehm // *Biomacromolecules*. – 2002. – Vol. 3. – №. 1. – P. 208-213.
57. Grigore M. E. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review /M. E. Grigore, R.M. Grigorescu, L. Iancu, R.M. Ion, C. Zaharia, E. R. Andrei // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2019. – Vol. 30. – №. 9. – P. 695-712.
58. Grigull V. H. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha* / V. H. Grigull, D. D. Silva, M. C. F. Garcia, S. A. Furlan, A. P. T. Pezzin, A. L. dos Santos Schneider, G. F. Aragão // *Food Technology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 46. – №. 2. – P. 223-228.
59. Gumel A. M. Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001 / A. M. Gumel // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2014. – Vol. 45. – P. 427-438.
60. Gutschmann B. Continuous feeding strategy for polyhydroxyalkanoate production from solid waste animal fat at laboratory-and pilot-scale / B. Gutschmann, M. M. Simões, T. Schiewe, E. S. Schröter, M. Münzberg, P. Neubauer, S. L. Riedel // *Microbial Biotechnology*. – 2023. – Vol. 16. – №. 2. – P. 295-306.
61. Hahn J. J. Growth kinetics, nutrient uptake, and expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly(β -hydroxybutyrate) synthesis pathway in transgenic maize cell suspension cultures / J. J. Hahn, A. C. Eschenlauer, M. H. Narrol, D. A. Somers, F. Srienc // *Biotechnology progress*. – 1997. – Vol. 13. – №. 4. – P. 347-354.
62. Horng Y. T. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed phaCAB and VGB genes controlled by arabinose PBAD promoter in *Escherichia coli* / Y. T. Horng, K. C. Chang, C. C. Chien, Y. H. Wei, Y. M. Sun, P. C. Soo // *Letters in applied microbiology*. – 2010. – Vol. 50. – №. 2. – P. 158-167.
63. Hou J. Haloarchaeal-type β -ketothiolases involved in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in *Haloferax mediterranei* / J. Hou, B. Feng, J. Han, H. Liu, D. Zhao, J. Zhou, H. Xiang // *Applied and environmental microbiology*. – 2013. – Vol. 79. – P. 5104-5111.
64. Howells E. R. Opportunities in Biotechnology for the chemical industry. Single-cell protein and related technology / E. R. Howells // *Chemical Industry*. – 1982. – Vol. 7. – P. 508-511.
65. Hrabak O. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate / O. Hrabak // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1992. – Vol 9. – №. 2-4. – P. 251-255.
66. Hufenus R. Biodegradable bicomponent fibers from renewable sources: melt-spinning of poly(lactic acid) and poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] / R. Hufenus, F. A. Reifler, K.

Maniura-Weber, A. Spierings, M, Zinn // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2012. – Vol. 297. – №. 1. – P. 75-84.

67. Huong K. H. Exploring the potential of 1-pentanol and oleic acid for optimizing the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 / K. H. Huong, K. Shantini, R. Sharmini, A. A. Amirul // *Arabian Journal for Science and Engineering*. – 2017. – Vol. 42. – P. 2313-2320.

68. Impallomeni G. Tween 20 and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 / G. Impallomeni, S. P. Guglielmino, S. Carnazza, A. Ferreri, A. Ballistreri // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2000. – Vol. 8. – P. 97-102.

69. Jendrossek D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate) / D. Jendrossek, D. Pfeiffer // *Environmental microbiology*. – 2014. – Vol. 16. – №. 8. – P. 2357-2373.

70. Kahar P. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain / P. Kahar, T. Tsuge, K. Taguchi, Y. Doi // *Polymer degradation and stability*. – 2004. – Vol. 83. – №. 1. – P. 79-86.

71. Kamei Y. Biosynthesis and biodegradability of copolythioesters from 3, 3'-thiodipropionic acid and plant oils by *Cupriavidus necator* / Y. Kamei, A. Nagai, H. Nishida, H. Kimura, T. Endo // *Macromolecular bioscience*. – 2007. – Vol. 7. – P. 364-372.

72. Kang C. K. Structure and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes latus* / C. K. Kang, S. Kusaka, Y. Doi // *Biotechnology letters*. – 1995. – Vol. 17. – P. 583-588.

