



Статья

Производство поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата) *Bacillus megaterium* LVN01 с использованием дигестата биогаса

Аманда Луисия Мора Мартинес *, Мария Йепес-Перес, Каренг Александра Карреро Конграс и Паола Элиана Сапата Мрено

Grupo de Producción, Estructura y Aplicación de Moléculas, facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Avda. 59A No. 63-20, Mar del Plata 760003, Argentina; msyepes@unmdp.edu.ar (M.Y.-P.); kacarreroc@unmdp.edu.ar (K.A.C.); pezapata@unmdp.edu.ar (P.E.M.)

* Correspondence: almora@unmdp.edu.ar

Резюме: Вид *Bacillus megaterium* LVN01, произрастающий в Колумбии, продемонстрировал способность метаболизировать различные сопутствующие продукты или промышленные отходы (такие как сок фики, ростниковая патока и остаточный глицерин) и накапливать полигидроксibuтират (ПГБ), что дает ему потенциал в производстве биопластиков. В этом исследовании был оценен потенциал жидкого дигестата как источника углерода для производства полимеров ПГА в процессах ферментации с использованием этанола бактериального штамма. Положительно, было обнаружено, что *B. megaterium* использует питательные вещества из этанола остаточного субстрата для правильного и эффективного разложения и синтеза поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV). Аэробная периодическая ферментация в лабораторном масштабе в условиях данного исследования [объем 3 л; температура: 30,8 °C; перемешивание: 400 об/мин; pH 7,0 ± 0,2; растворенный кислород: насыщение 100%; пенегаситель: 10% (об./об.)], генерировал максимальные значения массы сухих клеток (DCW) (0,56 г клеток /л) через 60 часов, тогда как максимальный выход PHBV (360 мг PHBV /л) наблюдался через 16 часов, что очень благоприятно для устойчивого производства разлагаемых биопластиков. Кроме того, анализы ГХ-МС и ЯМР подтвердили, что сополимер ПГБВ, синтезированный *B. megaterium*, состоит из мономеров 3-гидроксibuтират (3HV) и 3-гидроксивалерат (3HV). Кроме того, термические свойства определены методами ТГА (Tonset = 283,1 °C; Tendset = 296,98 °C; Td = 290,114 °C) и ДСК (Tm = 155,7 °C; Hf = 19,80 Дж/г; Xcr = 18,17%). Указываем на то, что этот термостабильный биополимер с низким процентом кристалличности, обеспечивающий гибкость, облегчающую формование, адаптацию и применение в различных отраслях промышленности.

Ключевые слова: биополимеры; полигидроксикарбоксилаты (ПГА); полигидроксibuтират (ПГБ); полигидроксивалерат (ПХВ); Бицилла мегатериум жидкий дигестат; остаточный рыболовный биомасс



Цитирование: Мартинес, А.М.; Йепес-Перес, М.; Конграс, К.А.; Мрено, П.Е. Производство поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата) с помощью *Bacillus megaterium* LVN01 с использованием дигестата биогаса. Прил. Микробиол. 2024, 4, 1057–1078. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030072>

Академический редактор: Николаос

Копирайтинг

Поступила: 23 марта 2024 г.

Пересмотрено: 19 мая 2024 г.

Принято: 21 мая 2024 г.

Опубликовано: 9 июня 2024 г.



Копирайт: © 2024 авторов.

Лицензия: MDPI, Базель, Швейцария

Эта статья находится в открытом доступе. Она распространяется на условиях Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Введение

Промышленное развитие принесло огромную пользу человечеству, но многие из его процессов и продуктов также оказали негативное воздействие на природные экосистемы, влияя на здоровье человека и все другие формы жизни. Среди наиболее критических случаев – производство и использование обычных пластмасс. Они не только истощают невозобновляемые ископаемые ресурсы, но и представляют собой один из основных источников загрязнения окружающей среды из-за своей устойчивости к деградации, что приводит к массовому накоплению этих загрязнителей в различных экосистемах [1].

Как сообщается [2], производство пластмасс выросло с 1,5 тонн в 1950 году до 250 тонн в 2010 году и до 400,3 тонн в 2022 году. добились небольшого снижения мирового производства, близкого к 10% [2]. Пластмассы составляют большую часть отходов, выбрасываемых в наземные и водные экосистемы, где были обнаружены микропластик и пластиковые островки [3,4]. Согласно отчетам за 2019 год, пластиковое загрязнение привело к выбросам 1,8 миллиарда тонн парниковых газов, что эквивалентно 3,4% от общего объема выбросов, генерируемых во всем мире [5].

Столкнувшись с этим экологическим кризисом, производство биопластиков или «зеленых» полимеров буквально становится альтернативой, способной заменить нефтепластики [6]. Эти полиэфироподразделяются на три типа [1]: полимолочная кислота (PLA), полибутиленсукцинат (PBS) и полигидроксиполы (ПГА). Последние являются единственными, которые синтезируются каталитическим путем бактериями, следовательно, представляют собой природные химические соединения, что придает большую добавленную стоимость их промышленному производству, при этом ожидается, что в 2023 году их мировой рынок достигнет 57,8. миллион долларов. Если правительственные постановления и политика продолжат сокращать количество одноразового пластика, вполне возможно, что к 2028 году рынок ПОА вырастет почти на 50%, что составит 98,5 миллионов долларов [7].

ПОА являются вторичными метаболитами широкого спектра бактерий, грибов и некоторых растений, которые производят и накапливают их в качестве энергетического резерва, когда внешние условия затрудняют их выживание [8]. Эти биополимеры обладают значительным потенциалом для замены обычных пластиков нефтехимического происхождения, поскольку они обладают схожими физико-химическими характеристиками, а также демонстрируют превосходные свойства с точки зрения термической обработки и биосовместимости. Это делает их очень подходящими для производства биомедицинских, стоматологических и электронных устройств, а также для использования в различных секторах, включая строительство, автомобилестроение, упаковку и сельское хозяйство [3,8]. Благодаря биоразлагаемости биосовместимым свойствам ПГА его применение распространяется на производство медицинских и стоматологических. Кроме того, разрабатываются тесты для стимуляции регенерации тканей и производства микросфер для введения лекарств [9].

Хотя для получения широкого спектра биополимеров использовались различные микроорганизмы (более 300 видов), лишь несколько бактерий были тщательно исследованы для производства биопластиков из-за их высокой эффективности и производительности.

К ним относятся *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Halomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. oleovorans*, *R. eutropa* и *Cupriavidus necator* [10]. В частности, бактерия *Bacillus megaterium* является превосходной биологической машиной для производства ПОА, поскольку она имеет надежную систему экспрессии и клеточную стенку, дефицитную по липополисахаридам, что облегчает высвобождение биополимера, синтезируемого внутриклеточно бактериями [11,12].

Структурно ПОА подразделяются в зависимости от состава их мономеров на (a) короткоцепочечные (SCL) ПГА, состоящие из мономеров с 3-5 атомами углерода, таких как поли-3-гидроксипалатат [P3HV] и поли-3-гидроксипутират [P3HB]; (b) ПГА со средней длиной цепи (MCL) с мономерами от 6 до 14 атомов углерода, такие как сополимер 3-поли(3-гидроксипутират-ко-3-гидроксипалатат), известный как [3-(HB-co-HV)] или [p(3HB-co-3HV)] или PHBV; и (c) смешанноцепные (MCM), которые объединяют два предыдущих, следовательно, состоят из мономеров с числом атомов углерода от 3 до 14, как в случае поли(3HB-co-3HV) 3HV-co-3HNHx). С промышленной точки зрения выделяются ПГБ и сополимер ПГБ В [9]. Длина углеродной цепи определяет хрупкость природного соединения с короткой или гибкой цепью для примеров со средней длиной цепи [13].

В значительной степени на длину цепи влияет тип субстрата, используемого для индукции продукции ПОА микробного происхождения. Субстраты с высоким содержанием углеводов в основном стимулируют продукцию полимеров SCL PHA (короткоцепочечные полигидроксиполы), тогда как высокое содержание жирных кислот стимулирует продукцию MCM PHA. Наиболее ценными SCL PHA являются, которые образуются P3HB. Для изучения механических свойств ПЗГБ и расширения его применения было исследовано производство таких гетерополимеров, как ПОБВ, который благодаря наличию своей структуры мономера 3ХВ обладает лучшими характеристиками гибкости, упругости и прочности [9].

Для индукции продукции сополимеров бактерий используется углеродные субстраты, включающие смеси чистых летучих жирных кислот (ЛЖК), или материалы или сточные воды с высоким содержанием ЛЖК. Бактерии рода *Bacillus* синтезируют сополимеры ПГБ В в сельскохозяйственных культурах с добавлением смеси ЛЖК врезультате контролируемого гидролиза гороховой, яблочной, луковой и картофельной кожуры [14]. Авторы обнаружили, что *Bacillus cereus* EGU43, культивируемая на гидролизатах шлухи гороха, накапливала сополимер ПОБВ с содержанием 3HV 1% по массе.

Совместное культивирование *Pseudomonas* sp. ST2 и *Bacillus* sp. CS8 в культурах в средах с углеродной и пропионовой кислотами в качестве источника углерода, дополненных глицеролом, образует до 35% сополимера ПОВ [15]; при использовании смеси глицерола и пропионовой кислоты отдельные штаммы производят больше РНА, чем при использовании глицерола в качестве единственного источника углерода. При выращивании *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 в валериановой или пропионовой кислоте ПГБВ получают с лучшими выходами в первом случае. *Ralstonia eutropha* KCTC 2658, выращенная в смеси углеродной, пропионовой и масляной кислот в соотношении 1:2:2 [16], позволяет добиться продукции ПОВ 50% от DCW. *Cupriavidus necator*, выращенный в сточных водах, богатых углеродной, пропионовой и масляной кислотами, без добавления какого-либо изогенного субстрата, образует значительное количество сополимера ПОВ (55% ДХ В) [17]. Недавно Ферре-Гуэлл и Вингерберн [18] получили высокие концентрации сополимера ПОВ в процессе выращивания *Haloferax mediterranei* в смеси бутиратной и валератовой кислот с добавлением поверхностно-активных веществ (Твин 80) для повышения биодоступности субстрата, с продуктивностью 10,2 мг/лч при периодической ферментации [18]. Такие подходы потенциально могут снизить затраты на производство ПОА и обеспечить экологические преимущества за счет повторного использования отходов.

В настоящее время, хотя мировые мощности по производству ПГА на биологической основе расширяются с каждым годом, промышленное производство ПГА ограничено из-за себестоимости его производства (около 4000–15 000 долларов США за метрическую тонну), которая значительно превышает стоимость полимеров. Получаемые из ископаемого топлива (около 1000–1500 долларов США за метрическую тонну) [3]. Сырье (субстраты) составляет около 50% общих производственных затрат [19]; поэтому рентабельность производства ПГА во многом определяется стоимостью сырья, особенно субстратов-источников углерода. Это связано с тем, что накопление ПГА происходит в анаэробных условиях, поэтому большая часть субстрата используется микроорганизмами в цикле трикарбоната с образованием CO₂ и водорастворимых вторичных метаболитов. Лишь часть источника углерода, гораздо меньше половины, направляет свой рост клеточной биомассы и накопление ПГА [19].

Помимо вышеописанного, промышленные процессы производства ПГА основаны на технологиях ферментации, в которой используются дорогостоящие субстраты (очищенные сахара, пищевые растительные масла и др.), которые, кроме того, являются частью семейной корзины. Таким образом, его использование ставит технологическую конкуренцию пищевой промышленности и удорожает общее производство ПГА. Поэтому существует острая необходимость использования субстратов-источников углерода, которые не влияют на продовольственную безопасность, являются экономичными, доступными и устойчивыми для устойчивого синтеза ПОА [3,20].

Малоценные субстраты были оценены как источники углерода для производства ПГА, поступающие из различных производственных секторов: молочной промышленности (сыр/сыворотка, сточные воды молочной заводов), нефтяных и бумажных заводов, сельскохозяйственных культур (сточные воды пальмового масла/соеи/фруктов), и отходов животного происхождения (куриный/коровий навоз) [3]. Однако они представляют собой субстраты, которые требуют предварительной обработки для использования в качестве питательной среды для микробов, что влечет за собой дополнительные затраты. По этой причине внимание было направлено на использование субстратов, которые дают первичный выход, например, для производства биотоплива, в частности летучих жирных кислот (ЛЖК), т.е. промежуточные метаболиты при анаэробном биоразложении (АД) остаточной биомассы, которая используется для производства биогаса [21]. В этом смысле исследователи направили свое внимание на усиление производства ЛЖК как побочного продукта производства биогаса [22]. Колумбийские исследователи сообщили об интересной работе, в которой они использовали для этой цели рыбные отходы с помощью которых также получали диэстат, богатый ЛЖК [23].

