

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
_____ Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
«_____» июня 2024г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на
жиросодержащих пищевых отходах

Научный руководитель _____
Подпись, дата

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

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник _____
Подпись, дата

Е.Г. Цыденова
инициалы, фамилия

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на жиросодержащих пищевых отходах» содержит 47 страниц текстового документа, 14 иллюстраций, 2 таблицы и 56 использованных источников.

Ключевые слова: полимер, полигидроксиалканоаты, ПГА, 3-гидроксипропанат, 3-гидроксивалерат, 3-гидроксигексаноат, отходы, рыбий жир, *Cupriavidus necator*.

Актуальность работы: использование отходов рыбоперерабатывающей деятельности для синтеза ПГА, благодаря чему происходит снижение нагрузки на экосистему и использование невостребованных отходов в качестве экономически выгодного субстрата.

Целью данной работы было исследование роста бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтеза полигидроксиалканоатов на жиросодержащих отходах рыбной промышленности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать жирнокислотный состав образцов жира из голов копченой кильки, внутренностей судака и голов скумбрии.
2. Оценить способность штамма *C. necator* В-10646 к росту и синтезу ПГА при использовании в качестве углеродных субстратов рыбных жиров.
3. Подобрать наиболее оптимальные условия, обеспечивающие высокие выходы биомассы бактерий и ПГА
4. Исследовать физико-химические свойства синтезированных ПГА.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1 Общая характеристика полигидроксиалканоатов	7
1.2 Классификация и структура ПГА.....	8
1.3 Продуценты ПГА	10
1.4 Синтез ПГА.....	11
1.5 Свойства ПГА.....	14
1.6 Субстраты для синтеза ПГА	15
Глава 2. Материалы и методы.....	21
2.1 Бактериальный штамм, состав питательной среды и условия роста.....	21
2.2 Получение инокулята	22
2.3 Регистрация параметров культивирования	22
2.4 Выделение полимера	23
2.4.1 Измерение внутриклеточного содержания и определение мономерного состава полимера.....	23
2.5 Определения жирнокислотного состава жира	24
2.6 Исследование физико-химических свойств ПГА	24
2.7 Статистическая обработка данных.....	25
Глава 3. Результаты.....	25
3.1 Рост бактерий <i>C. necator</i> В-10646 и синтез ПГА при использовании в качестве С-субстрата жиров рыбоперерабатывающей промышленности.....	26

3.2 Состав и свойства полученных ПГА.....	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	42
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

Коммерчески доступные полимерные изделия оказали большое влияние на современную цивилизацию благодаря своей универсальности и низкой стоимости. Глобальный объем выпуска искусственных пластмасс достиг отметки в 400 миллионов тонн, данное значение ежегодно увеличивается. По прогнозу ожидается, что к 2050 году оно достигнет отметки в 1 миллион тонн в год. Накопление отходов из пластика, произведенного на основе невозобновляемых источников, создает серьезную угрозу для окружающей среды на глобальном уровне. Решение проблемы пластиковых отходов связано с необходимостью их вторичной переработки, хотя это и сопряжено с значительными затратами.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой биоразлагаемые полимеры, которые могут стать одним из ключевых решений проблемы загрязнения пластиком. Эти полимеры синтезируются микроорганизмами в качестве запасного питательного вещества и могут служить альтернативой традиционным пластикам, получаемым из нефти. Для того чтобы ПГА стали более доступными и нашли широкое применение, необходимо сократить расходы на их производство, опираясь на использование более дешевого углеродного сырья. Одним из перспективных направлений в производстве ПГА является использование отходов пищевой промышленности. Это не только способствует снижению затрат на производство ПГА, но и является экологически ответственным подходом, поскольку позволяет утилизировать отходы. Отсутствие эффективных методов обработки обширных объемов жирных отходов является значительной проблемой в пищевой индустрии. Оценки ученых указывают, что ежегодно в мире производится приблизительно 29 миллионов тонн таких отходов, включая жирные кислоты, масла низкого качества как растительного, так и животного происхождения, а также продукты, образующиеся в ходе их переработки. Проблема утилизации жиросодержащих отходов актуальна, в частности, для рыбоперерабатывающей промышленности. В настоящее время не реализуется полный потенциал использования рыбных

отходов. Согласно оценкам ученых, содержание жиросодержащих отходов составляет до 60 % от объема рыбных субпродуктов. Поэтому необходимо обеспечить переработку этих побочных продуктов или их безопасную утилизацию для предотвращения негативного воздействия на окружающую среду. Одним из решений является использование данных отходов в различных биотехнологических процессах, в том числе в производстве ПГА. Однако, это относительно новый и еще недостаточно изученный источник углерода и на данный момент имеется небольшое количество работ, посвященных этой теме.

Целью данной работы было исследование роста бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтеза полигидроксиалканоатов на жиросодержащих отходах рыбной промышленности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать жирнокислотный состав образцов жира из голов копченой кильки, внутренностей судака и голов скумбрии.
2. Оценить способность штамма *C. necator* В-10646 к росту и синтезу ПГА при использовании в качестве углеродных субстратов рыбных жиров.
3. Исследовать влияние условий культивирования на выходы биомассы бактерий и ПГА
4. Исследовать физико-химические свойства синтезированных ПГА.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Общая характеристика полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это биологически разлагаемые полимеры, которые синтезируются различными микроорганизмами внутриклеточно в гранулярной форме, чаще всего в условиях стресса – например, при дефиците азота или фосфора и при избыточном содержании углеродного субстрата в среде [1]. Молекулярная масса ПГА варьируется в широких пределах, в зависимости от продуцента, условий культивирования, используемых субстратов и находится в пределах 50-1000 кДа [2].

В 1888 году М. Бейеринк впервые наблюдал включения ПГА в бактериальных клетках, но не смог определить их природу и функцию. Спустя 35 лет, в 1927 году, французский ученый Лемуан добился успеха в получении поли(3-гидроксибутирата) (П(ЗГБ)) из *Bacillus megaterium*. Макрэй и Уилкинсон в 1958 году установили, что ПГА в бактериальных клетках выполняют роль запасного источника углерода и энергии (накопленные ПГА деполимеризуются внутри клеток при наступлении неблагоприятных условий [3]), и синтезируются чаще всего при повышенном соотношении углерода к азоту [4]. Позже были открыты и изучены множество различных типов ПГА, в том числе и сополимеры, но, традиционно, именно (П(ЗГБ)) считается наиболее изученным и коммерчески производимым типом ПГА в настоящее время.

