

УДК 579.6, 504.062

ПОТЕНЦИАЛ ЖИРОСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОДНЫХ СУБСТРАТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА "ЗЕЛЕНЫХ" ПЛАСТИКОВ

К.Ю. Сапожникова, Н.О. Жила, Т.Г. Волова

Институт Биофизики – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

Жиры различного животного происхождения были изучены в качестве единственного углеродного субстрата для синтеза ПГА природным штаммом *Cupriavidus necator* B-10646. Исследованные жировые субстраты различались по качественному и количественному жирнокислотному составу и были представлены от 7 до 23 жирными кислотами при доминировании пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот и коэффициентами насыщенности 0,2-1,7. Все исследованные С-субстраты поддерживали рост продуцента и синтез ПГА: концентрация бактериальной биомассы и внутриклеточное содержание полимера составляли 1,5-6,5 г/л и 51-70 % соответственно. Синтезированные ПГА представляли собой трехкомпонентные сополимеры с преобладанием мономеров 3-гидроксибутират (94,9-96,6 мол. %) и минорными включениями 3-гидроксивалерата (3,0-4,6 мол. %) и 3-гидроксигексаноата (0,4-0,6 мол. %).

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, ПГА, разрушаемые полимеры, животные жиры, жирные кислоты.

Введение. Синтетические пластиковые материалы, получаемые из продуктов нефтепереработки, ввиду простоты их массового производства и низкой себестоимости, получили широкое распространение и стали неотъемлемой частью жизни человека. Наряду с этим, пластики стали одной из основополагающих причин глобальной экологической проблемы, поскольку бесконтрольное потребление и неэффективные способы утилизации пластиковых изделий в связи с неспособностью к естественному разложению привели к их повсеместному накоплению и угрозе экологическому благополучию биосферы [1]. В связи с этим крайне востребован поиск альтернативных материалов, способных заменить традиционные синтетические полимеры без вреда природным экосистемам. Поиск и разработка экологически чистых продуктов, таких как биопластики – это эффективный способ преодоления экологического кризиса, вызванного неразлагающимися пластмассами.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс биополимеров, характеризующийся биосовместимостью и способностью к естественной биодеградации, обладающих высокой степенью полимеризации и схожими физико-химическими свойствами с синтетическими пластиками [3]. ПГА синтезируются различными микроорганизмами при несбалансированных условиях роста из широкого спектра субстратов, включая возобновляемые ресурсы и побочные продукты различных производств [10]. На сегодняшний день ПГА являются конкурентоспособной альтернативой традиционным пластикам, поскольку процесс их синтеза полностью биотехнологический, а спектр применения охватывает различные сферы жизнедеятельности человека – от расходных материалов до медицинской сферы. Тем не менее, высокая себестоимость производства этих материалов все еще является ограничивающим фактором на пути успешной коммерциализации: затраты на источник углерода (сахара) могут составлять до 40-45 % от стоимости ПГА [6]. Таким образом, существует потребность в научных исследованиях, направленных на снижение затрат на синтез и получение этих биополимеров.

Одним из способов преодоления проблемы является привлечение экономически доступного углеродного сырья. Весьма перспективным представляется использование жирсодержащих С-субстратов для синтеза ПГА, поскольку теоретические выходы полимера могут составлять до 0,7-0,8 г ПГА/г субстрата ввиду высокой доли углерода на моль вещества [2]. Такое сырье представляет собой сложные и многокомпонентные субстраты, где основной составляющей являются триацилглицериды, которые под действием микробных

липолитических ферментов расщепляются последовательно на диацилглицериды, моноацилглицериды, глицерин и свободные жирные кислоты, где последние выступают в качестве непосредственного источника углерода и метаболизируются [5].

Отмечается растущая тенденция к более эффективному использованию низкоценового сырья для синтеза ПГА – отходов различных производств, в частности жirosодержащих (отходы производства растительных масел, убоя скота, рыбоперерабатывающей и пищевой отрасли). Отсутствие рациональной технологии переработки жировых отходов является серьезной проблемой в пищевой промышленности, поскольку, по различным оценкам, количество генерируемого отработанного жира ежегодно может достигать 30 млн тонн [9]. Привлечение отходов в качестве сырья для синтеза целевых продуктов обеспечивает повышение эффективности промышленных производств, так как способствует комплексному и более полному использованию сырьевых ресурсов. Однако, на первоначальных этапах необходимо определить пригодность такого сырья для роста продуцентов и синтеза ПГА. Ввиду этого целью настоящей работы является определение потенциала жirosодержащих С-субстратов животного происхождения для продуктивного синтеза полигидроксиалканоатов высокоеффективным природным штаммом *Cupriavidus necator* B-10646.