Bacillus megaterium LVN01, производящий в Колумбии, продемонстрировал способность производить РНА из остаточного глицерина, полученного в биодизельной промышленности [24], плодов рожкового дерева [25], отходов переработки фики (сок фики) [12] и масла для жарки. В этом исследовании *B. megaterium* LVN1 продемонстрировала способность синтезировать PHBV из жидкого диэстата, остаточного субстрата анаэробного переваривания козьих рыб.

В этом контексте исследовательская группа PROBIOM (производство, структура и применение биомолекул) Национального университета Колумбии поделилась с своим исследовательским опытом для производства РНА из различных субстратов (глицерин, сок фики, мякоть рожкового дерева, масло для жарки). дать вторичное использование отходов рыбной промышленности посредством своего участия

у частие в проекте «Усиление кустарного рыболовства в колумбийском регионе Нариньо-Тихоокеанский регион в целях устойчивого использования ресурсов». Таким образом, в рамках проекта первичным источником использования отходов рыболовства стало производство биогаса с помощью биологических перспектив Национального университета Колумбии, штаб-квартира в Пальмире. ПРОБ ИОМ использует дигестат первой фазы в качестве основного субстрата *B. megaterium* LVN01 для производства ФГА.

В Колумбии кустарное рыболовство поставляет на национальный рынок около 12 000 тонн рыбы в год, т.е. 8% от общего объема промышленного рыболовства в стране. По оценкам, 45% общего улова при кустарном рыболовстве становится отходами [23,26], что приводит к серьезным экономическим потерям для этого сектора и экологическим проблемам, связанным с неадекватной утилизацией отходов. В Колумбии отходы рыболовства обычно выбрасываются прямо в океан или вывозятся на свалку [23].

Участие в проекте «Усиление кустарного рыболовства в колумбийском регионе Нариньо-Пасифик в целях устойчивого использования ресурсов». «Таким образом», среди целей которого стоит «Увеличение использования излишков рыболовства и отходов в Тихоокеане Нариньо», предоставила платформу для казанной инициативы. В рамках вышеупомянутой цели первоначальное внимание уделяется производству биогаса из отходов рыболовства с помощью биологических перспектив Национального университета Колумбии, штаб-квартира в Пальмире. Авторами этого исследования (группа ПРОБ ИОМ) используется дигестат, побочный продукт начальной стадии, в качестве основного субстрата для роста *B. megaterium* LVN01 и микробного синтеза ФГА при изучении нового потока отходов, о котором ранее не сообщалось, и придание потенциальной ценности рыболовным отходам.

2. Материалы и методы

2.1. Заявление об этике

Результаты этого исследования сформулированы в соответствии с Соглашением о доступе к генетическим ресурсам их производителей № 159, подписанным Министерством окружающей среды и устойчивого развития Национального университета Колумбии, Резолюция 0004, 2 января 2018 года, в рамках проекта под названием «Получение и характеристика полигидроксикалоатов, синтезированных нативными штаммами из органических отходов».

2.2. Район исследования и бактериальный

штамм *B. megaterium* LVN01 (код GenBank: QJGY00000000.1) был выделен группой ПРОБ ИОМ из образцов почвы с образцами в муниципалитете Гуарне (06° 16' 50" с.ш и 75° 26' 37" з.д.), департамент Ангиокия, Колумбия) и первоначально охарактеризованы использованием молекулярных (соответствие последовательностей 16S рДНК), морфологических и биохимических методов [12]. Бактериальные культуры хранили при -4°С в бульоне Лурии Бертани (бульон LB, MERCK, Дармштадт, Германия) с 20% глицерина (по объему).

2.3. Источник глерода

В качестве субстрата для ферментации использовались жидкие остатки пилотной биогасовой установки, которая работает с остаточной биомассой отходов кустарного рыболовства. Завод расположен в городе Сан-Андрес-де-Тумако на территории Национального университета Колумбии (Тумако, департамент Нариньо, Колумбия). Образцы были предоставлены исследовательской группой по экологическим перспективам того же университета в рамках проекта «Усиление кустарного рыболовства в колумбийской части Тихого океана Нариньо на пути к устойчивому использованию ресурсов».

Этот жидкий остаток, известный как дигестат, является ценным источником ЛЖК. Для консервации его хранили замороженным при -4°С, а перед использованием в процессе подвергли фильтрации через плотную мембрану (размер пор 20 мкм) для удаления осадков крупнее 20 мкм. Этот этап способствовал активности микробной ферментации в среде, обогащенной этансом субстратом и предотвращал закупорку датчиков оборудования, на котором проводился процесс.

Биоматематическая характеристика дигестата выявила наличие ряда питательных веществ, в том числе ЛЖК ($59,04 \pm 0,9$ г/л), с заметными концентрациями углеродной кислоты

(24,49 ± 1,82 г / л), масляная кислота (11,81 ± 0,02 г / л) и изомасляная кислота (9,36 ± 0,02 г / л). Эта композиция представляет собой потенциальный источник углерода для *B. megaterium*, что представляет интерес для данного исследования (таблица S1).

2.4. Культиура СММ

Питательный агар (Merck, Microbiological Grade, Дармштадт, Германия) состоял из 5,0 × 10⁻³ г / л пептона, 3,0 × 10⁻³ г / л мясного экстракта, 8,0 × 10⁻³ г / л хлорида натрия и 15,0 × 10⁻³ г / л. 10⁻³ г / л агара с конечным pH: 7,3 ± 0,2. Бульон Лурии Бертани (бульон LB, MERCK, Дармштадт, Германия) состоял из 10 г / л триптона, 5 г / л дрожжевого экстракта и 10 г / л NaCl, с доведением pH до 7,0 с использованием примерно 0,2 мл NaOH (5 Н).

К минимальным средним (ММС) добавляли KH₂PO₄ (1,5 г / л), Na₂HPO₄ (3,6 г / л), (NH₄)₂SO₄ (1,0 г / л), MgSO₄·7H₂O (0,2 г / л), дрожжевой экстракт (0,1 г / л), глицерин (20 г / л) в качестве источника углерода и раствор микроэлементов (ТЭ) концентрацией 1,0 мл / л, состоящий из FeSO₄·7H₂O (10 г / л), ZnSO₄·7H₂O (2,25 г / л), CuSO₄·5H₂O (1,0 г / л), MgSO₄·5H₂O (0,5 г / л), CaCl₂·2H₂O (2,0 г / л), Na₂B₄O₇·10H₂O (0,23 г / л), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (0,1 г / л) и 10 мл HCl (35%) с конечным pH 7,3 ± 0,2.

2.5. Активация бактериального штамма и подготовка инокулята

2.5.1. Активация *B. megaterium* LVN01

Всего 10 мл предварительно консервированных клеток культивировали в бульоне LB с 20% глицерином на чашках с питательным агаром при 37 °С в течение 24 часов. Наличие и чистоту микроорганизма определяли методом окраски по Граму и окраски спор малярийным эозинем. Способность накапливать ФГА проверяли с помощью окрашивания нильским синим, как описано ниже в статье.

2.5.2. Подготовка инокулята

Колонию *B. megaterium* LVN01 ресуспендировали в 10 мл бульона LB и инкубировали в течение 24 ч в орбитальном шейкере (Heidolph Unimax 1010 с инкубатором 1000, Heidolph Instruments, Швабах, Германия) при 37 °С и 200 об / мин. Затем 1 мл активированного микроорганизма разводили в 50 мл культурыальной среды LB. Культуру инкубировали на орбитальном шейкере (37 °С и 200 об / мин) в течение 6 ч или до достижения оптической плотности раствора в каждой колбе при 600 нм (OD₆₀₀) более 1,0 единицы. Наконец, для инокулята проводили новую ферментацию с использованием 100 мл предварительного инокулята и 200 мл среды MMS. Культуру инкубировали в орбитальном шейкере при 37 °С и 200 об / мин в течение примерно 24 часов, пока расчетные показания OD₆₀₀ не составили от 0,1 до 0,3 единиц.

2.5.3. Характеристика *B. megaterium* и визуализация накопленного ФГА

Для идентификации морфологии бактериальных клеток *B. megaterium* LVN01 использовали проток окрашивания по Граму [27]. Окрашенному предметному стеклу дали высохнуть на воздухе и наблюдали под микроскопом (Leica DM500, Leica microsystems, Вецлар, Германия) (рис. S1). Затем было разработано окрашивание с использованием методологии Шэффера-Фултона [28,29]; предметное стекло покрывали с афранином 2 минуты промывали, давали высохнуть и наблюдали под микроскопом (рисунок S2). Накопление полигидроксипалканоата (PHA) было впервые визуализировано с помощью нильского красного [30] при выборе колоний, которые демонстрировали красно-оранжевую флуоресценцию в УФ-свете (340 нм), потенциально классифицируемых как производители PHA (рис. S3a). Впоследствии, чтобы подтвердить наличие PHA, выращенные колонии окрашивали нильским синим по методике Ostle and Holt (1982) [31] и наблюдали под флуоресцентным микроскопом при 450 нм (Nikon Eclipse 80i, Токио, Япония). Этот процесс позволил визуализировать гранулы полимера (рис. S3b).

2.6. Аэробные ферментативные процессы

Биопроцесс сыпывали в биореакторе объемом 7 л с мешалкой (Applikon, оснащенный двумя пропеллерами типа Rushton и биоконтроллером EZ2, серия 2310110012, Delf, Нидерланды), работающем в периодическом режиме. Начальный рабочий объем составлял 3 л (разбавленный

жидкий дигестат, MMS и инокулят в соотношении 80:10:10) (рис. S4). Температуру устанавливали 30,8 °C, скорость перемешивания 400 об/мин и время 60 часов. К 300 мл MMS добавляли 300 мл инокулята *B. megaterium*, а затем 2,4 л дигестата или источника углерода. В этих условиях исходная ОП600 среды регистрировалась в пределах 0,1–0,3 ед. Ферментационную среду поддерживали при pH 7,0 ± 0,2 (регулировали с помощью HCl (MERCK, Дармштадт, Германия) или NaOH (MERCK, Дармштадт, Германия, 1 М при необходимости), а уровень растворенного кислорода доводили до 100% насыщения путем введения нескольких импульсов дополнительного сухого промышленного кислорода во время ферментации (1 об.м через вентиляционный фильтр 0,22 мкмс поток кислорода 3 л/мин для поддержания азотного уровня). Капли 10% (по объему) противопенного раствора силикона (Antioqueña). Из химикатов, пищевого качества, Колумбия добавлялись в начале каждой партии и при необходимости.

В этом исследовании оптимальные эксплуатационные параметры установили Gó mez et al. [24] были применены для производства ПГА с использованием *B. megaterium* LVN01 и остаточного глицерина в качестве источника углерода в биореакторе объемом 5 л, работающем в периодическом режиме с эффективным объемом 3 л. Была получена доля использования дигестата (источника углерода). Из предыдущего лабораторного исследования, которое показало самые высокие значения PSC (27,1 мг) и PHA (14,8 мг) через 36 часов во время периодической ферментации в колбах емкостью 500 мл при орбитальном встряхивании (T: 30 °C, 200 об/мин), pH: 7,0 и соотношение MMS-дигестат 20:80.

Кинетику ферментации контролировали в течение 60 часов, образцы (20 мл) отбирали трижды каждые два часа. Рост бактерий измеряли спектрофотометрически (OD600) с последующим определением массы сухих клеток (DCW) и экстракцией биополимера PHA-типа.

Каждый образец центрифугировали при 10 000 г в течение 10 мин при 4 °C (центрифуга Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Калькберг, Германия). Бактериальные осадки дважды последовательно промывали 20 мл деионизированной воды. Наконец, гранулы ресуспендировали в 700 мкл деионизированной воды и замораживали при -4 °C до последующей лиофилизации (при -50 °C, 0,01 мбар в течение 24 ч). Собранную бактериальную биомассу сушили при 60 °C (печь класса Binder 2.0, Германия) до достижения постоянного веса, который записывали как DCW (грамм клеток на литр культурыальной среды).

2.7. Экстракция и очистка PHA

Биополимер выделяли из лиофилизированной биомассы по методике Gó mez et al. [24]. Сухую биомассу обрабатывали смесью 10% (по объему) гипохлорита натрия (NaClO, Químicos JM, Медельин, Колумбия) и хлороформа (CHCl₃) (MERCK, 99%, Дармштадт, Германия) в соотношении 1:1,5. Образец гомогенизировали осторожными быстрыми встряхиванием (вortexом) и инкубировали при 40 °C и 200 об/мин в течение 3 часов. Далее центрифугировали (10 000×g, 10 мин, 4 °C) для разделения фаз. Органическую фазу, содержащую ПГА, фильтровали через плотную фильтровальную бумагу. Фильтрат сушили при комнатной температуре (27 °C) в боксе биобезопасности (BIOBASE, модель BBS-DDC, серия BBS11V1805175D, Шаньдун, Китай, скорость воздуха 0,3–0,5 м/с) и измеряли его сухую массу с помощью весы (Shimadzu, серия AUW220D, Киото, Япония с рабочим диапазоном от 220 г до 1 мг).