Научное сообщество изучает различные природные и синтетические полимерные материалы для биомедицинских, специализированных инженерных и экологических применений. Материалы на основе полигидроксиалканоатов, нетоксичные, биоразлагаемые и биосовместимые по своей природе, часто рассматриваются для разработки носителей лекарств нового поколения и систем восстановления тканей, а возможность настраивать биологические свойства путем смешивания их с добавками и другими типами полимеров открывает множество перспектив. Однако, несмотря на эти многообещающие свойства только несколько типов ПГА производятся в больших масштабах, но с

ограниченным успехом на рынке: поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)), поли(4-гидроксибутират) (П(4ГБ)) и сополимеры на их основе – поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) (П(ЗГБ-*co*-4ГБ)) [5, 6].

Важно отметить, что ПГА являются экологически чистыми материалами [7]. Они производятся из возобновляемых ресурсов, что не приводит к исчерпанию энергетических запасов. Поэтому, эти биоматериалы являются неотъемлемой частью замкнутого углеродного цикла нашей планеты. Это кардинально отличает их от процессов жизненного цикла нефтехимических пластмасс, при котором термическая деструкция приводит к нарушению баланса углекислого газа в результате сжигания [8].

1.2 Классификация и структура ПГА

Полигидроксиалканоаты образуют различные группы, в зависимости от того сколько атомов углерода содержится в их мономерах.:

- Короткоцепочечные (scl-ПГА) – они содержат от трёх до пяти атомов углерода в мономере.
- Среднецепочечные (mcl-ПГА) – имеют в своем составе от шести до четырнадцати атомов углерода в мономере.
- Длинноцепочечные (lcl-ПГА) – включают в себя полимеры с пятнадцатью и более атомами углерода в мономере.

В зависимости от числа мономеров, образующих полимер, ПГА можно классифицировать на две группы: гомополимеры и сополимеры (или же гетерополимеры). Гомополимеры состоят из одного типа мономера, в то время как сополимеры построены из различных типов мономеров [9].

Общая структурная формула ПГА представлена на рисунке 1.

Поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) – наиболее распространенный представитель группы scl-ПГА, является наиболее изученным и широко используемым представителем семейства ПГА, который состоит из повторяющихся мономеров 3-гидроксимасляной кислоты. П(ЗГБ) характеризуется высокой кристалличностью, термопластичностью и

выраженной хрупкостью. Кристалличность и хрупкость scl-ПГА можно уменьшить путем введения дополнительных мономеров в матрицу (П(ЗГБ), например, 3-гидроксивалерат (ЗГВ) или 4-гидроксибутират (4ГБ), в результате чего получатся сополимеры: поли(3-гидроксибутират-co-3-гидроксивалерат) (П(ЗГБ-co-ЗГВ)) и поли(3-гидроксибутират-co-4-гидроксибутират) (П(ЗГБ-co-4ГБ)), соответственно. П(ЗГБ) используется в реконструктивной медицине для создания имплантов [10]

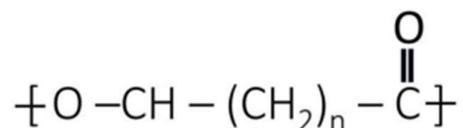


Рисунок 1 – Общая структурная формула ПГА

На рисунке 2 представлены структурные формулы различных типов ПГА.

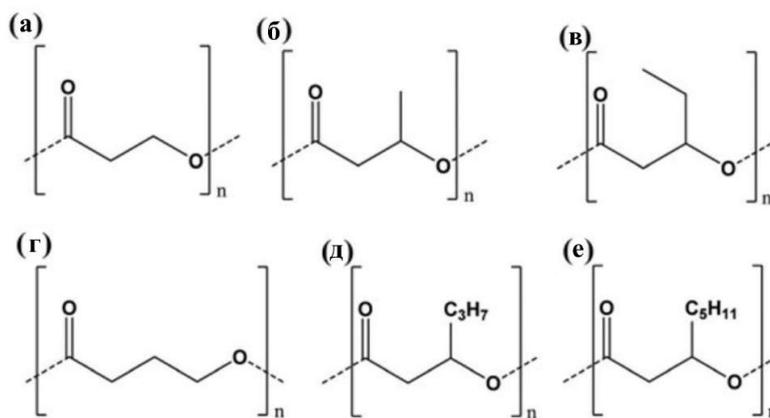


Рисунок 2 – Химическая структура: (а) 3-гидроксипропионат (ЗГП), (б) 3-гидроксибутират (ЗГБ), (в) 3-гидроксивалерат (ЗГВ), (г) 4-гидроксибутират (4ГБ), (д) 3-гидроксигексаноат (ЗГГ), (е) 3-гидроксиоктаноат (ЗГО)

Среднецепочечные ПГА в большинстве случаев являются гетерополимерами различных случайно распределенных гидроксиалканоатов. По большей части, они синтезируются грамотрицательными бактериями рода

Pseudomonas. В отличие от с scl-ПГА, mcl-ПГА обладают более низкими степенью кристалличности и температурой стеклования [21].

1.3 Продуценты ПГА

ПГА могут быть синтезированы многими живыми организмами, в том числе и растениями. Однако у последних содержание ПГА составляет меньше 10 % от сухой биомассы, тогда как у бактерий оно достигает 90 %. Также высокое содержание полимера (10-40 % сухого веса) в растениях негативно влияет на рост и развитие самого растения [11]. Синтез ПГА с использованием бактериальных культур является экономически эффективным и выгодным методом. На данный момент ПГА могут синтезироваться как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями, и существует около 300 известных штаммов продуцентов. К ним относятся такие виды, как *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Methylobacterium sp.* [12], Эти продуценты включают в себя как природные штаммы, так и генетически модифицированные варианты, что расширяет возможности для производства ПГА.

Cupriavidus necator (прежние таксономические названия – *Hydrogenomonas eutrophus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*) является достаточно хорошо изученным штаммом для синтеза разных типов ПГА, среди которых (П(ЗГБ-co-4ГБ)), (П(ЗГБ-co-3ГВ)) и др. Данные бактерии обладают способностью синтезировать ПГА с использованием широкого спектра углеродных субстратов различной химической природы, в том числе отходов сельскохозяйственных и промышленных производств [9, 13]. Другие бактерии, такие как *Azohydromonas latu*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* и рекомбинантная *Escherichia coli* также используются для получения (П(ЗГВ) и (П(ЗГБ-co-3ГВ)).

Синтез ПГА рекомбинантной *E. coli* происходит при помощи гетерологической экспрессии необходимых генов биосинтеза (П(ЗГБ)) при соответствующих условиях культивирования [14].