73. Karst U. W. E. Mixotrophic capabilities of *Alcaligenes eutrophus* / U. W. E. Kärst, C. G. Friedrich // *Microbiology*. – 1984. – Vol. 130. – №. 8. – P. 1987-1994

74. Kavitha G. Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application / G. Kavitha, R. Rengasamy, D. Inbakandan // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – Vol. 111. – P. 102-108.

75. Kawada J. Physical properties of microbial polythioesters: characterization of poly(3-mercaptoalkanoates) synthesized by engineered *Escherichia coli* / J. Kawada, T. Lütke-Eversloh, A. Steinbüchel, R. H. Marchessault // *Biomacromolecules*. – 2003. – Vol. 4. – P. 1698-1702.

76. Kawaguchi Y. Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus* / Y. Kawaguchi, Y. Doi // *Macromolecules*. – 1992. – Vol. 25. – P. 2324-2329.

77. Kek Y. K. Efficient bioconversion of palm acid oil and palm kernel acid oil to poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* / Y. K. Kek, W. H. Lee, K. Sudesh // Canadian Journal of Chemistry. – 2008. – Vol. 86. – №. 6. – P. 533-539.
78. Khatami K. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? / K. Khatami, M. Perez-Zabaleta, I. Owusu-Agyeman, Z. Cetecioglu // Waste Management. – 2021. – Vol. 119. – P. 374-388.
79. Kim B. S. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer / B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, S. I. Woo // Enzyme and Microbial Technology. – 1994. – Vol. 16. – №. 7. – P. 556-561.
80. King P. P. Biotechnology. An industrial view / P. P. King // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 1982. – Vol. 32. – №. 1. – P. 308-310.
81. Koller M. Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms / M. Koller, I. Gasser, F. Schmid, G. Berg // Engineering in life sciences. – 2011. – Vol. 11. – №. 3. – P. 222-237.
82. Koller M. Polyhydroxyalkanoates—linking properties, applications, and end-of-life options / M. Koller, A. Mukherjee // Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. – 2020. – Vol. 34. – №. 3. – P. 115-129.
83. Koller M. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner / M. Koller, L. Marsalek, M. M. de Sousa Dias, G. Braunegg // New biotechnology. – 2017. – Vol. 37. – P. 24-38.
84. Kratky L. Economic feasibility and sensitivity analysis of fish waste processing biorefinery / L. Kratky, P. Zamazal // Journal of Cleaner Production. – 2020. – Vol. 243. – P. 118677.
85. Larrañaga A. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters / A. Larrañaga, E. Lizundia // European Polymer Journal. – 2019. – Vol. 121. – P. 109296.
86. Laycock B. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant // Progress in polymer science. – 2013. – Vol. 38. – №. 3-4. – P. 536-583.
87. Lee W. H. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors / W. H. Lee, C. Y. Loo, C. T. Nomura, K. Sudesh // Bioresource technology. – 2008. – Vol. 99. – №. 15. – P. 6844-6851.
88. Lee W. H. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans* / W. H. Lee, M. N. M. Azizan, K. Sudesh // Polymer Degradation and Stability. – 2004. – Vol. 84. – №. 1. – P. 129-134.