Для очистки PHA применяли процедуру Gó mez et al. [24] следовали с некоторыми изменениями: 500 мкл холодного (0–4 °C) 70%-ного по объему метанола (JT Baker, GR, Phillipsburg, NJ, USA) добавляли в каждую пробирку, содержащую сухий фильтрат, для осаждения частицы. Раствор охлаждали при 4 °C в течение 12 часов, а затем центрифугировали при 8000×g и 4 °C в течение 10 минут. Растворитель выпаривали при комнатной температуре (27 °C) в вытяжном шкафу для извлечения ПГА.

Далее биополимер (ПГА) последовательно промывали н-гексаном (MERCK, GR, Дармштадт, Германия), ацетоном (MERCK, GR, Дармштадт, Германия) и диэтиловым эфиром (Mallinckrodt, 99,9%, Сент-Луис, Миссури, США). Каждый растворитель (250 мкл) добавляли по каплям сухому образцу ПГА с последующим центрифугированием (8000×g, 4 °C, 10 мин). Супернатант отбрасывали, а осадок сушили на воздухе при комнатной температуре (27 °C) в течение 12 часов для удаления остатков растворителя. Этот процесс промывки повторяли 2–3 раза до получения почти белого ПГА для обеспечения его чистоты.

Для расчета соотношения РНА на основе количества накопленного сухого веса, выраженного в процентах, использовалось следующее уравнение:

$$\text{ФГА (\%)} = \frac{\text{РНАВес}}{\text{СотовойСухойВесовой}} \times 100.$$

2.8. Характеристика РНА

2.8.1. Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС/SIM)

Анализ проб проводился согласно стандарту ISO 12966-2:2017 [32] с некоторыми изменениями. В качестве эталонного стандарта использовали поли(3-гидроксимасляную кислоту) (Sigma-Aldrich, партия 09217BD-337, Сент-Луис, Миссури, США). Хроматографический анализ проводили на приборе GC AT 6890 Series Plus (АТ, Пало-Альто, Калифорния, США) в сочетании с масс-спектрометрическим детектором (АТ, MSD 5973), работавшим в режиме SIM. Инъекцию проводили в режиме без разделения (V_{inj} = 2 мкл). Колонка, использованная в анализе, имела размеры 60 м × 0,25 мм × 0,25 мкм DB-5MS 5%-Ph-PDMS.

2.8.2. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (1H-ЯМР и 13C-ЯМР)

Использовали ЯМР-спектрометр 600 МГц (Bruker, Avance III HD, азотный криостат TCI, Topspin Software v3.6.5, трубка 5 мм Биллерика, Массачусетс, США). Пробу предварительно отогрели растворением 30 мг биополимера в деионизированном хлороформе (CDCl₃), а в качестве внутреннего контроля использовали 700 мкл тетраметилсилана (ТМС).

2.9. Термические свойства ПГА

2.9.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия

В этом анализе для дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) использовали калориметр Q2000 (TA INSTRUMENTS, Нью-Касл, Делавэр, США). Для анализа использовали образец весом 5,72 мг (РНА). Испытание проводили с потоком азота в качестве продувочного газа 50 мл/мин; затем оборудование было параметризовано под материал. Был период стабилизации при температуре 25 °С, с нагревом до 200 °С со скоростью 10 °С/мин.

2.9.2. Термогравиметрический анализ

Для термогравиметрического анализа (ТГА) использовали термогравиметрический анализатор TGA/SDTA851e (Mettler Toledo, ОН, США), работавший в атмосфере азота со скоростью потока 40 мл/мин. Образец полигидроксимасляной кислоты (ПГБ) массой 10 мг подвергли воздействию температуры в диапазоне от 30 °С до 800 °С со скоростью 10 °С/мин.

2.10. Анализ и представление результатов

Все тесты, проведенные в рамках данного исследования, проводились в трех экземплярах. Результаты представлены как медиана ± стандартное отклонение как в таблицах, так и на графиках. Программное обеспечение Sigma Plot версии 10.0 (Systat Software, Inc.; Чикаго, Иллинойс; США) использовалось для построения графиков, а статистический анализ проводился в STATGRAPHICS Centurion версии XVI.II (Statgraphics Technologies, Inc.; Плейнс, Вирджиния, США).

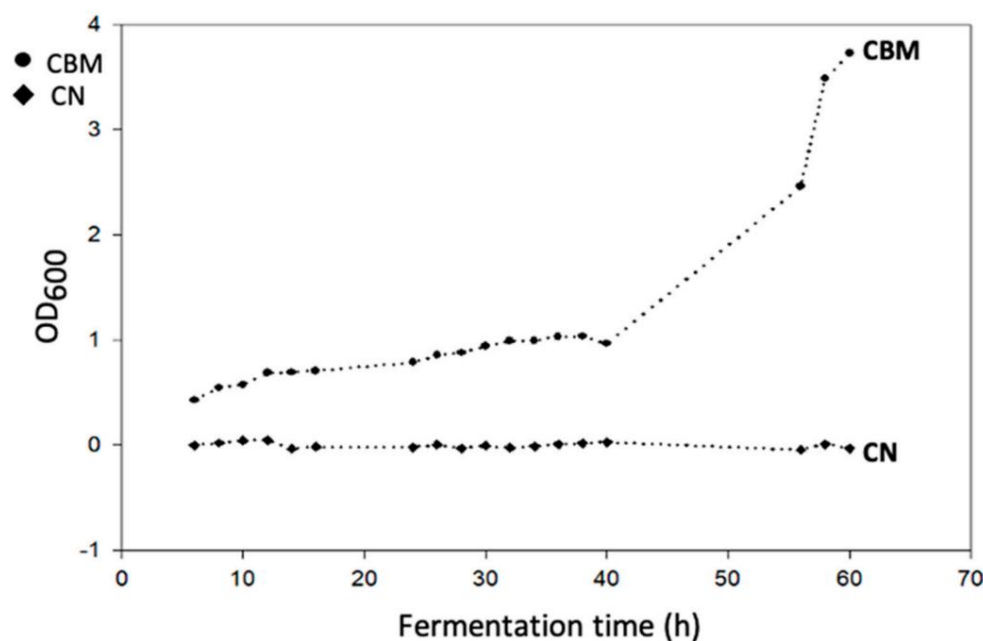
3. Результаты

3.1. Кинетика ферментации

Лог-фаза культуры *B. megaterium* (LVN01) в дигестате длилась почти 40 часов, а ее экспоненциальная фаза длилась между 40 и 66 часами (рис. 1). В системе отбирались пробы в течение 60 часов на основе предыдущих лабораторных экспериментов при тех же рабочих параметрах (рис. S5). Образцы оценивали в трех экземплярах для обеспечения точности результатов. Однако из-за разброса данных было установлено, что

Лаг-фаза культуры *B. megaterium* (LVN01) в дигестате длилась почти 40 часов, а ее экспоненциальная фаза длилась между 40 и 66 часами (рис. 1). В системе отбирались пробы в течение 60 часов на основе предыдущих лабораторных экспериментов при тех же рабочих параметрах (рис. S5). Образцы оценивались в трех экземплярах для обеспечения точности результатов. Однако из-за разброса данных было установлено, что расчет медианы каждой экспериментальной единицы обеспечит более репрезентативную оценку среднего значения каждой из средних значений:

$$X^v = \frac{H_{я=1}^{Икс} \text{ Си} \times \phi_{и.}}{H}.$$

[illegible]

3.2. Восстановление поли(3-гидроксibuтират)-ко-(3-гидроксивалерат) (ПГБВ) 3.2. Восстановление поли(3-гидроксibuтират)-ко-(3-гидроксива

ПТГ в виде полинуклеотидов (поли(3'-идеоксирибоз-5'-трифосфата) и поли(3'-идеоксирибоз-5'-дифосфата) (ПТГ Б В) Восстановление биополимера имеет важное значение для оценки успеха биопроцесса. 9
Восстановление биополимера имеет важное значение для оценки успеха биопроцесса. 9
Обзор параметров этого исследования самые высокие количества РНА были обнаружены через 16 часов, а при параметрах этого исследования самые высокие количества РНА были обнаружены через 16 часов, 24 часа, с значениями 10,8 мг. и 10,3 мг соответственно (рис. 2), и 24 часа с значениями 10,8 мг и 10,3 мг соответственно (рис. 2).

Оптимальная эффективность *B. megaterium* LVN01 в дигестате наблюдалась через 16 часов с выхodom PHB 2,7 г PHB/клетка-1 (270%) и DCW 0,133 г л⁻¹ (рис. 3). Максимальные значения DCW = 0,563 г л⁻¹ достигаются через 60 ч в процессе ферментации *B. megaterium* с дигестатом (рис. 3), контрастируя с максимальной выхodom продукции ФГА (360 мг ПГБ В л⁻¹), наблюдаемым через 16 ч. процесса. Между биомассой и производством ПГБ В наблюдается обратная тенденция (рис. 4).

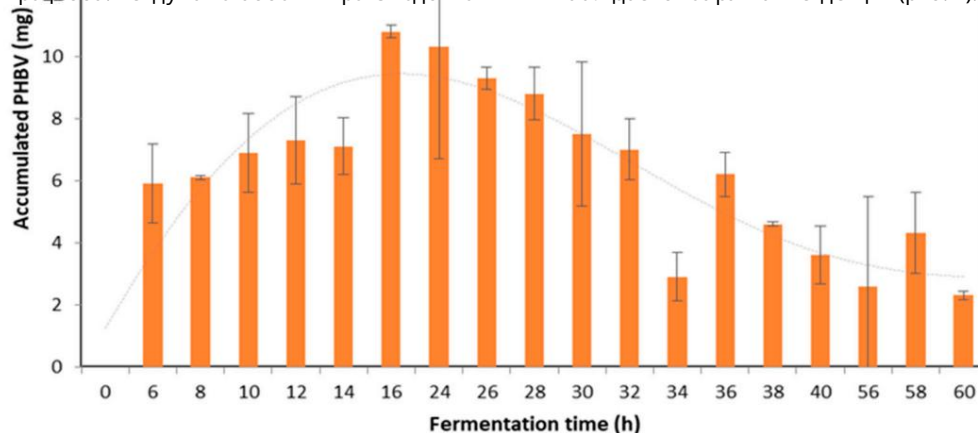


Рисунок 2. РНВВ, накопленный *B. megaterium* LVN01 с использованием дигестата биогаса, в зависимости от рисунка 2. РНВВ, накопленный *B. megaterium* LVN01 с использованием дигестата биогаса, в зависимости от времени ферментации, выраженного в часах (ч). (V: 3 л; t: 60 ч, 400 об/мин; T: 30,8 °C, pH 7,0). Пунктирная линия показывает время ферментации в часах (ч). (V: 3 л; t: 60 ч, 400 об/мин; T: 30,8 °C, pH 7,0). Пунктиром показана тенденция накопления ПГБ во время ферментации. линия показывает тенденцию накопления ПГБ во время ферментации.

Figure 1 is a dual-axis line graph showing the relationship between PHBV content and DCW over a 60-hour fermentation period. The x-axis represents Fermentation time (h) from 0 to 70. The left y-axis represents PHBV Content (%) from 0 to 400. The right y-axis represents DCW (g L^{-1}) from 0 to 4. The PHBV content (red dotted line with circles) starts at 0% at 0 hours, rises to a peak of approximately 270% at 16 hours, and then gradually decreases to about 10% by 60 hours. The DCW (green dotted line with diamonds) starts at 0 g L^{-1} at 0 hours, remains relatively low (around 0.2 g L^{-1}) until 40 hours, and then increases to approximately 0.8 g L^{-1} by 60 hours.