Среди экстремофильных архей, были изучены *Haloferax mediterranei* или *Halogeometricum borinquense*, которые способны к синтезу сополимеров ЗГБ и ЗГВ из простых, структурно несвязанных субстратов, таких как углеводы и глицерин. В отношении эубактерий известно, что синтез сополиэфиров ПГА из несвязанных субстратов является дефицитной особенностью: так, например, для штамма *Bacillus licheniformis* [15] показан синтез (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)) (в качестве субстрата были использованы отходы биодизельной промышленности), а для грамотрицательного штамма *Hydrogenophaga pseudoflava* [16] – синтез (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)) (культивирование *H. pseudoflava* было выполнено на сахарозе, лактозе и сыворотке без добавления предшественников) [19].

1.4 Синтез ПГА

Наиболее изученным таксоном бактерий, способных к синтезу ПГА являются бактерии *C. necator*. Ареал их распространения достаточно широк и включает как почвенные, так и водные экосистемы. В результате данный вид бактерий хорошо адаптирован к постоянным изменениям окружающей среды и может использовать широкий спектр органических кислот, спиртов и полиолов для своего хемогетеротрофного роста [17]. Несмотря на то, что известно множество различных субстратов, используемых в качестве источника углерода, сахара остаются основным углеродным субстратом для микробных ферментаций. Как показано на рисунке 3, ацетил-КоА, в качестве предшественника П(ЗГБ), образуется в пути Энтнера -Дудорова [18]. Биосинтетический путь (П(ЗГБ)) состоит из трех ферментативных реакций, катализируемых тремя различными ферментами: β -кетотиолаза (кодируемая геном *phaA*), которая запускает синтез полимера; ацетоацетил-КоА-редуктаза (*phaB*) – регулирует скорость синтеза (П(ЗГБ)); ПГБ-полимераза (синтаза) (*phaC*) – отвечает за конечный выход (П(ЗГБ)) и качественные характеристики полимера, такие как молекулярный вес и мономерный состав.

Все три гена *phaA*, *phaB*, *phaC* кодируются одним опероном (*phaCAB*) (рисунок 4) [2].

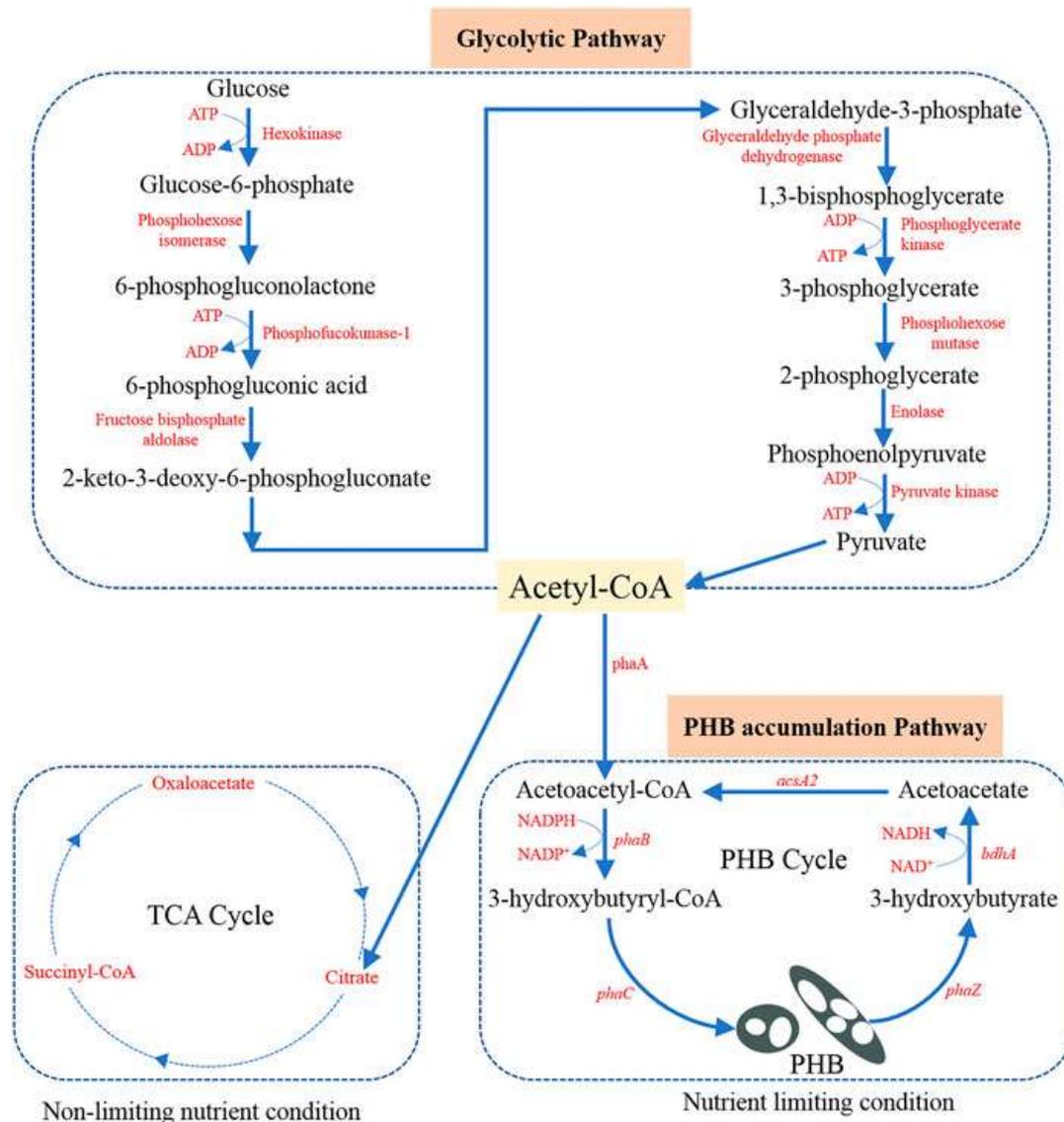


Рисунок 3 – Схема метаболического пути *C. necator*

Процесс начинается с конденсации, в ходе которой две молекулы ацетил-КоА при участии β -кетиолазы (*phaA*) объединяются и образуют ацетоацетил-КоА. Затем, с помощью НАДФН-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазы (*phaB*), ацетоацетил-КоА восстанавливается. Финальной реакцией является полимеризация мономеров 3-гидроксибутирил-КоА в полимер (П(ЗГБ)) под действием ПГБ-полимеразы (*phaC*) [19]. Исследования показали, что *C. necator* синтезирует ПГА, используя короткоцепочечные мономеры, содержащие 3-5

атомов углерода. В то же время, *Pseudomonas putida* использует среднецепочечные мономеры с 6-14 атомами углерода для производства ПГА. [20].