89. Lemoigne M. Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid / M. Lemoigne // Bulletin de la Société de chimie biologique. – 1926. – Vol. 8. – P. 770-782.
90. Liu S. J. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly(hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli* / S. J. Liu, A. Steinbüchel // Applied and environmental microbiology. – 2000. – Vol. 66. – №. 2. – P. 739-743.
91. Loan T. T. A fermentation process for the production of poly(3-hydroxybutyrate) using waste cooking oil or waste fish oil as inexpensive carbon substrate / T. T. Loan, D. T. Q. Trang, P. Q. Huy, P. X. Ninh, V. D. Thuoc // Biotechnology Reports. – 2022. – Vol. 33. – P. e00700.
92. Lu J. Characterization of an extracellular lipase and its chaperone from *Ralstonia eutropha* H16 / J. Lu, C. J. Brigham, C. K. Rha, A. J. Sinskey // Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – Vol. 97. – №. 6. – P. 2443-2454.
93. Lu X. Y. Sustained release of PI3K inhibitor from PHA nanoparticles and in vitro growth inhibition of cancer cell lines / X. Y. Lu, E. Ciralo, R. Stefenia, G. Q. Chen, Y. Zhang, E. Hirsch // Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – Vol. 89. – №. 5. – P. 1423-1433.
94. Lutke-Eversloh T. Characterization of microbial polythioesters: physical properties of novel copolymers synthesized by *Ralstonia eutropha* / T. Lütke-Eversloh, J. Kawada, R. H. Marchessault, A. Steinbüchel // Biomacromolecules. – 2002. – Vol. 3. – P. 159-166.
95. Lutke-Eversloh T. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages / T. Lutke-Eversloh, K. Bergander, H. Luftmann, A. Steinbüchel // Microbiology. – 2001. – Vol. 147. – P. 11-19.
96. Macrae R. M. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* / R. M. Macrae, J. F. Wilkinson // Microbiology. – 1958. – Vol. 19. – №. 1. – P. 210-222.
97. Maddikeri G. L. Adsorptive removal of saturated and unsaturated fatty acids using ion-exchange resins / G. L. Maddikeri, A. B. Pandit, P. R. Gogate // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2012. – Vol. 51. – №. 19. – P. 6869-6876.
98. Madison L. L. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic / L. L. Madison, G. W. Huisman // Microbiology and molecular biology reviews. – 1999. – Vol. 63. – №. 1. – P. 21-53.
99. Mahishi L. H. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources / L. H. Mahishi, G. Tripathi, S. K. Rawal // Microbiological research. – 2003. – Vol. 158. – №. 1. – P. 19-27.

100. Manoli M. T. Molecular basis of medium-chain length-PHA metabolism of *Pseudomonas putida* / M. T. Manoli, N. Tarazona, A. Mato, B. Maestro, J. M. Sanz, J. Nogales, M. A. Prieto // The Handbook of Polyhydroxyalkanoates / M. Koller. – CRC Press, 2020. – Chapter 4. – P. 89-114.
101. Martin D. P. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial / D. P. Martin, S. F. Williams // Biochemical engineering journal. – 2003. – Vol. 16. – №. 2. – P. 97-105.
102. Masood F., Yasin T., Hameed A. Polyhydroxyalkanoates—what are the uses? Current challenges and perspectives / F. Masood, T. Yasin, A. Hameed // Critical reviews in biotechnology. – 2015. – Vol. 35. – №. 4. – P. 514-521.
103. Mendonça T. T. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates / T. T. Mendonça, J. G. C. Gomez, E. Buffoni, R. J. S. Rodriguez, J. Schripsema, M. S. G. Lopes, L. F. Silva // Journal of applied microbiology. – 2014. – Vol. 116. – №. 4. – P. 815-829.
104. Mierziak J. 3-hydroxybutyrate as a metabolite and a signal molecule regulating processes of living organisms / J. Mierziak, M. Burgberger, W. Wojtasik // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11. – №. 3. – P. 402.
105. Mohapatra S. Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process / S. Mohapatra, B. Sarkar, D. P. Samantaray, A. Daware, S. Maity, S. Pattnaik, S. Bhattacharjee // Environmental technology. – 2017. – Vol. 38. – №. 24. – P. 3201-3208.
106. Możejko-Ciesielska J. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J. Możejko-Ciesielska, R. Kiewisz // Microbiological Research. – 2016. – Vol. 192. – P. 271-282.
107. Możejko-Ciesielska J. Polyhydroxyalkanoates synthesized by *Aeromonas species*: trends and challenges / J. Możejko-Ciesielska, P. Marciniak P, K. Szacherska // Polymers. – 2019. – Vol. 11. – №. 8. – P. 1328.
108. Muneer F. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): efficient replacement of synthetic polymers / F. Muneer, I. Rasul, F. Azeem, M. H. Siddique, M. Zubair, H. Nadeem // Journal of Polymers and the Environment. – 2020. – Vol. 28. – №. 9. – P. 2301-2323.
109. Muzaiyanah A. R. Studies on the microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates containing 4-hydroxyvalerate using γ -valerolactone / A. R. Muzaiyanah, A. A. Amirul // Applied biochemistry and biotechnology. – 2013. – Vol. 170. – P. 1194-1215.
110. Ng K. S. Evaluation of jatropha oil to produce poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16 / K. S. Ng, W. Y. Ooi, L. K. Goh, R. Shenbagarathai, K. Sudesh // Polymer degradation and stability. – 2010. – Vol. 95. – №. 8. – P. 1365-1369.
111. Nuti M. P. Polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and its significance in the fermentation process / M. P. Nuti, A. A. Lepidi // Proc Fourth International symposium on Yeasts, Part. – 1974. – Vol. 1. – P. 123-124.