Fermentation time (h)	PHBV content (%)	DCW (g L^{-1})
0	0	0.0
6	100	0.2
12	90	0.2
16	270	0.2
24	240	0.1
28	170	0.2
32	130	0.2
36	90	0.2
40	40	0.2
56	20	0.4
60	10	0.8

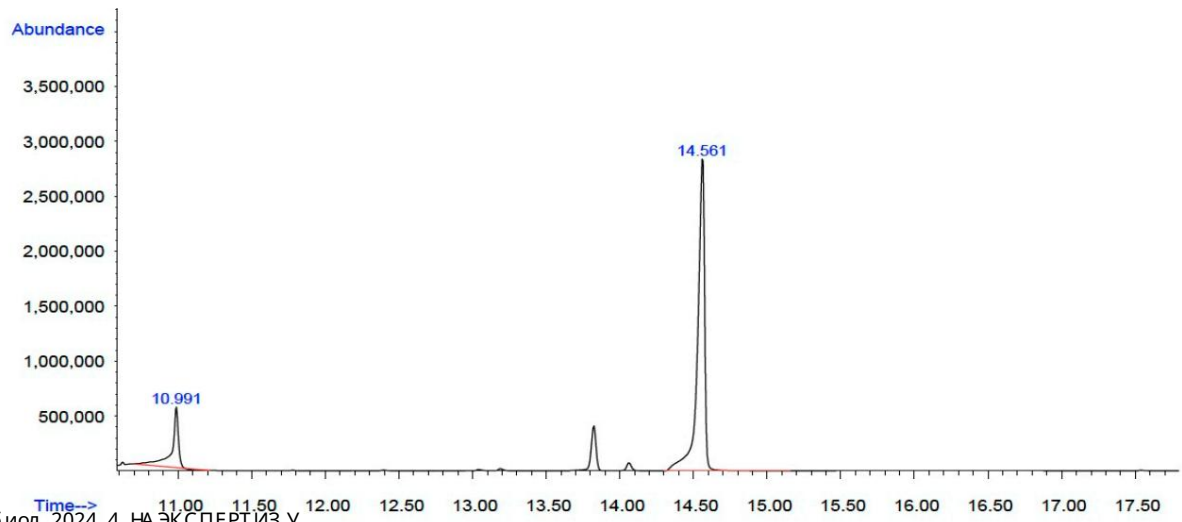
10

Recovered PHBV (mg)	DW (mg)
2.2	17.0
2.5	11.2
3.5	8.0
5.8	5.6
7.5	8.7
10.2	8.0

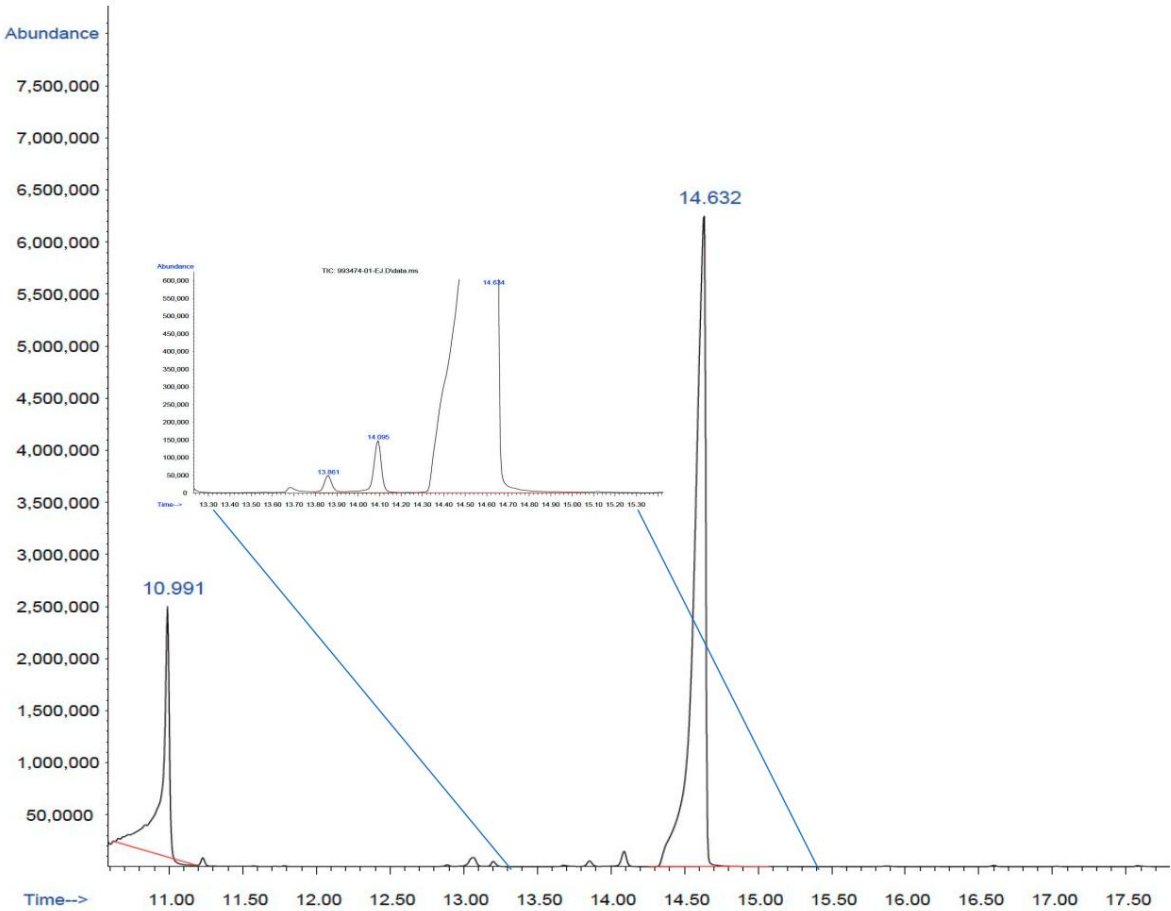
3.3.2. Ядерный магнитический резонанс ЯМР

3.3.2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)

Для подтверждения химической структуры ПГА, полученной на основе анализа ГХ-МС, использовали ЯМР-спектроскопию (¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР). Результаты анализа показали, что сополимер, поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерат) (ПГБВ), состоящий из мономеров ЗГБ и ЗГВ (рис. 6), что находится в полном согласии с результатами ГХ-МС анализа.



(A)



(Б)

Рисунок 5. Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС): (А) хроматограмма коммерческого. Рисунок 5. Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС): (А) хроматограмма коммерческого полимера поли(3-гидроксимасляной кислоты)-со-3-гидроксивалериановой кислоты (деталь № 403121, Sigma-Aldrich, полимер поли(3-гидроксимасляной кислоты)-ко-3-гидроксивалериановой кислоты) (деталь № 403121, Sigma-Aldrich, лот: MKBL7384V); (Б) — хроматограмма сополимера, биосинтезированного *B. megaterium* LVN01 MKBL7384V); (Б) хроматограмма сополимера, биосинтезированного *B. megaterium* LVN01 из дигестата биогаса. В увеличенном виде показаны значения трех пиков слева направо: дигестат биогаса. В увеличенном виде показаны значения трех пиков слева направо: 13,861; 13,861; 14,095 и 14,634. 14,095 и 14,634.

Спектр ЯМР ^{13}C (рис. 8) показывает химические сдвиги и сигналы, соответствующие разнотипам атомов углерода, присутствующим в структуре биополимера, полученного в результате ферментации *B. megaterium* LVN01. Сравнивая эти сигналы ($\text{C}=\text{O}$ 169,18 мд.; CH 67,63 мд.; CH_2 40,80 мд. и CH_3 19,77 мд.) с сигналами коммерческого спектра PHBV и сигналами, сообщенными другими авторами для PHB [24,33], было показано, что можно предположить, что *B. megaterium* LVN01 накапливает в основном ПГБ, что имеет важное значение для различных биотехнологических и экологических применений.

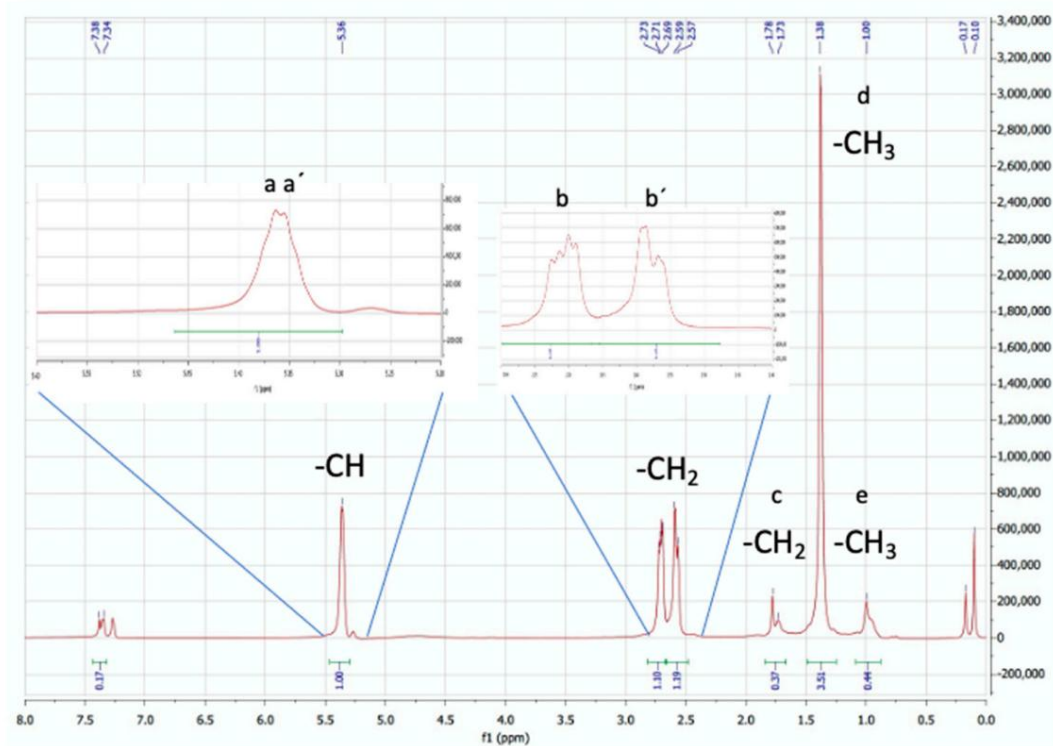
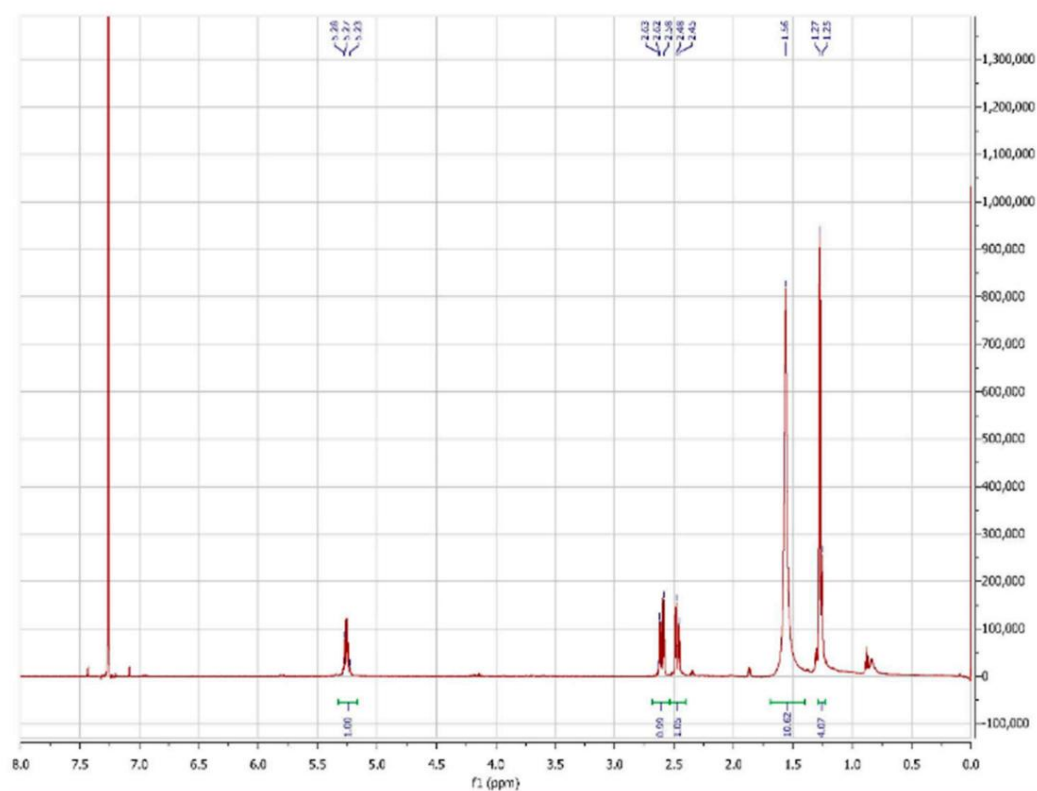


Рисунок 7. Структурная формула бирибонового нуклеотида, катализирующего ферментацию лактозы в этанол и CO_2 у *Enterobacter aerogenes* (А) и *Enterobacter cloacae* (Б). Стандартный геномный идентификатор (GenBank) для *E. aerogenes* (AF044311) и *E. cloacae* (AF044312).