Материалы и методы. Культивирование штамма *C. necator* B-10646, проводили с использованием минеральной солевой среды Шлегеля в колбах объемом 0,5 л в шейкерах-инкубаторах «Incubator Shaker Innova®» (США) [12]. В качестве С-субстратов выступали жиры животного происхождения (бараний, свиной, барсучий, гусиный (получены от местных хозяйств) и рыбий («Тульская фармфабрика», Россия), вносимые в питательную среду в концентрации 15 г/л. Концентрацию клеток (урожай биомассы бактерий) оценивали весовым методом. Внутриклеточное содержание ПГА и их мономерный состав определяли с применением газовой хроматографии; процедуру проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A/5975C (США) после предварительного получения метиловых эфиров жирных кислот [4]. Экстракцию ПГА из клеточной биомассы осуществляли в две стадии: обезжиривали биомассу этиловым спиртом и экстрагировали полимер метиленом хлористым, раствор полимера фильтровали и осаждали гексаном.

Результаты и обсуждение. Пять типов жиров животного происхождения впервые исследованы в качестве единственного источника углерода для роста штамма бактерий *C. necator* B-10646 и синтеза ПГА. Большинство животных жиров, за исключением, например, рыбьего жира, представляют собой полутвердые или твердые вещества, что обусловлено высоким содержанием насыщенных жирных кислот в их составе и выступает осложняющим фактором при культивировании продуцентов в жидких питательных средах. Ввиду указанного обстоятельства были рассмотрены жиры различной консистенции: твердой – бараний и свиной жиры, полутвердой – гусиный и барсучий, жидкой – рыбий жир. Поскольку основным субстратом для роста бактерий выступают жирные кислоты в составе триацилглицеридов, жирнокислотный профиль исследованных жиров был определен (Табл. 1). Исследованные жиры отличались по качественному и количественному составу. В твердых и полутвердых животных жирах доминирующими кислотами были пальмитиновая, стеариновая и мононенасыщенная олеиновая кислота, содержание которых варьировало в пределах 20,1-30,1, 10,6-39,0 % и 31,7-51,0 % соответственно. Бараний жир был представлен 15-ю, свиной жир – 7-ю, барсучий – 23-мя, а гусиный – 9-ю различными жирными кислотами. Рыбий жир, жидкий по своей консистенции, характеризовался 15-ю жирными кислотами, среди которых наибольшая доля приходилась на линолевую кислоту (33,5 %), в меньшем количестве были представлены пальмитиновая и стеариновая кислоты – 10,7 и 15,4 % соответственно; также в составе были идентифицированы жирные кислоты, содержащие до 6 двойных связей в углеродной цепи, содержание которых достигало 1,3-8,4 %. Среди исследованных типов животных жиров наибольшим коэффициентом насыщенности обладали твердые жиры (1,5-1,7), несколько ниже этот показатель был для полутвердых жиров (0,7-0,9), минимальное значение показано для жидкого рыбьего жира – 0,2.

Таблица 1.

Жирнокислотный состав животных жиров различного происхождения

Жирные кислоты	Животный жир				
	Бараний	Свиной	Барсучий	Гусиный	Рыбий
C12:0 (лауриновая)	-	-	1,916	-	-
C14:0 (миристиновая)	3,296	-	6,385	0,890	3,664
C16:1 (пальмитолеиновая)	1,832	-	8,452	4,679	5,292
C16:0 (пальмитиновая)	24,685	23,828	20,103	30,122	10,699
C16:4 (гексадекатетраеновая)	-	-	-	-	1,294
C17:0 (гептадекановая)	1,708	0,254	1,005	-	-
C18:1 ω 9 (олеиновая)	35,810	36,328	35,686	51,018	15,391
C18:1 ω 7 (вакценовая)	-	-	-	1,733	-
C18:0 (стеариновая)	26,272	38,973	13,728	10,613	-
C18:2 (линолевая)	-	0,182	-	0,759	33,513
C18:3 (линоленовая)	1,629	-	1,788	-	-
C18:4 (октадекатетраеновая)	-	-	-	-	2,450
C20:1 (гондоиновая)	-	-	0,415	-	7,161
C20:5 (тимнодоновая)	-	-	1,316	-	8,384
C20:4 (арахидоновая)	-	-	2,856	-	0,359
C22:1 (эруковая)	-	-	-	-	7,171
C20:6 (эйкозагексаеновая)	-	-	-	-	3,497
Другие*	4,678	0,435	6,350	0,186	1,125
Насыщенные / ненасыщенные ЖК	1,490	1,698	0,895	0,719	0,173
Полиненасыщенные ЖК	1,629	0,182	7,017	0,759	49,933
Длинноцепочечные ЖК	63,710	75,483	56,846	64,123	78,615

* Жирные кислоты, содержание которых менее 1 % (C8:0, C10:0, C13:0, C14:1, C15:0, C16:2, C17:1, C20:2, C20:3, C22:0, C24:1, изо- и антеизо-ЖК).