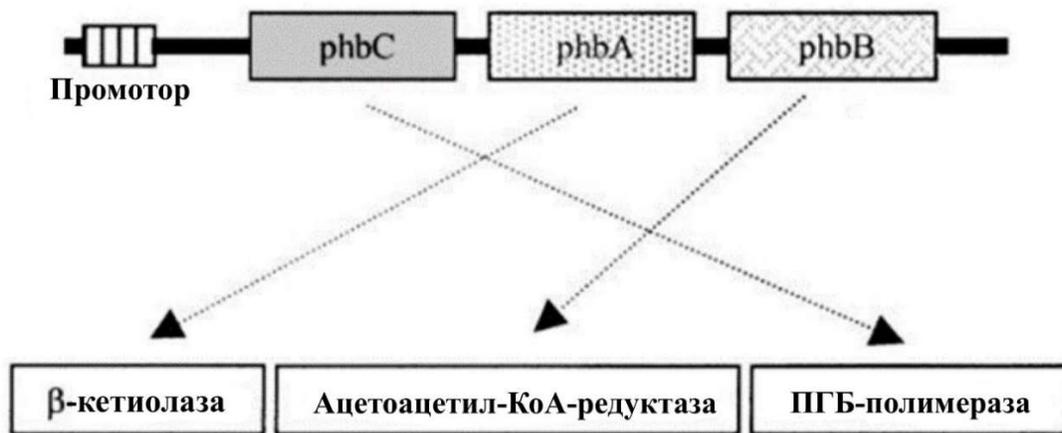


Рисунок 4 – Схема оперона *phaCAB*

Как упоминалось выше, недостаток азота и фосфора способствует накоплению ПГА и приводит к его более высокому содержанию на единицу сухой биомассы клеток. Основная метаболическая причина заключается в том, что недостаток азота способствует регенерации НАДФН, который является кофактором фермента *phaB*.

При сбалансированной подаче питательных веществ ацетил-КоА вступает в цикл трикарбоновых кислот/цикл Кребса. При преобразовании ацетил-КоА в цитрат высвобождается свободный КоА, который может подавлять действие фермента *phaA* в высоких концентрациях. В несбалансированных условиях выработка свободных молекул КоА подавляется, и тогда метаболизм способствует синтезу (П(ЗГБ)). Таким образом, общепринятым методом, способствующим получению (П(ЗГБ)), является ограничение содержания азота, что означает избыток источника углерода и ограниченное поступление азота.

После синтеза (П(ЗГБ)) в микроорганизмах может произойти его внутриклеточная деградация. Синтез и деполимеризация (П(ЗГБ)) образуют циклическую связь (рисунок 3). Фермент ПГА-деполимераза (*phaZ*) помогает

разорвать полимерную связь в (П(ЗГБ)) и приводит к образованию 3-гидроксibuтирата. Затем НАДН-зависимая дегидрогеназа (кодируемая геном *bdhA*) активирует окисление 3-гидроксibuтирата с образованием ацетоацетата. Наконец, синтетаза (кодируемая геном *acsA2*) позволяет снова получить ацетоацетил-КоА для повторного использования в синтезе (П(ЗГБ)) [21].

1.5 Свойства ПГА

Как правило, полимеры характеризуются такими параметрами как гидрофобность, температура плавления, температура стеклования и степень кристалличности. Семейство ПГА обладает широким спектром механических свойств – от твердых кристаллических до упругих [22], оптической активностью и изотактичностью, пьезоэлектрическим эффектом, высокой степенью полимеризации и кристалличности [2].

Молекулярная масса полигидроксиалканоатов позволяет им иметь характеристики, сравнимые с термопластическими материалами. Долговечность, стабильность и гибкость ПГА и обычных термопластиков схожи [23]. Характеристики короткоцепочечных ПГА близки к обычным пластикам благодаря своим физико-механическим свойствам [24]. Они имеют кристаллическую природу и обычно представляют собой жесткие, твердые структуры. Среднецепочечные ПГА обладают эластомерными, адгезионными свойствами и представляют собой аморфные термопластики с различной степенью кристалличности [25].

Физические и химические свойства зависят от мономерного состава ПГА, продуцентов и их питания [26]. Благодаря многочисленным структурным и механическим особенностям, которыми обладают ПГА, они находят применение в различных областях: пищевой продукции, медицине, сельском хозяйстве, нанотехнологиях [27, 28].

Как упоминалось выше, самое важное свойство ПГА заключается в том, что они не загрязняют окружающую среду, как это делают обычные пластмассы, производимые из нефти. ПГА разлагаются при контакте с почвой, компостом

или морскими отложениями. Биодegradация зависит от ряда факторов, таких как микробиологическая активность окружающей среды, площадь поверхности, влажность, температура, рН, молекулярная масса. Природа мономерных звеньев также влияет на деградацию биополимера. Микроорганизмы выделяют ферменты (ПГА-деполимераза), которые расщепляют полимер на гидроксикислоты, которые используются в качестве питательной среды (углерода) для роста бактерий. Исследования показали, что 85 % ПГА разлагаются за 7 недель [29]. Также сообщалось, что ПГА разлагаются и в водной среде в течение 254 дней даже при температуре не выше 6°C [30].

Это делает ПГА исключительным материалом со свойствами, аналогичными коммерчески доступным синтетическим пластмассам. Тем не менее, основным ограничением ПГА является высокая стоимость производства, где большая часть затрат (до 30-40 %) приходится на стоимость субстрата для роста бактериальных штаммов и синтеза полимера [31, 32].

1.6 Субстраты для синтеза ПГА

Высокая стоимость производства ПГА связана с субстратами, на долю которых приходится 30-40 % от общих производственных затрат [33]. Проведено множество исследований по синтезу ПГА из дешевых субстратов, таких как различные отходы пищевой промышленности и сточные воды. Штамм *Pseudomonas putida* КТ2440 может быть выращен на ароматических соединениях, полученных из лигнина, в качестве источника углерода, поскольку этот штамм имеет пути разложения ароматических веществ, ведущие к синтезу среднецепочечных ПГА [34]. Используя рекомбинантный штамм *R. eutropha* и жиры животных отходов в качестве источника углерода, ученые получили (П(ЗГБ-*co*-ЗГГ)) с выходом полимера 49-72 % от веса сухой биомассы [35]. *P. putida* СА-3 способен использовать стирол, исходный материал для синтеза полистирола и основной токсичный загрязнитель окружающей среды, для накопления алифатических ПГА [36]. Фотосинтезирующая бактерия

Rhodospirillum rubrum S1 может накапливать короткоцепочечный ПГА из синтез-газа (CO₂+CO) [37].