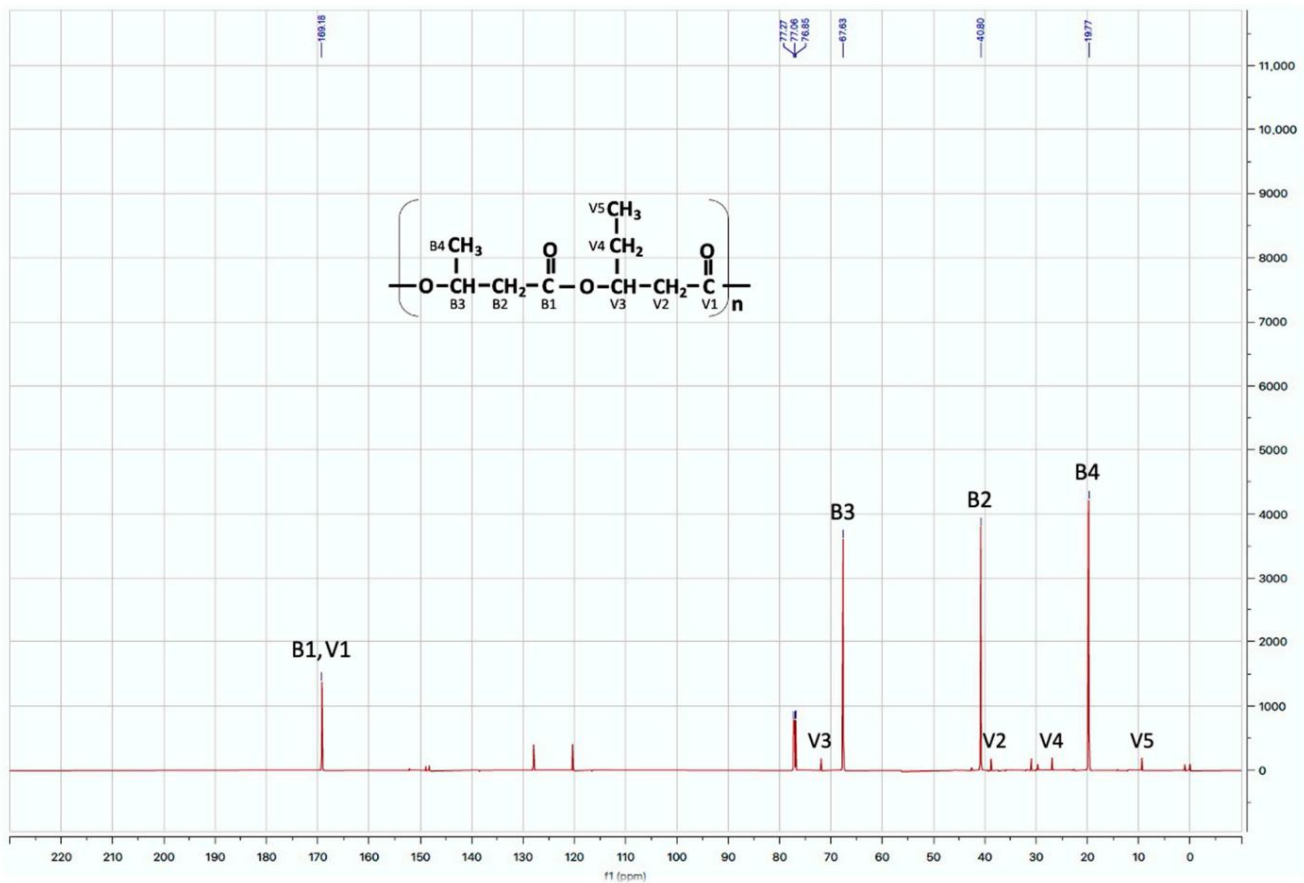


Рисунок 8. Спектр ¹³C ЯМР, соответствующий образцу РНВУ, синтезированному *B. megaterium*.
Рисунок 8. Спектр ¹³C ЯМР, соответствующий образцу РНВУ, синтезированному *B. megaterium*.
LVN01 в жидком диэстате.

3.4. Определение тепловых свойств

Термические свойства ПОБ В, продуцируемого *B. megaterium*, анализировали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термogrавиметрического анализа (ТГА) в атмосфере азота А.

Термическую стабильность полученного биополимера определяли методом термogrавиметрического анализа. На основании термogrавиметрических (ТГ) и производных (ДТГ) кривых (рис. 9) делается вывод, что полученный ПОБ В демонстрирует одну стадию разложения в условиях непрерывного и однородного процесса. Профиль кривой ТГ (рис. 9А) указывает на то, что этот термически стабильный сополимер в диапазоне температур 35,0–254,540 °С, достигший Td 1% 266,2 °С (температура, при которой происходит потеря веса 1%) при 23,58 мин. Он продолжается с незначительными потерями массы с течением времени до достижения T Впоследствии материал начинает разлагаться с начальной температурой разложения Td (Tonset) 283,1 °С и конечной температурой разложения (Tendset) 296,98 °С. В этом диапазоне температур всего за 2 мин соединение теряет около 72% своего веса с максимальной Td 290,114 °С, при которой достигается максимальная скорость разложения (рис. 9Б). В Тендсете наблюдается потеря массы 86% и потеря примерно 90% массы в диапазоне температур от 253,376 °С до 308,084 °С.

Б

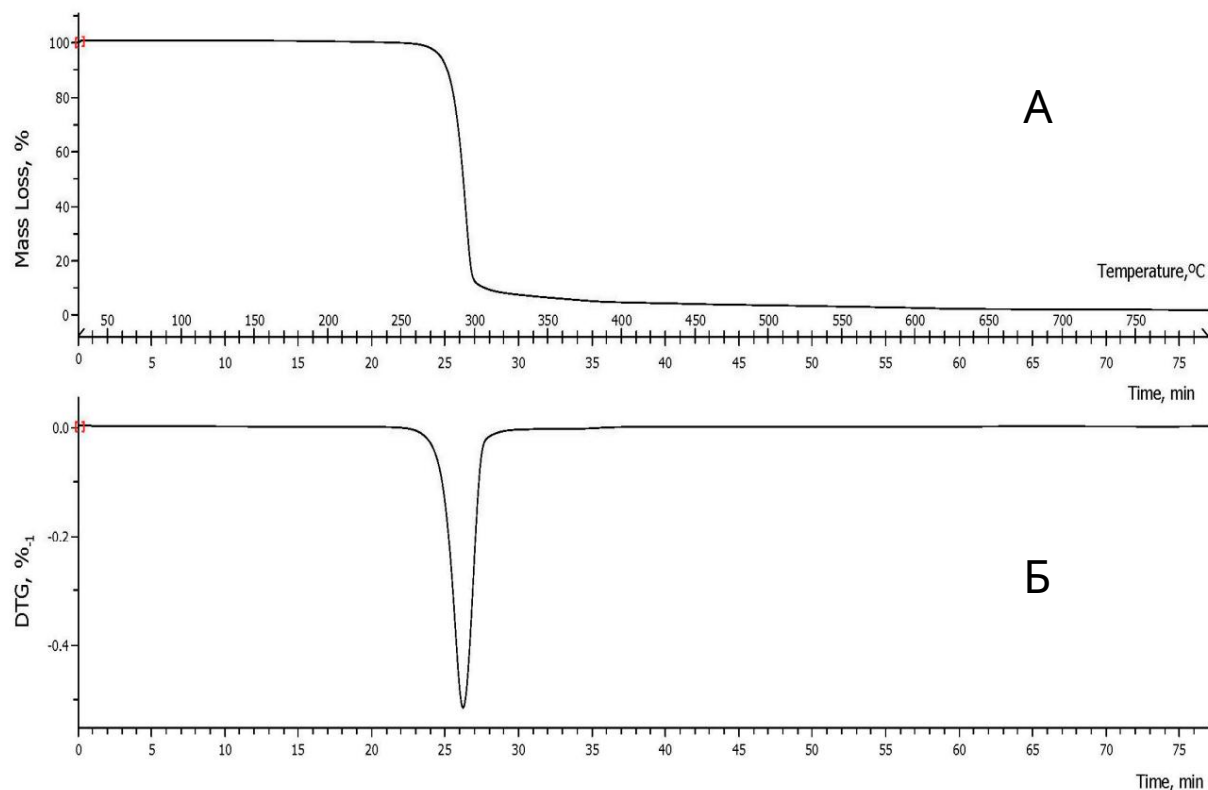


Рис. 9. Кривые термодинамики (ТГ) (А) и ее производной (ДТГ) (Б) образца ПГ Б В, синтезированного *B. megaterium* LVN01 из диэгестата биогаза.

Сравнивая эти результаты с результатами Gómez et al. (2020), которые сообщили о T_d 266,2 °C и потере массы 97,7% в диапазоне температур от 230 °C до 300 °C для ПГ Б, синтезированного *B. megaterium* с использованием остаточного глицерина в качестве субстрата [24], можно сделать вывод, что *B. megaterium* адаптирует свою биохимическую архитектуру метаболизма диэгестата биогаза, производя РНА с лучшими физическими свойствами, чем тот, который синтезируется бактериями при использовании остаточного глицерина. В этом контексте особенно важна термостабильность материала, что связано с T_d , ПГ А с низкими температурами плавления и/или более высокими значениями термостабильности, что более желательно [34]. Заметная разница между значениями T_d , зафиксированными для ПГ А, синтезированного *B. megaterium*, по отношению к диэгестату биогаза ($T_d = 290,114$ °C) и остаточному глицерину ($T_d = 266,2$ °C).

Следовательно, можно сделать вывод о наличии двух различных химических структур, которые дополняют результаты ГХ-МС и ЯМР.

В любом случае T_d (290,114 °C) исследуемого ПГ Б В превышает приведенные в литературе максимальные значения T_d для ПГ Б: 220 °C [34], 252 °C [35] и 280 °C [36], среди других. С другой стороны, несмотря на их превышение, они ближе к значениям T_d , указанным для PHBV: 279,236 °C [34], 285,9 °C [37] и 286 °C [37] и других.

ДСК-анализ биополимера, синтезированного *B. megaterium* LVN01 из диэгестата биогаза, выявил три экзотермических тепловых явления (рис. 10). Два наиболее значимых имеют температуры плавления $T_m1 = 143,01$ °C и $T_m2 = 155,7$ °C и энтальпии плавления (ΔH_f) = 1,541 Дж/г и (ΔH_f) = 19,80 Дж/г. Эти результаты согласуются с результатами других исследований; например, Аббаси и др. [38] получили PHBV при ферментации молочного навоза с смешанными микробными консорциумами (ММС) с содержанием ЗНВ от 16% до 24% и сообщили, что некоторые из экстрагированных PHBV показали две температуры плавления (T_m); самая низкая T_m1 колебалась от 126,1 °C до 159,7 °C, а самая высокая T_m2 колебалась от 152,1 °C до 170,1 °C.

е паре о г-. Эти результаты исследований согласны с тем, что они проигрывают друг другу исследованиям например, А66 аси и др. [38] полу чили РНВВ пу тем ферментации молочного навоза с смешанными микробными консорциумами (ММС) с содержанием НВВ от 16% до 24% и сообщили, что некоторые из экстрагированных РНВВ показали две температуры плавления (Тм); самый низкий Тм1 колебался от 126,1 до 159,7 °С, а самый высокий Тм2 колебался от 152,1 до 170,1 °С.