Результаты предварительной оценки способности бактерий *C. necator* B-10646 к росту на исследуемых типах животных жиров и синтезу ПГА показаны на рис. 1. Наиболее высокие выходы биомассы бактерий были получены при использовании в качестве С-субстрата рыбьего жира – до 6,5 г/л; несколько ниже – при использовании бараньего, барсучьего и гусиного жиров: концентрация клеток в культуре была близкой и составила 2,6-3,3 г/л. Самые низкие значения были отмечены при использовании свиного жира (до 1,5 г/л). Для всех исследованных жиров, за исключением свиного жира, поскольку в этом случае были получены низкие выходы бактериальной биомассы, было определено внутриклеточное содержание ПГА (рис.1). При использовании гусиного жира содержание ПГА к концу культивирования составило 51±2 %, в то время как для остальных жиров этот показатель был выше – в пределах 60-70 %. Полученный полимер был экстрагирован и его мономерный состав был определен: во всех случаях был синтезирован трехкомпонентный сополимер поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат-ко-3-гидроксигексаноат): доминирующим мономером был 3-гидроксибутират (от 94,9 до 96,6 мол.%), содержание мономеров 3-гидроксивалерата составило 3,0-4,6 мол.% при близком содержании среднеподцепочечного мономера 3-гидроксигексаноата, 0,4-0,6 мол.%.

Наиболее высокие показатели продуктивности процесса роста бактерий и синтеза ПГА, были получены при использовании рыбьего жира: экономические коэффициенты по биомассе (Y_X) и ПГА (Y_{PGA}) составили 0,71 и 0,46 г/г соответственно, продуктивность по биомассе (P_X) и ПГА (P_{PGA}) составила 0,090 и 0,058 г/л*ч соответственно (Табл. 2). Полнота использования субстрата для твердых и полутвердых образцов жира была невысокой – в пределах 36-39 %, в то время как рыбий жир был утилизирован более эффективно, на 61,3 %.

Таблица 2.

Продукционные показатели культуры бактерий *C. necator* B-10646 при росте на животных жирах различного происхождения

Жир	Y_X , г/г	Y_{PGA} , г/г	P_X , г/л*ч	P_{PGA} , г/л*ч	Полнота использования жира, %
Бараний	0,59	0,38	0,046	0,029	37,3
Барсучий	0,54	0,37	0,044	0,031	39,3
Гусиный	0,48	0,24	0,036	0,018	36,1
Рыбий	0,71	0,46	0,090	0,058	61,3

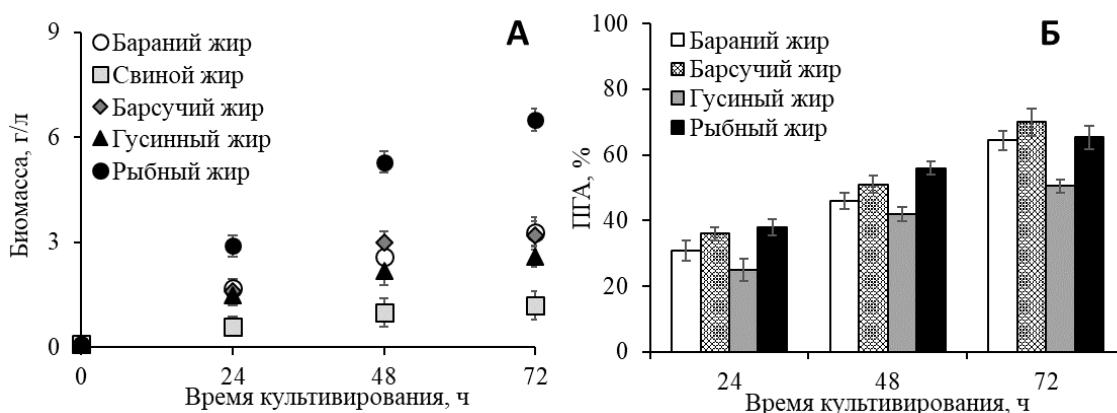


Рисунок 1. Выходы биомассы бактерий *C. necator* B-10646 (А) и внутриклеточное содержание ПГА (Б) при использовании жиров животного происхождения в качестве единственного источника углерода.