Японские ученые использовали пропаренные сточные воды сои в качестве источника азота и/или углерода для рекомбинантного штамма *Pseudomonas sp.* 61-3, продуцирующего (П(ЗГБ)) и (П(ЗГБ-*co*-ЗГА)). Соевые бобы широко распространены в японской кухне, из-за чего образуются сточные воды, утилизация, которых является важной задачей. Поэтому, использование сточных вод сои для синтеза ПГА делает производство безотходным [38].

В последние годы пищевые отходы стали серьезной проблемой для глобальной продовольственной безопасности и достижения целей устойчивого развития, заявленных Организацией Объединенных Наций [39]. Кроме того, потеря продовольствия также приводит к потере других ресурсов, таких как энергия и рабочая сила, используемых в цепочке поставок. Ежегодно около трети производимых продуктов питания пропадает впустую [40]. Использование пищевых отходов для производства ПГА может эффективно снизить общую себестоимость производства и в тоже время решить экологические проблемы, возникающие из-за постоянно растущей проблемы пищевых отходов. Например, корни цикория, которые широко используются в пищевой промышленности Испании, сначала были гидролизованы, а затем использованы в качестве субстрата для трех штаммов, продуцирующих (П(ЗГБ)) – *C. necator* DSM 428, DSM 531 и DSM 545. Результаты показали, что была достигнута концентрация сухой биомассы 3,5–14,0 г/л и содержание полимера составило 46-78 % от веса сухой биомассы [41]. Летучие жирные кислоты, полученные из молочных отходов, были успешно использованы в качестве углеродного источника для накопления (П(ЗГБ)) у штамма *C. necator* DSM 13513 [42].

Меласса, которая представляет собой вязкий осадок, образующийся в процессе кристаллизации сахара в сахарной промышленности, является широкодоступным источником отходов в связи с неуклонным развитием мировой сахарной промышленности. Благодаря высокому содержанию сахарозы с небольшим количеством глюкозы и фруктозы, меласса используется в качестве

дешевого источника углерода в процессе ферментации для производства биотоплива и биополимеров [43]. Показано, что генетически модифицированный штамм *C. necator* ATCC 25207, способен использовать мелассу в качестве источника углерода с выходами по биомассе до 15,28 г/л при внутриклеточном содержании полимера – 52,89 % [44].

Крахмал широко распространен в растениях и может быть потенциально дешевым источником углерода для роста микроорганизмов. Однако из-за сложной структуры крахмала его использование в качестве источника питательных веществ ограничено и обычно требует дополнительной предварительной обработки – гидролиза для расщепления сложного крахмала на отдельные глюкозные единицы. Сообщалось, что хлебопекарные отходы, разновидность пищевых отходов, богатых крахмалом, были успешно задействованы в качестве источника углерода для производства (П(ЗГБ)) [45]. Например, были использованы отходы картофельного крахмала в качестве источника углерода для роста *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 и производства (П(ЗГБ)). Это позволило получить 179,0 г/л биомассы с содержанием полимера 53 % [46].

Пищевые отходы, богатые липидами, в том числе растительные масла и животные жиры, содержат большое количество жирных кислот. Это делает их пригодными для производства ПГА, поскольку жирные кислоты способны давать больше энергии в качестве источника углерода по сравнению с обычно используемым глюкозным субстратом [47]. По сравнению с полным окислением глюкозы в процессе метаболизма, жирные кислоты подвергаются полному β -окислению, которое способно генерировать больше АТФ и больше молекул ацетил-КоА, что приводит к более полному превращению субстрата в (П(ЗГБ)) [48].

Отработанные растительные масла подвергаются высокотемпературной обработке в процессе жарки или варки, что делает их непригодными для использования в качестве корма для животных из-за токсичных соединений, образующихся при высоких температурах, но позволяет использовать их

непосредственно для получения (П(ЗГБ)) [49]. Так, в 2013 году Обрука и др. использовали отработанное кунжутное масло в качестве единственного источника углерода для *C. necator* H16. Концентрация биомассы составила 7,9 г/л и содержание полимера в 62 % [50]. Однако, без дополнительных процессов, таких как сбор и разделение, отработанные масла обычно существуют в виде смеси, а не содержат только один тип масла. Круз и др. (2015 год) начали изучать производство (П(ЗГБ)) с использованием смешанных отходов растительного масла и получили относительно высокий выход биомассы - 11,6 г/л при содержании полимера 63 % [51]. В отличие от растительного масла, отработанный животный жир содержит большое количество насыщенных жирных кислот и обычно находится в твердом виде при комнатной температуре, что требует дополнительной обработки, такой как эмульгирование. Такие ограничения препятствуют использованию животного жира как источника углерода при производстве ПГА. Однако, жиросодержащие отходы рыбоперерабатывающей отрасли могут быть новым источником углеродного сырья для биотехнологических процессов. Жиросодержащие отходы составляют до 60 % образуемых рыбных субпродуктов [52]. Рыбоперерабатывающая промышленность производит больше 20 миллионов тонн в год, что составляет 25 % от общего объема вылова морских рыб. Это означает, что ежегодно можно получить большое количество возобновляемого жиросодержащего сырья, чтобы создать целевые продукты биотехнологии с высокой добавленной стоимостью. Этот ресурс в качестве субстрата для биотехнологических процессов практически не изучен и только небольшое количество публикаций посвящено исследованию жиросодержащих отходов рыбопереработки [53].

В одном из исследований был использован 100 %-ный тунцовый конденсат (неразбавленный) в качестве единственного источника углерода с целью получения ПГА бактериями *C. necator* TISTR-1095. Высокая концентрация тунцового конденсата не оказывала ингибирующего действия на продукцию биомассы и полимера. Это может быть связано с тем, что *C. necator* способен превращать органические вещества в конденсате тунца в летучие жирные