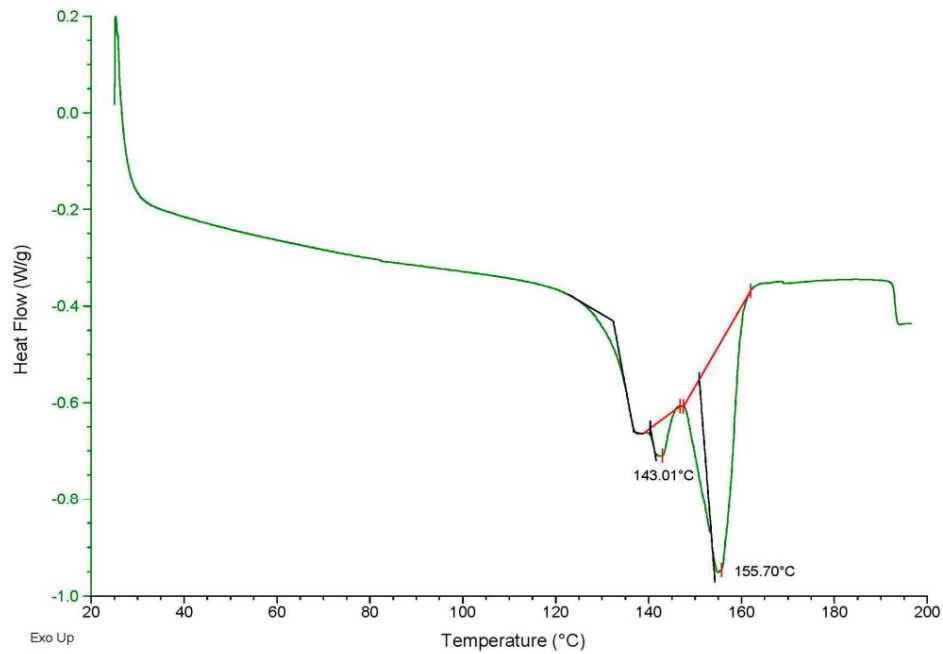


Рис. 10. ДСК-термограмма образца ПГБВ, синтезированного в мегатерииу LVN01 из дигеста биогаса (электривар). Красная линия показывает изменение температуры между двумя термическими событиями. Черная линия соответствует температуре стеклования

АвторыAbbasi et al. [39] указываю, что наличие явлений изоморфизма может приводить к наличию двух пиков слияния[38–40]. Поскольку ПГБВ имеет полукристаллическую структуру, кристаллы с более высоким содержанием НВВ будут иметь более высокое соотношение аморфных фаз и, следовательно, будут плавиться первыми при нагревании (Тм1). В кристаллах с меньшим содержанием НВВ степень кристалличности выше, поэтому кристаллы будут плавиться при более высокой температуре (Тм2) [39,41].

Степень кристалличности Xcr (%) рассчитывали по значениям записанных в калориметрической кривой (ДСК) с использованием уравнения

$$X_{кр}(\%) = 100 \times \frac{H_f}{H_c}$$

где:

Hf: энтальпия плавления ПГБВ, продуцируемого в мегатерииу LVN01; Hc: Энтальпия плавления чистого ПГБВ, эквивалентная 109 Дж/г [42].

Расчеты, связанные с наибольшим объемом, показали Xcr = 18,17% для ПГБВ, полученного при экспериментальных параметрах настоящего исследования, что ниже, чем полученное для биополимера (ПГБВ), синтезированного тем же видом (В. megaterium LVN01) из остаточного глицерина, достигший Xcr = 35,7% [24]. Другие авторы сообщают о значениях Xcr для ПОБ в диапазоне от 30% до 60% [43–45].

4. Дискуссия

Максимизация производства биополимеров типа РНА посредством микробной биотрансформации различных субстратов стала важнейшей областью исследований в условиях растущий спрос на устойчивые альтернативы производству пластмасс. Эта биотехнология ищет экологически чистые и экономически жизнеспособные процессы, которые могут конкурировать с промышленностью пластмасс, получаемых из нефти [46]. Основной проблемой, связанной с коммерческой утилизацией биопластиков, является высокая себестоимость производства, в которой существенно роль играет сырье [20,46–48]. Учитывая это, исследователи обратили свое внимание на поиск экономичных и устойчивых субстратов, особенно остаточной биомассы, которые делают промышленный процесс жизнеспособным

В э том исследовании использование способности *B. megaterium* LVN01 метаболизировать различные субстраты разными путями [12,24,49–52] считалось важным при оценке дигестата биогаса, побочного продукта анаэробного сбраживания отходов. кустарного рыболовства. Ранее он не исследовался или, по крайней мере, об этом не сообщалось в том же смысле, как в э том исследовании.

Наши результаты показывают, что дигестат биогаса, субстратом происхождения, богатым летучими жирными кислотами, является отличным субстратом для роста *B. megaterium* и производства биопластиков PHA-типа. Динамика роста клеток (рис. 1) в условиях данной работы показывает преимущество дигестата биогаса перед остаточным глицерином другим субстратом оцениваемым в аналогичных условиях. Как было замечено, адаптивная фаза *B. megaterium* (LVN01) в дигестате длится 40 часов, что почти вдвое превышает время, о котором сообщалось (24 часа) для того же микробного штамма в остаточном глицерине [50]. Обычно после достижения поздней стационарной фазы или экспоненциальной фазы микробный метаболизм *B. megaterium* начинает накапливать ФГ А [53]. Однако реакция накопления может варьироваться в зависимости от типа субстрата [54]; когда субстратом является дигестат, эффективность накопления ПГБВ возрастает (360 мг ПГБВ/л за 16 ч) на более ранних стадиях. Это можно объяснить стрессовыми условиями, которым он подвергается [54], учитывая, что дигестат является достаточно сложным субстратом. Оптимальная продуктивность *B. megaterium* (LVN01) в дигестате наблюдалась через 16 часов. Напротив, Гомес и др. показали, что *B. megaterium* (LVN01) в остаточном глицерине требуется 48 часов для достижения выхода 137,5 г PHB L-1 с DCW 58,1 мг PHB gcell-1; по истечении э того времени э ти параметры резко уменьшаются.

Отмечено, что в дигестате значения DCW выше, а бактериальные клетки накапливают большее количество ПОВ на грамм биомассы за короткие промежутки времени. Превосходная способность биополимера к хранению очевидно очевидна после первых 24 часов инкубации и остается на относительно высоком уровне до 32 часов (рис. 2). В соответствии с сообщениями других авторов предполагается, что первая стадия ферментации представляет собой период начальной адаптации, в ходе которого бактерии размножаются и увеличивают свою биомассу, прежде чем начать эффективно синтезировать и накапливать ФГ А [53,55–57].

Результаты подтверждают идею о том, что на микробную кинетику сильно влияет химическая природа источника углерода. В отличие от остаточного глицерина, дигестат представляет собой сложную смесь органических соединений, включающую жирные кислоты и другие побочные продукты анаэробного сбраживания органического материала. Эта сложность может означать, что *B. megaterium* (LVN01) требуется больше времени, чтобы адаптироваться к среде и ассимилировать доступные питательные вещества для эффективного роста, что объясняет расширенную кинетику его роста. Кроме того, на ранних стадиях ферментации наблюдается быстрый рост бактерий (более высокий DCW) до того, как бактерии отдадут приоритет синтезу PHBV. Эта обратная зависимость (рис. 4) между биомассой и продукцией ПОВ соответствует тенденции, о которой сообщили другие авторы для *B. megaterium* из других субстратов [11,24,50,58].

В заключение следует отметить, что лаг-фаза (адаптивная фаза) играет решающую роль в ферментации, поскольку она важна для того, чтобы микроорганизм активировал свой метаболизм максимально использовать питательные вещества в культуральной среде. В сложных субстратах, таких как дигестат, *B. megaterium* требует длительного времени акклиматизации, прежде чем он достигнет оптимального роста, тогда как в простых субстратах он может быстро размножаться. Эта информация важна для проектирования и оптимизации процессов ферментации, поскольку время адаптации микробов к субстрату может существенно влиять на продуктивность и эффективность процесса [21]. В э том исследовании *B. megaterium* смогла синтезировать и накапливать ПГБВ в первые часы биопроцесса (16–32 ч), используя дигестат биогаса в качестве источника углерода, что перспективно для эффективного промышленного производства. Между тем э то могло бы снизить зависимость от нефти, невозобновляемого ресурса, а также от дорогих и менее устойчивых источников углерода, таких как сельскохозяйственные культуры [59–63].

Химическую характеристику биополимера, синтезированного *B. megaterium* из дигестата биогаса, проводили с помощью азотной хроматографии с масс-селективным детектором (ГХ-МС) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (1H-ЯМР и 13C-ЯМР).

Результаты получены в настоящем исследовании, демонстрируя способность *B. megaterium* продуцировать ПГБВ из различных субстратов посредством ферментации. Хроматограмму (ГХ-МС) полимерного экстракта (рис. 5) сравнивали с хроматограммой коммерческого стандарта ПОВВ. В обоих случаях наблюдались два основных пика со временем удерживания (RT) 10,9 мин и 14,6 мин, идентифицированные с помощью азиданного ГХ-МС как метиловый эфир 2-бутиновой кислоты и метиловый эфир 3-гидроксипантеновой кислоты соответственно, которые являются характеристиками 3НВ мономера.

Пик более низкой интенсивности, появившийся на 14,1 минуте, связан с метиловым эфиром 2-пентановой кислоты типичным для мономера 3НВ, идентифицированного с помощью данных команд качества 97% (рис. 5б). Они образуются в результате метанолиза 3НВ, в результате чего образуются эфиры C4, и 3НВ, в результате чего образуются эфиры C4 и C5 [33]. Побочными продуктами термической дегградации ПОВВ также являются 2-бутиновая, 3-гидроксипантеновая и 2-пентановая кислоты [64]. Информация, полученная методом ГХ-МС, подтверждает преобладающее присутствие полигидроксипантеновой кислоты, в меньших количествах, полигидроксипантеновой кислоты в экстрактах *B.*

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса позволила нам выявить химическую структуру биополимера, синтезированного *B. megaterium* LVN01 в условиях периодической аэробной ферментации с диэстатом биогенного азота с источником углерода. Спектры ¹H-ЯМР (рис. 7) и ¹³C-ЯМР (рис. 8) очищенного образца ПОВВ и чистого стандарта были схожими, демонстрируя семь типичных сигналов сополимера поли(3-гидроксипантеновой кислоты-3-гидроксипантеновой кислоты) между 0,75 мд. и 5,50 мд., которые связаны с химическими сдвигами (δ) с единицы 3НВ (3-гидроксипантеновой кислоты) и 3НВ (3-гидроксипантеновой кислоты) с

Сигналы ¹H-ЯМР обнаруживают наличие характерных функциональных групп обеих мономерных фракций (3НВ и 3НВ), т.е. $\delta = 5,356-5,363$ мд. (а и а'), относительно протонов метиновой группы (-CH), и $\delta = 2,57-2,59$ мд. и $\delta = 2,69-2,73$ мд. (б и б'), соответствующие протонам метиленовой группы (-CH₂). В частности, с единицы 3НВ имеет $\delta = 1,25-1,26$ мд. и принадлежит метильной группе (-CH₃) (в). С другой стороны, 3НВ приводит к сдвигам при $\delta = 1,73-1,78$ мд. (г) и $\delta = 1,0$ мд. (д), что позволяет сделать вывод о резонансе метиленовых (г) и метильных протонов (д) в боковую цепь (этилен). Эти последние смещения отменяются разницей между мономерами (НВ и НВ) и подтверждают наличие РНВВ. Результаты этого исследования совпадают с результатами других авторов для сополимера ПОВВ [39,65-70].

Результаты анализа ¹³C-ЯМР согласуются с результатами ¹H-ЯМР (рис. 7). Спектр ¹³C-ЯМР представляет сигналы идентифицируемые неэквивалентные атомы углерода в каждом мономере. Для НВ наблюдались углеродные сдвиги при 19,65, 40,68 и 67,52 мд., соответствующие метильной (-CH₃), метиленовой (-CH₂-) и сложной жирной (-O-CH-) группам соответственно. В частности, для НВ сигналы двух метиленовых групп (-CH₂-) наблюдались при 26,74 мд. и 30,82 мд. В этом мономере пик, соответствующий сложной жирной группе (-O-CH-), смещается до 71,90 мд. Наконец, для обоих мономеров (3НВ и 3НВ) представлен резонанс 169,14 мд. атомов углерода карбонильной группы (-C=O). Эти данные совпадают с данными других исследователей [38,39,56,69] и позволяют определить наличие сополимера ПОВВ в полимерном экстракте *B. megaterium*.

Химическая характеристика биополимера *B. megaterium* согласуется с характеристиками, полученными в результате анализа термических свойств биополимера с использованием ТГА (рис. 9) и ДСК (рис. 10). Значения термических свойств ($T_m = 153$

С и $T_d = 290,14$ °C) ПГБВ, продуцируемого *B. megaterium* из диэстата биогенного азота, находятся в пределах значений, измеренных Wang et al. [71], проанализировавшие три ПОВВ, синтезированные *Ralstonia eutropha* из леволиновой кислоты. Исследователи обнаружили температуру плавления (T_m) 101,93 °C, 150,18 °C и 172,05 °C, а также температуры термического разложения (T_d) 284,4 °C, 298,3 °C и 263,4 °C для ПГБВ с 0%, 0,16% и 53% НВ соответственно. Однако процент кристалличности (% X_{cr}) = 18 для исследуемого ПГБВ заметно отличался от показателей, зарегистрированных для ПГБВ с 0% (% X_{cr} = 61,44%), 0,16% (% X_{cr} = 50,34%) и НВ 53% (% X_{cr} = 51,92%). Тем не менее, что касается этого параметра, результаты этого исследования также сопоставимы с результатами Аббаси и др., которые для серии ПГБВ, полученных путем ферментации, сообщили о значениях X_{cr} с помощью ДСК от 16,6% до 29% [39]. В

По их исследованию PHBV с самым низким содержанием ЗНВ (0,16) эрегистировал самый высокий Хсг (29%). Согласно своему исследованию Аббаси и др. [39] и другие исследователи [71] пришли к выводу, что степень кристалличности и температура плавления биополимера уменьшаются с увеличением содержания НВ в полимере, что потенциально приводит к увеличению пластичности и гибкости полимера.