Полученные результаты сопоставимы с данными, опубликованными в литературе. Использование свиного жира в качестве источника углерода для роста близкородственного штамма *C. necator* DSM545 обеспечило синтез 11-23 % ПГА внутриклеточно [7]; более высоких выходов ПГА (до 60 %) удалось достичь при культивировании рекомбинантного штамма *R. eutropha* Re2058/pCB113 на жиро-белковой эмульсии свиного происхождения при выходах биомассы до 1,5 г/л, а при масштабировании процесса (6,7-л ферментер) выходы биомассы и содержание ПГА составили 52 г/л и 58 % соответственно [8]. Другой исследовательской группой оценена возможность привлечения в качестве С-субстрата для роста штамма *R. eutropha* H16 жиров, полученных из домашней птицы, а также смесей говяжьего, свиного и бараньего жиров: получено до 4,5 г/л биомассы и до 56-75 % ПГА [11].

Одними из ограничивающих факторов использования животных жиров являются высокая температура плавления (35-55 °C) и гидрофобность, что осложняет их доступность как субстрата для микроорганизмов, поскольку процесс культивирования, как правило, протекает в жидких средах при температуре не выше 30 °C. Кроме этого, эта группа сырьевых ресурсов может быть востребована в качестве компонента сельскохозяйственных кормов, что не позволяет рассматривать ее как непосредственный источник углерода для биотехнологического синтеза ПГА. Обнадеживающие результаты получены при использовании рыбьего жира, который, помимо высоких продукционных показателей является жидким по своей консистенции, что повышает его биодоступность в микробных ферментациях по сравнению с твердыми жирами. Также этот тип жира показал широкое разнообразие жирных кислот, что, вероятно, также способствует более высоким продукционным показателям. Тем не менее, применение чистого рыбьего жира как субстрата для микробных ферментаций нерационально, поскольку он является важным источником полиненасыщенных жирных кислот и используется как биологическая добавка к пище человека. В связи с этим, полученные результаты весьма перспективны, поскольку обосновывают возможность применения жиро содержащих отходов рыбоперерабатывающей промышленности – дешевого и невостребованного в других сферах жизнедеятельности человека сырья.

Заключение. В результате сравнительного анализа применения жиров животного происхождения в качестве углеродного субстрата для роста штамма *C. necator* B-10646 и синтеза ПГА установлено, что наиболее эффективными с точки зрения производственных показателей культуры бактерий и полноты утилизации ростового субстрата является жир рыбного происхождения, обеспечивающий высокие выходы биомассы продуцента и ПГА, что позволяет перейти к рассмотрению группы дешевых жирсодержащих отходов пищевых производств в качестве углеродных субстратов для синтеза биоразрушаемых ПГА.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Проект № 23-64-10007).

Библиографический список

1. Abrha H., Cabrera J. et al. Bio-based plastics production, impact and end of life: A literature review and content analysis // Sustainability. – 2022. – Vol. 14. – №. 8. – P. 4855.
2. Akiyama M., Tsuge T. et al. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation // Polym Degrad Stab. – 2003. – Vol. 80. – №. 1. – P. 183-194.
3. Anderson A.J., Dawes E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates // Microbiol Rev. – 1990. – Vol. 54. – №. 4. – P. 450-472.
4. Braunegg G., Sonnleitner B.Y. et al. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass // Eur J Appl Microbiol Biotechnol. – 1978. – Vol. 6. – P. 29-37.
5. Brigham C.J., Budde C.F. et al. Elucidation of β -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression // J Bacteriol. – 2010. – Vol. 192. – №. 20. – P. 5454-5464.
6. da Cruz Pradella J.G. Economics and industrial aspects of PHA production // The Handbook of Polyhydroxyalkanoates. – 2020. – P. 389-404.
7. Favaro L., Basaglia M. et al. Bacterial production of PHAs from lipid-rich by-products // Applied Food Biotechnology. – 2019. – Vol. 6. – №. 1. – P. 45-52.
8. Gutschmann B., Simões M.M. et al. Continuous feeding strategy for polyhydroxyalkanoate production from solid waste animal fat at laboratory-and pilot-scale // Microbial Biotechnol. – 2023. – Vol. 16. – №. 2. – P. 295-306.
9. Maddikeri G.L., Pandit A.B. et al. Intensification approaches for biodiesel synthesis from waste cooking oil: a review // Ind Eng Chem Res. – 2012. – Vol. 51. – №. 45. – P. 14610-14628.
10. Obrucu S., Sedlacek P. et al. Novel unexpected functions of PHA granules // Appl Microbiol Biotechnol. – 2020. – Vol. 104. – №. 11. – P. 4795-4810.
11. Riedel S.L., Jahns S. et al. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats // J Biotechnol. – 2015. – Vol. 214. – P. 119-127.
12. Zhila N.O., Sapozhnikova K.Y. et al. Synthesis and properties of polyhydroxyalkanoates on waste fish oil from the production of canned sprats // Processes. – 2023. – Vol. 11. – № 7. – P. 2113.