кислоты, которые легче усваиваются бактериями для производства ПГА. Летучие жирные кислоты могут использоваться для производства ПГА различными продуцентами, такими как *C. necator* и *Bacillus licheniformis* [54]. С использованием газовой хроматографии исследовали состав синтезированного ПГА, накопленного *C. necator* TISTR-1095. Наблюдала пики, соответствующие мономерам ЗГБ и ЗГВ, что указывало на накопление сополимера (П(ЗГБ-со-ЗГВ)) с высоким включением 3-гидроксивалерата – 20 мол.%. Самый высокий показатель биомассы составил $3,8 \pm 0,1$ г/л, который был достигнут после трех циклов многократного культивирования, содержащих 100 %-ный конденсат тунца, с исходным соотношением C/N = 81:1. Эта работа подтверждает, что ПГА можно производить из промышленных рыбных отходов, в данном случае полученных при переработке тунца, с меньшими затратами. Кроме того, это исследование продемонстрировало потенциал использования возобновляемого и дешевого углеродного субстрата для производства полимеров в целом [55]. Также был проведен эксперимент с использованием твердых рыбных отходов с использованием *B. subtilis* ((КР172548) для синтеза П(ЗГБ). При оптимальных условиях бактерии синтезировали до 1,62 г/л полимера. Кроме того, были продемонстрированы более высокая биосовместимость по сравнению с коммерчески доступными ПГА (с точки зрения адгезии и пролиферации клеток), улучшенные механические характеристики, такие как большой размер пор на поверхности, повышенная гидрофильность и низкая цитотоксичность. Все эти характеристики могут стать веской причиной использования отходов рыбной промышленности для синтеза ПГА, который является подходящим биоматериалом для биомедицинских применений [56].

Проблема утилизации твердых бытовых отходов, особенно пластика на нефтяной основе, и твердых рыбных отходов очень остро стоит перед современным обществом. Поэтому, сокращение потребления пластика и поиск эффективных решений для утилизации рыбных отходов являются крайне актуальными и важными задачами на сегодняшний день. Весьма перспективным может стать использование рыбных отходов для производства биополимеров для

снижения экологической нагрузки на природные экосистемы. Также твердые рыбные отходы содержат белки (58 %), жиры и минералы (19 %), ростовые факторы, пальмитиновую и олеиновую кислоты (22 %) – все это делает рыбные отходы отличным источником питательных веществ для роста микроорганизмов [56] и позволяет их рассматривать в качестве весьма перспективных источников углерода.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Бактериальный штамм, состав питательной среды и условия роста

В данном исследовании использовали штаммы *Cupriavidus necator* В-10646, *Ralstonia eutropha*- В8562, зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), а также *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1.

Для выращивания бактерий использовали среду Шлегеля, представляющую собой фосфатный буфер – раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (9 г/л) и KH_2PO_4 (1,5 г/л), а также растворы солей: железо лимоннокислое ($\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,025 г/л, сульфат магния (MgSO_4) – 0,2 г/л. Микроэлементы вносили из расчета 3 мл раствора микроэлементов на 1 л среды по прописи Хоагланда. Раствор микроэлементов состоит: H_3BO_3 - 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; NiCl_2 - 0,008 г/л.

Культивирование проводили в колбах объемом 0,5 и 1,0 л при коэффициенте заполнения, 0,4 (объем культуры составил 200 мл и 400 мл, соответственно). В качестве источника углерода были использованы жиросодержащие отходы рыбоперерабатывающей промышленности трех типов, полученных из различных источников в концентрациях от 10 до 30 г/л согласно условиям эксперимента: жир из голов скумбрии атлантической (*Scomber scombrus*), жир из внутренностей судака обыкновенного (*Sander lucioperca*), жир из голов копченой кильки балтийской (*Sprattus sprattus*). В качестве источника азота использованы: ацетат аммония ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), мочевины ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) в концентрации 1 г/л и хлорид аммония (NH_4Cl), концентрации которого были 0,5, 0,7, 1,0, 1,2, 1,5, 2,0 г/л. Процесс культивирования осуществляли в лабораторных условиях, с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 °С и 200-250 об/мин. Время культивирования составило 72 ч.

2.2 Получение инокулята

Инокулят получали методом ресуспендирования хранящейся на агаризованной среде музейной культуры. В коническую колбу объемом 500 мл добавляли 200 мл фосфатного буфера, после чего производили стерилизацию. В стерильных условиях в колбу переносили *Cupriavidus necator* B-10646. Далее в колбу добавляли: 1 мл раствора железа лимоннокислого (5 г/л), 2 мл раствора NH_4Cl (100 г/л), 0.6 мл раствора микроэлементов, 2 мл раствора MgSO_4 (20 г/л) и источник углерода в концентрации 10 г/л в зависимости от условий эксперимента – фруктозу, пальмитиновую или олеиновую кислоту. Колбу устанавливали в Шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 °C и 200 об/мин на 24 часа.

2.3 Регистрация параметров культивирования

Прирост биомассы клеток в процессе культивирования бактерий отмечали по сухой биомассе и оптической плотности культуры. Для этого производился регулярный отбор образцов в течение всего культивирования для последующего анализа.

Измерение оптической плотности культуры проводили на фотоэлектрокалориметре UNICO-2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США) при $\lambda=440$ нм и длине оптического пути 1 мм; для этого к культуре бактерий добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:5.

Для определения концентрации биомассы бактерий использовали весовой метод. Для этого 20-25 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 6 мин при 7500 об/мин, после чего осадок промывали дважды дистиллированной водой, затем гексаном и снова дистиллированной водой. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы с известной массой. Далее бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 105°C 24 ч. После этого охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Биомассу бактерий

определяли как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

Для определения остаточной концентрации субстрата в культуральной среде отбирали 10 мл культуры и добавляли 10 мл гексана, тщательно взбалтывая, ждали разделения слоев. После по 5 мл гексана отбирали из верхнего слоя в заранее взвешенные грушевидные колбы. Далее выпаривали гексан на вакуумном роторном испарителе (Rotavapor R-210 (BUCHI)) и оставляли в эксикаторе на 24 ч для удаления остаточного содержания растворителя. Колбы с остатком жира взвешивали и рассчитывали концентрацию субстрата (г/л).

2.4 Выделение полимера

Для экстракции полимера 50 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 6 мин при 7500 об/мин. Супернатант сливали. В полученную биомассу добавляли этанол с хлороформом (в соотношении 1:2) и переносили в конические колбы с крышкой. Экстракция происходила в течение 24 часов при температуре 30 °С. Далее экстракт, содержащий липиды и полимер, отделяли от биомассы через бумажный фильтр в круглодонные колбы. Растворители удаляли, используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI). После чего полимер осаждали гексаном.

2.4.1 Измерение внутриклеточного содержания и определение мономерного состава полимера

Общее содержание полимера в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре AgilentTechnologies 7890A с масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США). Для этого к навеске 3,9–4,5 мг сухой биомассы добавляли 0,85 мл метанола, 1 мл внутреннего стандарта, содержащего 0,5 мг бензойной кислоты и 1 мл хлороформа, и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Метанолиз осуществляли при температуре

80 °С на водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов 40 минут. По окончании добавляли 1 мл дистиллированной воды.