112. Obruca S. Novel unexpected functions of PHA granules / S. Obruca, P. Sedlacek, E. Slaninova, I. Fritz, C. Daffert, K. Meixner, Z. Sedrlova, M. Koller // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2020. – Vol. 104. – №. 11. – P. 4795-4810.
113. Ojha N. A statistical approach to optimize the production of polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using response surface methodology / N. Ojha, N. Das // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – Vol. 107. – P. 2157-2170.
114. Oliveira-Filho E. R. *Burkholderia sacchari* (synonym *Paraburkholderia sacchari*): An industrial and versatile bacterial chassis for sustainable biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and other bioproducts / E. R. Oliveira-Filho, J. G. C. Gomez, M. K. Taciro, L. F. Silva // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 337. – P. 125472.
115. Palmeiro-Sánchez T. Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future / T. Palmeiro-Sánchez, V. O'Flaherty, P. N. L. Lens // *Journal of Biotechnology*. – 2022. – Vol. 348. – P. 10-25.
116. Park D. H. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil / D. H. Park, B. S. Kim // *New biotechnology*. – 2011. – Vol. 28. – №. 6. – P. 719-724.
117. Pavoncello V. Degradation of exogenous fatty acids in *Escherichia coli* / V. Pavoncello, F. Barras, E. Bouveret // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12. – №. 8. – P. 1019.
118. Pérez-Arauz A. O. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil / A. O. Pérez-Arauz, A. E. Aguilar-Rabiela, A. Vargas-Torres, A. I. Rodríguez-Hernández, N. Chavarría-Hernández, B. Vergara-Porras, M. R. López-Cuellar // *Food Packaging and Shelf Life*. – 2019. – Vol. 20. – P. 100297.
119. Philip S. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications / S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy // *Journal of chemical technology and biotechnology: International research in process, Environmental and clean technology*. – 2007. – Vol. 82. – №. 3. – P. 233-247.
120. Poirier Y. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants / Y. Poirier, C. Nawrath, C. Somerville // *Biotechnology*. – 1995. – Vol. 13. – №. 2. – P. 142-150.
121. Pool R. In Search of the Plastic Potato: Scientists in the emerging field of biopolymer engineering are aiming to produce bacteria and, eventually, food crops that are genetically tailored to yield a whole new breed of plastics / Pool R. // *Science*. – 1989. – Vol. 245. – №. 4923. – P. 1187-1189.
122. Povolo S. Poly(hydroxyalkanoate) production by *Cupriavidus necator* from fatty waste can be enhanced by phaZ1 inactivation / S. Povolo, M. Basaglia, F. Fontana, A. Morelli, S. Casella // *Chemical and biochemical engineering Quarterly*. – 2015. – Vol. 29. – №. 2. – P. 67-74.