Биополимер, полученный в ходе этого исследования, обладает термодинамическими свойствами, которые отличают его от структуры ПГБ и приближают его к линии ПГБВ. В этом контексте уместно отметить, что, согласно данным литературы при производстве такого сополимера, как ПОБВ, он имеет более низкую температуру плавления и большую гибкость по сравнению с гомополимером ПОБ [72]. Меньшая кристалличность и более низкая температура плавления ПГБВ из *V. megaterium* позволяют предположить значительный процент НВ с более гибкой структурой в порядке. Это согласуется с характеристикой биополимеров с короткой цепью, которые, как известно, имеют более низкую кристалличность и более низкие температуры плавления, классифицируя их как эластомеры и обеспечивая им способность к удлинению при разрыве более 100% [73,74].

В этом исследовании *V. megaterium* LVN01 продемонстрировал свою эффективность по способности производить PHBV из дигестата биогаса, субстрата, богатого летучими жирными кислотами, всего за период ферментации от 16 до 24 часов. Это перспективно для промышленного производства биополимеров, поскольку ПОБВ не только обладает подходящими физическими характеристиками для использования в различных областях промышленности, но и обладает высокой степенью биоразлагаемости, что делает его очень привлекательным в фармацевтической промышленности биополимеров.

Физические характеристики ПОБВ из *V. megaterium* неразрывно связаны с его свойствами биоразложения и легкостью разложения ПОА. На эти процессы разложения влияют специфические химический состав полимера и условия окружающей среды. Сообщается, что деградации объектов, изготовленных из ПГА, варьируются в широких пределах: от нескольких месяцев в почве с устойчивой температурой до нескольких лет в морской среде. Следует отметить, что некоторые типы ПОА, такие как поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерат), заметно страдают от кристалличности, что модулирует скорость их деградации [75].

Потенциал процесса азобной ферментации с использованием системы *V. megaterium* с использованием дигестата биогаса усиливается за счет использования экономичного субстрата для производства биополимеров типа PHA, в частности PHBV. Основные преимущества использования дигестата заключаются в его доступности и низкой стоимости, учитывая, что он является побочным продуктом процесса производства биогаса из остаточной биомассы старого рыболовства в Тунисе, Колумбии. Помимо экономических преимуществ, существование положительных экологических и социальных последствий: во-первых, дигестаты представляют собой альтернативу пластикам, полученным из нефти, которые создают значительные загрязнения во время своего производства и потребляют невозобновляемые ресурсы во втором, отходы рыболовства (рыбные отходы) используются для производства биогаса, а затем из остаточных стоков (дигестата, богатого летучими жирными кислотами) производятся биополимеры типа PHA. Благодаря такому подходу можно избежать загрязнения рыбами отходами, часто сбрасываемыми в море. Все это способствует созданию условий биопереработки отходов, способствуя увеличению добавленной стоимости производственной цепочки старого рыболовства в сообществах, живущих в условиях, а также циркулярной биоэкономике производства биогаса.

Что касается устойчивости субстрата, важно отметить, что старое рыболовство в Тихом океане и регионе Колумбии приводит к образованию большого количества отходов, которые представляют собой ценный источник возобновляемого органического вещества для эффективного производства PHBV посредством ферментации с помощью *V. megaterium*. Таким образом стоимость сырья для крупномасштабного производства ПОБВ может быть значительно снижена, что будет иметь важные последствия с точки зрения экономики и экологической устойчивости.

5. Выводы

Жидкий дигестат, побочный продукт производства биогаса в результате анаэробного сбраживания остаточной биомассы старого рыболовства, представляет собой возобновляемый вторичный субстрат, подходящий для культивирования местных колумбийских бактерий *V. megaterium* LVN01 и

синтез биополимеров типа РНА, в частности сополимера поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV).

В условиях данного исследования система дигестата *B. megaterium* производит значительные количества PHBV всего за 16 часов, при этом производительность PHBV составляет 360 мг/л·ч, что повышает ценность рыбных остатков (внутренностей рыбы). В рамках экономики замкнутого цикла это могло бы укрепить биогазовую биоиндустрию и обеспечить доступность производственной цепочки кустарного рыболовства в Колумбии. Анализ, проведенный на сополимере ПОВ, показывает, что это термостабильный и гибкий. В сочетании с его биоразлагаемостью это предполагает его потенциальную полезность в широком спектре промышленных применений. Однако необходимы дальнейшие исследования для определения процентного содержания мономера HV в полимерной структуре ПОВ, а также дополнительные исследования для становления оптимальных операций биопроцесса.

Дополнительные материалы следуют по ссылке <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol4030072/s1>: Рисунок S1: Окрасивание по Граму *Bacillus megaterium*, инкубированного в бульоне Лурии-Бертани в течение 24 часов; Рисунок S2: Наблюдение окрашенных спор из образцов *Bacillus megaterium* дикого типа, выращенных на питательном агаре в условиях стресса (44 °C) при 100-кратном увеличении; Рисунок S3: Наблюдение под флуоресцентным микроскопом ($\lambda = 510\text{--}560\text{ нм}$) роста *Bacillus megaterium* дикого типа, адаптированного к перевариванию изомогенного резервара биогазовой установки в Тумако. Рост на агаре Нильский красный Б. Окрасивание нильским иним Рисунок S4: Лабораторные эксперименты по росту *B. megaterium* в дигестате при следующих условиях: pH 7,0, температура: 30,8 °C, перемешивание 200 об/мин и три условия соотношения дигестат: MMS 100:0, 80:20, 50:50; Рисунок S5: Кривая роста *B. megaterium* LVN01 в лабораторном масштабе в дигестате биогаза, рабочие условия: 10 мл, 200 об/мин, 30,8 °C, pH 7,0; Рисунок S6: Восстановленный масс-спектр ионного потока для PHBV, полученный в результате ферментации *Bacillus megaterium* LVN01 в дигестате; Таблица S1: Состав жидкого дигестата отходов, представленный исследовательской группой «Экологические перспективы» Национального университета Колумбии — штаб-квартира в Пальмире.

Вклад авторов: концептуализация, ALMM, MY-P., KACC и PEZM; курирование данных, ALMM, MY-P., KACC и PEZM; лаборатория, ALMM, MY-P., KACC и PEZM; методология, ALMM, MY-P., KACC и PEZM; администрирование проекта, ALMM, MY-P. и KACC; ресурсы, ALMM и MY-P.; надзор, ALMM и MY-P.; валидация, ALMM, MY-P., KACC и PEZM; визуализация, ALMM и MY-P.; письмо — первоначальный вариант, ALMM, MY-P. и KACC; написание — рецензирование и редактирование, ALMM, MY-P., KACC и PEZM. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Национальный университет Колумбии: Усиление кустарного рыболовства в колумбийской части Тихого океана Нариненс в целях устойчивого использования ресурсов. Тумако, код Hermes: 49521, BPIN: 2020000100068, Общая система роялти (SGR).

Заявление Институционального наблюдательного совета: Неприменимо.

Заявление об информированном согласии: Не применимо.

Заявление о доступности данных: данные содержатся в статье и дополнительных материалах.

Благодарности: Авторы выражают благодарность Генеральной системе роялти за финансовую поддержку в рамках проекта BPIN 2020000100068. Кроме того, они благодарят директоров Лаборатории химического анализа и процессов окружающей среды Лаборатории природных ядов и Лаборатории биологических процессов в Национальном университете Колумбии, кампус Медельин за сотрудничество и поддержку в предоставлении физической инфраструктуры оборудования, в некоторой степени, основных реагентов для проведения экспериментальных анализов. Мы также выражаем благодарность Лаборатории экологических исследований кампуса Пальмира Национального университета Колумбии, в частности Луису Стелле Кадавиду Родригесу за предоставление образцов дигестата для этого исследования, а также Елене Сташнко, директору лаборатории хроматографии и масс-спектрометрии Национального университета Колумбии. Промышленному университету Сангандера за поддержку в анализе образцов РНА.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Рекомендации

1. Xaso Саннес, МА. Хирургия биопластиков: Un estudio de nichos tecnológicos. Акта Univ. 2020, 30, 1–24. 2. Plastics Europe: обеспечение устойчивого будущего. Пластмассы— краткие факты Информатика. 2023 г. Доступно онлайн: <https://plasticseurope.org/es/plastics-europe-publica-plastics-the-fast-facts-2023/> (по состоянию 20 марта 2024 г.).

3. Саратале, РД; Чо, СК; Саратале, Джорджия Кадам АА; Годакке, Г.С.; Кумар, М; Бхаттарава, RN; Кумар, Г.; Ким Д.С.; Мулла, С.И.; и другие. Всесторонний обзор последние достижения в области производства полигидроксикарбоанатов (ПГА) с использованием разнотипных потоков органических отходов. Биоресур. Технол. 2021, 325, 124685.

4. Соң ЮДж; Ким ХТ; Баритуго, Калифорния Джо, С.Ю Песня, НМ; Парк, ЮЮ Парк, СК; Пё, Дж; Ча, ХГ; Ким Х.; и другие. Последние достижения в устойчивой переработке пластика и биополимерах. Биотехнология. 2020, 15, 1900489. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

5. Организация Объединённых Наций. Все, что вам нужно знать, чтобы избавиться от загрязнения пластиком Программа ONU для окружающей среды Доступно онлайн: <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-contaminacion-por-plasticos> . (по состоянию 25 апреля 2023 г.).

6. Григоре, МЭ; Григореску, РМ Янку, Л.; Иоан, Р.М; Захария, К.; Андрей Е.Р. Методы синтеза, свойства и биомедицинское применение полигидроксикарбоанатов: Обзор. Биоматериалы. 2019, 30, 695–712. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

7. Мадхумита Джаганмохан. Доступно онлайн: <https://www.statista.com/about/our-research-commitment/2234/madhumitha-> [Джаганмохан](#) (по состоянию 20 марта 2024 г.).

8. Анджум А; Зубер, М; Зия, К.М; Нурин А; Анджум Миннеотта; Табасум С. Микробиологическое производство полигидроксикарбоанатов (ПГА) и его сополимеров: обзор последних достижений. Между. Ж. Биол. Макромо. 2016, 89, 161–174. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

9. Кань Л; Стахевич, У. Разработка и преимуществ биоразлагаемых полимеров ПГА на основе электроформованных волокон ПГА для тканевой инженерии и других биомедицинских применений. АКС Биоматериалы. 2021, 7, 5339–5362. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

10. Коллер М Производство биополиэфиров полигидроксикарбоанатов (ПГА) экстремофилами. МПолиматериалы. 2017, 1, 1–19. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

11. Кэпел, Эй Джей; Киббл уайт, РЕ; Сиккема, штат Вашингтон; Торрес, ЛФ; Харт-Купер, В.М; Ортс, WJ; Ли, К.С. Производство сополимеров полигидроксикарбоаната, содержащих 4-гидроксипутират, в сконструированной *Bacillus megaterium*. Между. Ж. Биол. Макромо. 2021, 168, 86–92. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Саннес Мрено, SA; Марин Мнгоя Мссачу сетс; Мра Мартинес, Алабама; Йенес Перес, MDS. Идентификация полигидроксикарбоанатов продуцирующие бактерии в почвах, загрязнённых твердыми отходами. Преподобный Коломб. Де Биотехнология. 2012, 14, 89–100.