2.5 Определения жирнокислотного состава жира

Для определения жирнокислотного состава жира проводили метанолиз липидов. Для этого к пробам жира добавляли 1 мл метилирующей смеси (метанол:H₂SO₄=19:1), 1 каплю бензола и ставили под обратный холодильник на водяную баню на 2 часа.

Очистку проводили при помощи делительной воронки. Для очистки пробы от серной кислоты смесь переливали в делительную воронку, добавляли 20 мл дистиллированной воды и ждали разделения слоев. После нижний слой воды сливали и измеряли рН лакмусовой бумагой. Повторяли промывку до достижения нейтрального рН. Верхний слой переливали в специализированную колбу через воронку с безводным сернокислым натрием. Промывали воронку 3 раза по 1 мл гексана. Далее на роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI) удаляли растворитель.

2.6 Исследование физико-химических свойств ПГА

Для определения молекулярной массы и распределения молекулярных масс полимера применяли метод гелепроникающей хроматографии (Agilent Technologies 1260 Infinity (США)) с использованием полистироловых стандартов Fluka (Швейцария, Германия). Определяли средневесовую (M_w) молекулярную массу и полидисперсность (Đ) полимера.

Степень кристалличности полигидроксиалканоатов определяли при помощи рентгеновского спектрометра D8 ADVANCE от компании «Bruker», Германия. Запись спектров проводилась с интервалом в 0,04° и выдержкой 2 секунды на каждую точку измерения. Для расчета степени кристалличности использовалось специализированное программное обеспечение Bruker AXS TOPAS v.4.2 (Германия).

Термический анализ ПГА осуществляли с использованием дифференциального сканирующего калориметра ДСК-1 и

термогравиметрического анализатора ТГА (оба от Mettler Toledo, Германия). Образцы ПГА в виде порошка весом $4,0 \pm 0,2$ мг помещали в алюминиевые тигли и подвергали нагреву со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры 200°C . Затем образцы охлаждали до -20°C , выдерживали в течение 20 минут и снова нагревали до 320°C . Температуры плавления и деградации определяли на основе характеристических пиков на термограммах, анализ которых проводился с помощью программы «StarE».

2.7 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных, полученных в результате экспериментов, производилась с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

Глава 3. Результаты

Страницы 26 – 41 изъяты в связи с авторским правом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследован жирнокислотный состав 3-х типов рыбных жиров (головы копченой кильки, внутренности судака и головы скумбрии), отличающихся по составу и содержанию жирных кислот.
2. Рост бактерий *C. necator* В-10646 наблюдали при использовании всех типов жиров, однако, максимальные показатели, как по биомассе, так и по ПГА были получены при использовании жира из голов копченой кильки.
3. Для максимального накопления биомассы и полимера наилучшим источником азота является хлорид аммония в концентрации 1 г/л при концентрации жира 20 г/л.
4. При использовании трех типов рыбных жиров синтезированы трехкомпонентные сополимеры – П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-ЗГГ) с различными молекулярно-массовыми и температурными характеристиками.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

(3-ГБ) – 3-гидроксибутират

(3-ГВ) – 3-гидроксивалерат

(3-ГВ) – 3-гидроксивалерат

(3-ГГ) – 3-гидроксигексаноат

(4ГБ) – 4-гидроксибутират

(П(3ГБ)) – поли(3-гидроксибутират)

(П(3ГБ-*co*-4ГВ)) – поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксивалерат)

(П(4ГБ)) – поли(4-гидроксибутират)

Д – полидисперсность

M_v – средневесовая молекулярная масса

ПГА – полигидроксиалканоаты

S_x – степень кристалличности

$T_{\text{дегр}}$ – температура деградации

$T_{\text{пл}}$ – температура плавления

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Kumar G. et al. A review on the conversion of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates using dark fermentative effluents from hydrogen production //Bioresource technology. – 2019. – Т. 287. – С. 121427.
2. Reddy C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview //Bioresource technology. – 2003. – Т. 87. – №. 2. – С. 137-146.
3. Anderson, A. J., Dawes E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates //Microbiological reviews. – 1990. – Т. 54. – №. 4. – С. 450-472.
4. Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J.Możejko-Ciesielska, R.Kiewisz //Microbiological research. – 2016. – Т. 192. – С. 271-282.
5. Zheng Y. et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction //Metabolic engineering. – 2020. – Т. 58. – С. 82-93.
6. Carvalho L. T. et al. Recent advances in the production of biomedical systems based on polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Т. 183. – С. 1514-1539.
7. Dalgic A. D. et al. Natural origin bilayer pullulan-PHBV scaffold for wound healing applications //Biomaterials Advances. – 2022. – Т. 134. – С. 112554.
8. Koller M. Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): The biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament //EuroBiotech J. – 2019. – Т. 3. – №. 1. – С. 32-44.
9. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение: монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск: Красноярский писатель. – 2011. – 392 с
10. Liechty W. B. et al. Polymers for drug delivery systems //Annual review of chemical and biomolecular engineering. – 2010. – Т. 1. – С. 149-173.
11. Verlinden R. A. J. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates //Journal of applied microbiology. – 2007. – Т. 102. – №. 6. – С. 1437-1449.
12. Steinbüchel A., Fuchtenbusch B. Bacterial and other biological systems for polyester production //Trends in biotechnology. – 1998. – Т. 16. – №. 10. – С. 419-427.
13. Sen K. Y., Hussin M. H., Baidurah S. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source //Biocatalysis and agricultural biotechnology. – 2019. – Т. 17. – С. 51-59.
14. Shrivastav A. et al. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system //BioMed research international. – 2013. – Т. 2013.