123. Pradhan S. Production, characterization, and applications of biodegradable polymer: Polyhydroxyalkanoates / S. Pradhan, P. K. Dikshit, V. S. Moholkar // *Advances in Sustainable Polymers* / V. Katiyar, A. Kumar, N. Mulchandani. – Springer, Singapore, 2020. – Chapter 4. – P. 51-94.
124. Rahayu A. Production of copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) through a one-step cultivation process / A. Rahayu, Z. Zaleha, A. R. Yahya, M. I. Majid, A. A. Amirul // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 24. – P. 2403-2409.
125. Rai R. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future / R. Rai, T. Keshavarz, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, I. Roy // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2011. – Vol. 72. – №. 3. – P. 29-47.
126. Ramachandran H. Yellow-pigmented *Cupriavidus* sp., a novel bacterium capable of utilizing glycerine pitch for the sustainable production of P(3HB-co-4HB) / H. Ramachandran, A. A. Amirul // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 88. – №. 6. – P. 1030-1038.
127. Reinecke F. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers / F. Reinecke, A. Steinbüchel // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. – 2009. – Vol. 16. – №. 1-2. – P. 91-108
128. Renner G. Production of short-side-chain polyhydroxyalkanoates by various bacteria from the rRNA superfamily III / G. Renner, G. Haage, G. Braunnegg // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1996. – Vol. 46. – P. 268-272.
129. Riedel S. L. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats / S. L. Riedel, S. Jahns, S. Koenig, M. C. Bock, C. J. Brigham, J. Bader, U. Stahl // *Journal of biotechnology*. – 2015. – Vol. 214. – P. 119-127.
130. Riedel S. L. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations / S. L. Riedel, J. Bader, C. J. Brigham, C. F. Budde, Z. A. M. Yusof, C. Rha, A. J. Sinskey // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2012. – Vol. 109. – P. 74-83.
131. Riedel S. L. S. Production of polyhydroxyalkanoate from high cell density fermentations using palm oil and waste animal fats as carbon feedstocks and their recovery with non-halogenated solvents : diss. ... Doctor of Engineering : Scientific debate 8 February 2016 / S. L. S. Riedel. – Berlin, 2016.
132. Rivera-Briso A. L. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications / A. L. Rivera-Briso, A. Serrano-Aroca // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10. – P. 732.

133. Rodrigues P. R. Impact of different bacterial strains on the production, composition, and properties of novel polyhydroxyalkanoates using crude palm oil as substrate / P. R. Rodrigues, J. I. Druzian // Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. – 2018. – Vol. 32. – №. 1. – P. 141-150.
134. Romanelli M. G. Engineering *Delftia acidovorans* DSM39 to produce polyhydroxyalkanoates from slaughterhouse waste / M. G. Romanelli, S. Povolo, L. Favaro, F. Fontana, M. Basaglia, S. Casella // International journal of biological macromolecules. – 2014. – Vol. 71. – P. 21-27.
135. Sabirova J. S. Mutation in a “tesB-like” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2 / J. S. Sabirova, M. Ferrer, H. Lünsdorf, V. Wray, R. Kalscheuer, A. Steinbüchel, K. N. Timmis, P. N. Golyshin // Journal of bacteriology. – 2006. – Vol. 188. – №. 24. – P. 8452-8459.
136. Saito Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans* / Y. Saito, Y. Doi // International journal of biological macromolecules. – 1994. – Vol. 16. – №. 2. – P. 99-104.
137. Sangkharak K. Utilisation of tuna condensate waste from the canning industry as a novel substrate for polyhydroxyalkanoate production / K. Sangkharak, N. Paichid, T. Yunu, S. Klomklao, P. Prasertsan // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2021. – Vol. 11. – P. 2053-2064.
138. Sanhueza C. Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds / C. Sanhueza, F. Acevedo, S. Rocha, P. Villegas, M. Seeger, R. Navia // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 124. – P. 102-110.
139. Sathya A. B. Production of polyhydroxyalkanoates from renewable sources using bacteria / A. B. Sathya, V. Sivasubramanian, A. Santhiagu, C. Sebastian, R. Sivashankar // Journal of Polymers and the Environment. – 2018. – Vol. 26. – №. 9. – P. 3995-4012.
140. Schlegel H.G. A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies / H.G. Schlegel, H. Kaltwasser, G. Gottschalk // Arch. Microbiol. – 1961. – Vol. 38. – P. 209-222.
141. Schneider A. L. S. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) produced from *Cupriavidus necator* with different concentrations of oleic acid as nutritional supplement / A. L. S. Schneider, D. D. Silva, M. C. F. Garcia, V. H. Grigull, L. P. Mazur, S. A. Furlan, A. P. T. Pezzin // Journal of Polymers and the Environment. – 2010. – Vol. 18. – P. 401-406.
142. Shimamura E. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) / E. Shimamura, K. Kasuya, G. Kobayashi, T. Shiotani, Y. Shima, Y. Doi // Macromolecules. – 1994. – Vol. 27. – №. 3. – P. 878-880.