15. Bhattacharya S. et al. Biodegradable polymeric substances produced by a marine bacterium from a surplus stream of the biodiesel industry //Bioengineering. – 2016. – T. 3. – №. 4. – C. 34.
16. Povolo S. et al. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM1034 from structurally unrelated carbon sources //New biotechnology. – 2013. – T. 30. – №. 6. – C. 629-634.
17. Reinecke F., Steinbüchel A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers //Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2009. – T. 16. – №. 1-2. – C. 91-108.
18. Shi L., Tu B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences //Current opinion in cell biology. – 2015. – T. 33. – C. 125-131.
19. Huisman G. W. et al. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads //Applied and environmental microbiology. – 1989. – T. 55. – №. 8. – C. 1949-1954.
20. Brandl H. et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters //Applied and environmental microbiology. – 1988. – T. 54. – №. 8. – C. 1977-1982.
21. Zhang L. et al. A review on enhancing *Cupriavidus necator* fermentation for poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) production from low-cost carbon sources //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – T. 10. – C. 946085.
22. Cavaliere C. et al. Identification and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in polyhydroxyalkanoates produced from mixed microbial cultures and municipal organic wastes at pilot scale //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 3. – C. 539.
23. Sharma L., Srivastava J. K., Singh A. K. Biodegradable polyhydroxyalkanoate thermoplastics substituting xenobiotic plastics: a way forward for sustainable environment //Plant responses to xenobiotics. – 2016. – C. 317-346.
24. Loo C. Y., Sudesh K. Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties //Malaysian Polymer Journal. – 2007. – T. 2. – №. 2. – C. 31-57.
25. Licciardello G., Catara A. F., Catara V. Production of polyhydroxyalkanoates and extracellular products using *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*: A review //Bioengineering. – 2019. – T. 6. – №. 4. – C. 105.
26. Zinn M., Witholt B., Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate //Advanced drug delivery reviews. – 2001. – T. 53. – №. 1. – C. 5-21.
27. Kamm B., Kamm M. Principles of biorefineries //Applied microbiology and biotechnology. – 2004. – T. 64. – №. 2. – C. 137-145.
28. Devi A. B. et al. Characterization of polyhydroxybutyrate synthesized by *Bacillus cereus* //Int J Pharm Pharm Sci. – 2015. – T. 7. – №. 3. – C. 140-144.
29. Flechter A. Plastics from bacteria and for bacteria: PHA as natural, biodegradable polyesters //Springer Verlag New York. – 1993. – T. 6. – C. 77-93.

30. Johnstone B. A throw-away answer //Far Eastern Economic Review. – 1990. – T. 147. – C. 62-62.
31. Wang Y., Yin J., Chen G. Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities //Current Opinion in Biotechnology. – 2014. – T. 30. – C. 59-65.
32. Zhila N. O. et al. Biosynthesis of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* B-10646 from Mixtures of Oleic Acid and 3-Hydroxyvalerate Precursors //Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2020. – T. 13. – №. 3. – C. 331-341.
33. Andler R., Vivod R., Steinbüchel A. Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly (cis-1, 4-isoprene) rubber //Journal of bioscience and bioengineering. – 2019. – T. 127. – №. 3. – C. 360-365.
34. Linger J. G. et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – T. 111. – №. 33. – C. 12013-12018.
35. Riedel S. L. et al. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats //Journal of biotechnology. – 2015. – T. 214. – C. 119-127.
36. Ward P. G., de Roo G., O'Connor K. E. Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3 //Applied and environmental microbiology. – 2005. – T. 71. – №. 4. – C. 2046-2052.
37. Heinrich D. et al. Synthesis gas (Syngas)-derived medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthesis in engineered *Rhodospirillum rubrum* //Applied and environmental microbiology. – 2016. – T. 82. – №. 20. – C. 6132-6140.
38. Hokamura A. et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate from steamed soybean wastewater by a recombinant strain of *Pseudomonas* sp. 61-3 //Bioengineering. – 2017. – T. 4. – №. 3. – C. 68.
39. Lee B. X. et al. Transforming our world: implementing the 2030 agenda through sustainable development goal indicators //Journal of public health policy. – 2016. – T. 37. – C. 13-31.
40. Gustafsson J. et al. The methodology of the FAO study: Global Food Losses and Food Waste-extent, causes and prevention”-FAO, 2011. – 2013.
41. Haas C. et al. Production of PHB from chicory roots–comparison of three *Cupriavidus necator* strains //Chemical and biochemical engineering quarterly. – 2015. – T. 29. – №. 2. – C. 99-112.
42. Pagliano G. et al. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from dairy wastewater effluent: bacterial accumulation, structural characterization and physical properties //Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2020. – T. 7. – C. 1-14.
43. Raza Z. A., Abid S., Banat I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2018. – T. 126. – C. 45-56.
44. Ertan F., Keskinler B., Tanriseven A. Exploration of *Cupriavidus necator* ATCC 25207 for the production of poly (3-hydroxybutyrate) using acid treated beet

molasses //Journal of Polymers and the Environment. – 2021. – T. 29. – №. 7. – C. 2111-2125.

45. Pleissner D. et al. Fermentative polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from bakery waste //BioMed research international. – 2014. – T. 2014.

46. Haas R., Jin B., Zepf F. T. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2008. – T. 72. – №. 1. – C. 253-256.

47. Solaiman D. K. Y. et al. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly (hydroxyalkanoates) //Applied microbiology and biotechnology. – 2006. – T. 71. – C. 783-789.

48. Talan A. et al. Bioconversion of oily waste to polyhydroxyalkanoates: Sustainable technology with circular bioeconomy approach and multidimensional impacts //Bioresource Technology Reports. – 2020. – T. 11. – C. 100496.

49. Pernicova I. et al. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected Halomonas strains //Bioresource technology. – 2019. – T. 292. – C. 122028.

50. Obruca S. et al. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil //World Journal of microbiology and biotechnology. – 2013. – T. 29. – C. 2417-2428.

51. Cruz M. V. et al. Online monitoring of P (3HB) produced from used cooking oil with near-infrared spectroscopy //Journal of biotechnology. – 2015. – T. 194. – C. 1-9.

52. Ghaly A. E. et al. Fish processing wastes as a potential source of proteins //Amino acids and oils: A critical review. J. Microb. Biochem. Technol. – 2013. – T. 5. – №. 4. – C. 107-129.

53. Zhila N. O. et al. Waste Fish Oil is a Promising Substrate for the Synthesis of Target Products of Biotechnology //Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2023. – T. 16. – №. 3. – C. 386-397.

54. Keunun P, Rakkan T, Yunu T, Paichid N, Prasertsan P, Sangkharak K (2018) The production of polyhydroxybutyrate by two-step fermentation and the application of polyhydroxybutyrate as a novel substrate for a biolubricant. J Polym Environ 26:2459–2466.

55. Sangkharak K. et al. Utilisation of tuna condensate waste from the canning industry as a novel substrate for polyhydroxyalkanoate production //Biomass Conversion and Biorefinery. – 2021. – T. 11. – C. 2053-2064.

56. Mohapatra S. et al. Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process //Environmental technology. – 2017. – T. 38. – №. 24. – C. 3201-3208.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 Т.Г. Волова

Подпись, инициалы фамилия

«20» июня 2024г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на
жиросодержащих пищевых отходах

Научный руководитель



Подпись, дата

к.б.н., доцент

должность, ученая степень

Н. О. Жила

инициалы, фамилия

Выпускник



Подпись, дата

Е.Г. Цыденова

инициалы, фамилия

Красноярск 2024