143. Sierra G. Production of poly- β -hydroxybutyric acid granules in *Micrococcus halodenitrificans* / G. Sierra, N. E. Gibbons // Canadian Journal of Microbiology. – 1962. – Vol. 8. – №. 2. – P. 249-253.
144. Sirohi R. Applications of poly-3-hydroxybutyrate based composite / R. Sirohi, J. P. Pandey, A. Tarafdar, R. Sindhu, P. Binod, A. Pandey // Advanced Applications of Bio-degradable Green Composites / Al-Ahmed, I. Inamuddin. – Materials Research Forum LLC, 2020. – Vol. 68. – P. 45.
145. Soltani M. Effects of hydrocarbon structure on fatty acid, fatty alcohol, and β -hydroxy acid composition in the hydrocarbon-degrading bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* / M. Soltani, P. Metzger, C. Largeau // Lipids. – 2004. – Vol. 39. – №. 5. – P. 491-505.
146. Steinbüchel A. Bacterial and other biological systems for polyester production / A. Steinbüchel, B. Fuchtenbusch // Trends in biotechnology. – 1998. – Vol. 16. – №. 10. – P. 419-427.
147. Stubbe J. A. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm / J. A. Stubbe, J. Tian, A. He, A. J. Sinskey, A. G. Lawrence, P. Liu // Annual Review of Biochemistry. – 2005. – Vol. 74. – P. 433-480.
148. Sudesh K. Bio-Based and biodegradable polymers // Polyhydroxyalkanoates from Palm Oil: Biodegradable Plastics / K. Sudesh. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. – P. 3-36.
149. Sudesh K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Progress in polymer science. – 2000. – Vol. 25. – №. 10. – P. 1503-1555.
150. Taidi B. Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus* / B. Taidi, A. J. Anderson, E. A. Dawes, D. Byrom // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1994. – Vol. 40. – P. 786-790.
151. Takaç S. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* / S. Takaç, B. Marul // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 35. – №. 9. – P. 1019-1025.
152. Tan I. K. P. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1 / I. K. P. Tan, K. S. Kumar, M. Theanmalar, S. N. Gan, B. G. Iii // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1997. – Vol. 47. – P. 207-211.
153. Tanadchangsang N. Miscibility of natural polyhydroxyalkanoate blend with controllable material properties / N. Tanadchangsang, J. Yu // Journal of applied polymer science. – 2013. – Vol. 129. – №. 4. – P. 2004-2016.

154. Tanadchangsang N. Structure, chemomechanical properties and degradability of polyhydroxyalkanoates: A review / N. Tanadchangsang // Bulletin of Science, Technology and Society– 2014. – Vol. 12. – P. 9-21.
155. Tanaka S. Comparative study of effects of thio/oxo ester linkages on thermal properties of bacterial poly[3-hydroxybutyrate-co-3-(mercapto/hydroxy)propionate]s / S. Tanaka, L. Feng, Y. Inoue // Polymer journal. – 2004. – Vol. 36. – P. 570-573.
156. Thompson J. P. Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria / J. P. Thompson, V. B. D. Skerman. – Academic Press Inc., London, 1979. – 417 pp.
157. Thuoc D. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 / D. Thuoc, J. Quillaguamán, G. Mamo, B. Mattiasson // Journal of applied microbiology. – 2008. – Vol. 104. – №. 2. – P. 420-428.
158. Thuoc D. Utilization of waste fish oil and glycerol as carbon sources for polyhydroxyalkanoate production by *Salinivibrio* sp. M318 / V. D. Thuoc, D. N. My, T. T. Loan, K. Sudesh // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 141. – P. 885-892.
159. Thuoc D. V. Bioconversion of crude fish Oil into poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia* sp. M91 / D. V. Thuoc, V. T. M. Anh // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2021. – Vol. 57. – P. 219-225.
160. Tombolini R. Poly(β -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species / R. Tombolini, M. P. Nuti // FEMS microbiology letters. – 1989. – Vol. 60. – №. 3. – P. 299-304.
161. Tsuge T. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis / T. Tsuge // Polymer journal. – 2016. – Vol. 48. – №. 11. – P. 1051-1057.
162. Valappil S. P. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. / S. P. Valappil, D. Peiris, G. J. Langley, J. M. Herniman, A. R. Boccaccini, C. Bucke, I. Roy // Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 127. – №. 3. – P. 475-487.
163. Valentin H. E. Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria / H. E. Valentin, A. Schönebaum, A. Steinbüchel // Applied microbiology and biotechnology. – 1992. – Vol. 36. – P. 507-514.
164. Verlinden R. A. J. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates / R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, I. Radecka // Journal of applied microbiology. – 2007. – Vol. 102. – №. 6. – P. 1437-1449.

165. 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.
166. 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. – 2025a. – Vol. 13. – №. 3. – P. 413.
167. Volova T. Properties of degradable polyhydroxyalkanoates with different monomer compositions / T. Volova, E. Kiselev, I. Nemtsev, A. Lukyanenko, A. Sukovaty, A. Kuzmin, G. Ryltseva, E. Shishatskaya // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 182. – P. 98-114.
168. 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. – 2025b. – Vol. 17. – №. 16. – P. 2171.
169. Wallen L. L. Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge / L. L. Wallen, W. K. Rohwedder // Environmental science and technology. – 1974. – Vol. 8. – №. 6. – P. 576-579.
170. Wang Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application / Q. Wang, H. Yu, Y. Xia, Z. Kang, Q. Qi // Microbial cell factories. – 2009. – Vol. 8. – №. 1. – P. 1-9.
171. Wang Y. Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha* / Y. Wang, R. Chen, J. Cai, Z. Liu, Y. Zheng, H. Wang, N. He // PloS one. – 2013. – Vol. 8. – P. e60318.
172. Wang Y. Polyhydroxyalkanoates: sustainability, production, and industrialization / Y. Wang, G. Q. Chen // Sustainable polymers from biomass / C. Tang, C. Y. Ryu. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. – Chapter 2. – P. 11-33.
173. Williams D. F. On the mechanisms of biocompatibility / D. F. Williams // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – №. 20. – P. 2941-2953.
174. Wong Y. M. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator* / Y. M. Wong, C. J. Brigham, C. Rha, A. J. Sinskey, K. Sudesh // Bioresource Technology. – 2012. – Vol. 121. – P. 320-327.
175. Yamane T. Yield of poly-D (-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study / T. Yamane // Biotechnology and bioengineering. – 1993. – Vol. 41. – №. 1. – P. 165-170.

176. Yousuf R. G. Waste date seed oil extract as an alternative feedstock for Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis / R. G. Yousuf, J. B. Winterburn // Biochemical Engineering Journal. – 2017. – Vol. 127. – P. 68-76.
177. Zhang X. Synthetic biology and genome-editing tools for improving PHA metabolic engineering / X. Zhang, Y. Lin, Q. Wu, Y. Wang, G. Q. Chen // Trends in biotechnology. – 2020. – Vol. 38. – №. 7. – P. 689-700.
178. Zhila N. Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources / N. Zhila, G. Kalacheva, T. Volova // Process Biochemistry. – 2015. – Vol. 50. – №. 1. – P. 69-78.
179. Zhila N. O. Biosynthesis and Properties of a P (3HB-co-3HV-co-4HV) Produced by *Cupriavidus necator* B-10646 / N. O. Zhila, K. Y. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, I. V. Nemtsev, A. V. Lukyanenko, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Polymers. – 2022. – Vol. 14. – №. 19. – P. 4226.
180. Zhila N. O. Biosynthesis and Properties of Sulfur-Containing Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Produced by Wild-Type Strain *Cupriavidus necator* B-10646 / N. O. Zhila, K. Y. Sapozhnikova, A. V. Berezovskaya, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, A. D. Vasiliev, T. G. Volova // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – P. 1005.
181. 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. Y. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Processes. – 2023. – Vol. 11. – №. 5. – P. 1423.
182. Zhila N. O. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Cupriavidus necator* B-10646 on saturated fatty acids / N. O. Zhila, K. Y. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Polymers. – 2024. – Vol. 16. – №. 9. – P. 1294.
183. 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 // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – P. 14919.
184. Zhila N. O. Synthesis and properties of polyhydroxyalkanoates on waste fish oil from the production of canned sprats / N. O. Zhila, K. Y. Sapozhnikova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // Processes. – 2023a. – Vol. 11. – P. 2113.