13. Дхангхрия, Дж Х.; Дубей, С.; Триведи, НВ; Панна, И.; Бхатт, Дж К.; Дэйн, ВР; Миша, С. Полигидроксикарбоанат из морской *Bacillus megaterium* с использованием морской смеси CSMCRI в качестве новой питательной среды Между. Ж. Биол. Макромо. 2015, 76, 254–261. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Кумар, П.; Рэй, С.; Калия В.К. Получение сополимеров полигидроксикарбоанатов путём регулирования гидролиза биологических отходов. Биоресур. Технол. 2016, 200, 413–419. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Мунир С.; Джамил, Н. Производство полигидроксикарбоанатов (ПГА) в бактериальной совместной культуре с использованием льняных летучих жирных кислот в качестве источника углерода. J. Современная микробиол. 2018, 58, 247–254. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

16. Ниджа Х.; Саванг, СС; Ким Б.С. Производство полигидроксикарбоанатов *Ralstonia eutrofa* из летучих жирных кислот. Корея Дж. Хим. 2013, 30, 2223–2227. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

17. Мартинес, Джорджия Берген, Л; Скома, А; Ребекки, С.; Браунегг, Г.; Фава, Ф. Производство полигидроксикарбоанатов из дефицитных и ферментированных сточных вод оливковых заводов с использованием чистой культуры *Cupriavidus necator*. Биохим. Дж. 2015, 97, 92–100. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

18. Ферре-Гузаль, А; Уингерберн Дж У. Влияние производства полигидроксикарбоанатов с контролируемым составом стабильным свойства материала на темпериодической ферментации. Биохим. Дж. 2019, 141, 35–42. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

19. Герман Краусс, К.; Коллер, М; Мр, А; Фасл, Х.; Стельцер, Ф; Браунегг, Г. Архейное производство со- и терполиэфиров полигидроксикарбоаната (ПГА) из побочных продуктов биодизельной промышленности. Архив. 2013, 2013, 129268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

20. Сирохи, Р.; Панди, JR; Гаур, В.К.; Гансуни, Э.; Синдху, Р. Критический обзор сырья биомассы как устойчивого субстрата для производства полигидроксипутирата (ПГБ). Биоресур. Технол. 2020, 311, 123536. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

21. Вуд, Д.Х.; Вайнман, С.; Тахерзاده, MJ; Оксфорд, Дж; Феррейра, Дж А. Производство полигидроксикарбоанатов (ПГА) с помощью *Bacillus megaterium* с использованием летучих жирных кислот, кислотобразующих в пищевых отходах, полученных в результате ферментации. Биотехнология. 2021, 12, 2480–2498. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

22. Клееребем Р.; Жосс, Б.; Розендал, Р.; Ван Лоосдrecht, МС Анаэробное сбраживание без биогаза? Преподобный Округающий. материал. Биотехнол. 2015, 14, 787–801. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

23. Кадавид-Родригес, ЛС.; Кастро-Лопес, ВЕ; Пласидо, Дж Оценка оптимальных условий ферментации для производства летучих жирных кислот из кукурузных рыльцев. Рез. кв. 2020. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

24. Гомес-Кардозо, младший; Веласко-Бучели, Р.; Марин-Пареха, Н; Рус-Вильядье, ОС; Корреа-Лондоньо, Джорджия Мра-Мартинес, Алабама Периодическое производство с подпиткой и характеристика полигидроксипутирата с помощью *Bacillus megaterium* LVN01 из остаточного глицерина. Дина. 2020, 87, 111–120. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

25. Салазар, А. Оптимальные операционные параметры для производства биопластиков и участия в ремонте возобновляемых материалов; Университет Насьяль Колумбия; Мельнич Колумбия. 2011 г.

26. Рай, АК; Свапна, Х К; Бхаскар, Н; Халами, премьер-министр; Сачиндра, НМ Влияние ферментационного сбраживания на извлечение масла из внутренистых пресноводных рыб. Энзим Микробиол. Технол. 2010, 46, 9–13. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

27. Лопес-Хакме, Ле; Эрнандес-Драң, М; Колин-Кастро, Калифорния Ортега-Пенья, С.; Серон Гонсалес, Г.; Франко-Сендехас, Р. Лас основные принципы работы микробиологической лаборатории. Расследование. Эндискапак. 2014, 3, 10–18.

28. Tinció n de Esporas: Fundamento, Técnicas y Usos. Лайф дер. Доступно онлайн: <https://www.lifeder.com/tincion-de-esporas/> (по состоянию на 18 января 2024 г.).

29. Перес, Р.; Хуарес, М; Родригес, LP Руководство лаборантской микробиологии; Департамент базовой академии наук Микробиологии Национального политехнического института: Перейра, Колумбия, 2011 г.

30. Шикерманн, П.; Рем, Б.Х.; Кальшайер, Р.; Баумейстер, Д.; Штайнфельд, А. Чувствительный метод окрашивания живых непосредственных колоний с использованием нильского красителя для прямого скрининга бактерий, которые накапливают полигидроксикарбоновые кислоты и другие соединения для хранения липидов. Арх. Микробиол. 1999, 171, 73–80. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)

31. Остле, АГ; Холт, Дж. Г. Нильский синий Акакфлуоресцентное пятно для поли-бета-гидроксibuтирата. Прил. Окружающая среда. Микробиол. 1982, 44, 238–241. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

32. ИСО 12966-2:2017; Животные и растительные жиры и масла. Газовая хроматография метиловыхэфиров жирных кислот. Часть 2. Полушение метиловыхэфиров жирных кислот. Международная организация по стандартизации: Женева, Швейцария, 2017 г.

33. Прадхан, С.; Дикшит, ПК; Мхалкар В.С. Производство, характеристика и применение биоразлагаемого полимера: полигидроксикарбоанатов. В достижениях в области устойчивых полимеров: синтез, изотопление и характеристика; Спрингер: Сингапур, 2020 г.; стр. 51–94.

34. ЛяДж; Чжао, Ю.Диао, М; Ван, В; Хуа, В; Ву, С.; Чен, П.; Руан, Р.; Чен, Ю. Производство поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата) Rhodospirillum rubrum с использованием двухэтапной стратегии культивирования. Дж. Хим. 2019, 2019, 8369179. [\[CrossRef\]](#)

35. Якич, М; Врандич, НС.; Эрцер, М. Термическое разложение смесей поли(3-гидроксibuтират)/поли(этиленоксид): термодинамический и кинетический анализ. Евро. Полимер. Дж. 2016, 81, 376–385. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

36. Вахаби, Х.; Мишли, Л; Мрахдани, Г.; Агбари, В; Кочез, М; Вагнер, К.; Ренар, Э.; Сааб, MR; Ланглуа, В. Термическая стабильность и воспламеняемость композитов на основе поли(3-гидроксibuтирата) (ПГБ). Материалы 2019, 12, 2239. [\[CrossRef\]](#)

37. Тире, Р.М; Аруда, ЖК; Баррето, Л.С. Микробиология и термические свойства нанокмозитов поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерат)/аттапулгита. Матер. Рез. 2011, 14, 340–344. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

38. Аббаси, М; Коутс, скорая помощь; Макдональд, А.Г. Экстракция элементарных характеристик свойств поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата), биосинтез и использование смешанных микробных консорциумов, скормливаемых ферментированным молочным навозом Биоресурс. Технол. Отчет 2022, 28, 101065. [\[CrossRef\]](#)

39. Аббаси, М; Похрел, Д.; Коутс, скорая помощь; Гуо, НьюМексико; Макдональд, А.Г. Влияние содержания 3-гидроксивалерата на термические, механические и реологические свойства поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата) биополимеров, полученных из ферментированного молочного навоза. Полимеры 2022, 14, 4140. [\[CrossRef\]](#)

40. Гуо, НьюМексико; Похрель, Д.; Аббаси, М; Макдональд, АГ; Альфаро, М; Бринманн, КК; Коутс, ЭР. Пилотное производство поли-3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерата из ферментированного молочного навоза: характеристики процесса, характеристики полимера и последствия для масштабирования. Биоресурс. Технол. Отчет 2020, 12, 100588. [\[CrossRef\]](#)

41. Соу, а.Джунор, ОФ; Стафф, ЛХ.; Коста, ЖК; Чинелатто, МА. Термическое и реологическое поведение бинарных смесей поли(гидроксibuтират-ко-гидроксивалерат) и поли(этиленвинилацетат) с различным содержанием винилацетата. Микропол. Симп. 2019, 383, 1800020. [\[CrossRef\]](#)

42. Чан, СН; Кумерле, К.; Камер, Х. В. Кристаллизация и поведение при плавлении смесей на основе поли(3-гидроксibuтирата). Микропол. хим. Физ. 2004, 205, 664–675. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

43. Бора, Л.; Дас, Р.; Гохайн, Д. Новый стабильный в плавлении биополимер с высокой прочностью на разрыв (полигидроксикарбоанаты) от Bacillus megaterium (MTCC10086) и его характеристика. J. Основная микробиол. 2014, 54, 1012–1016. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

44. Кастильо, Д. Эффект гена fadH1 на производстве PNA Contenido Monomeros Insaturados por Pseudomona Putida; Понификция Университет Хавиана: Богота, Колумбия, 2008 г.

45. Судеш, К.; Абэ, Х.; Дой, Юсингез, строение и свойства полигидроксикарбоанатов: Биологические полиэфирные Прог. Полимер. 2000, 25, 1503–1555. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

46. Вандж; Люс; Хуанг, Дж; Цю, З. Обзор производства полигидроксикарбоанатов из сельскохозяйственных отходов. Биомасса: разведение, достижения, круговой подход и проблемы Биоресурс. Технол. 2021, 342, 126008. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)

47. Косева, МР.; Русбанди, Э. Тенденции в биопроизводстве полигидроксикарбоанатов с акцентом на последующую переработку. Межд. Ж. Биол. Микропол. 2018, 107, 762–778. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)

48. Сонг, Дж; Мерфи, Р.; Нвран, Р.; Дэвис, Г. Биоразлагаемые компостируемые альтернативы обычным пластикам Филос. Пер. Р. Сок. Биол. наук. 2009, 364, 2127–2139. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)

49. Гомес Кардозо, младший; Веласко-Буэли, Р.; Дель Серро, К.; Мата, ИДЛ; Мора Мартинес, Ал. Разработка Bacillus megaterium для улучшения производства РНА из глицерина. Азиатско-Тихоокеанский регион. Дж. Мол. Биол. Биотехнология. 2019, 27, 64–72.

50. Гомес Кардозо, младший; Мора Мартинес, Алабама; Йепес Перес, М; Корреа Лондоньо, Г.А. Производство и характеристика полигидроксикарбоанатов и местных микроорганизмов, синтезированных из жировых отходов. Межд. Дж. Полимер. наук. 2016, 2016, 6541718. [\[CrossRef\]](#)

51. Салазар А; Йепес, М; Корреа, Г.; Мора, А. Производство полигидроксикарбоанатов из неочищенных сахарных субстратов. Дина 2014, 81, 73–77. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

52. Кардона, АС; Мора, Алабама; Мориц М Млекулярная идентификация бактерий, производящих полигидроксикарбоанат, в субпродуктах лактоза и асукара. Преподобный Факт. Нак. Де Агроном. Медельин, 2013 г., 66, 7129–7140.

53. Салганкар, Б.Б.; Мни, К.; Браганса, Дж. М.Х. Характеристика полигидроксикарбоанатов, накопленных умеренногалофильными иоляиз соляной кастри, штамм Bacillus megaterium H16. Дж. Прил. Микробиол. 2013, 114, 1347–1356. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

54. Алкотайни, Б.; Сатъямурти, Э.; Ким Б.С. Потенциал *Bacillus megaterium* для производства полигидроксикалканатов с использованием красных водорослей *Gelidium amansii*. Биотехнология Биопроцесс Инж 2015, 20, 856–860. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
55. Виннакер, М. Полигидроксикалканаты последние достижения в их синтезе и применении. Евро. J. Lipid Sci. Технол. 2019, 121, 1900101. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
56. Чең, GQ; Цзяң, XR; Го, Юсингетическая биология микробов, синтезирующих полигидроксикалканаты (ПГА). Синтез. Сист. Биотехнология 2016, 1, 236–242. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
57. Тиан, П.; Шаң, Л.; Рең, X.; Ми, Ю. Фаң, Д.; Цзяң, М. Биосинтез полигидроксикалканатов: текущие исследования и разработки. Афр. Дж. Биотехнология 2009, 8, 709–714.
58. Кавальейру, ЖМ; Рапоз, РС; Де Алмейда, МСМ; Чезарио, Мнгана; Севриң, К.; Грандфилс, К.; Да Фонсека, М. Влияние параметров культивирования на производство поли(3-гидроксibu тират-ко-4-гидроксibu тират) и поли(3-гидроксibu тират-4-гидроксibu тират-3-гидроксивалерат) *Cupriavidus necator* с использованием отходов глицерина. Биоресурс. Технол. 2012, 111, 391–397. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
59. Рынок полигидроксикалканатов (PHA) по типу (длина короткой цепи, средняя длина цепи), методам производства (ферментация сахара, ферментация растительного масла), применению (упаковка и пищевые услуги, биомедицина) и регионально-глобальному прогнозу до 2028 года. Доступно онлайн: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html?gad_source=1&gclid=Cj0_KCQjwhTwwBhD9ARisAOP0GogViNnhj3GjBVD8HaHD2hI_z9qSSB0dUmUTmNE-rvudbLCIu9nmLCIAAgzzEALw_wcB (последнее обновление 15 мая 2024 г.).
60. Курмар, Р.; Ратур, Р.; Сингх, Р.; Саң, Ю. Панди, А.; Гансуну, Э.; Лиң, Кенгукки; Цанг, округ Колумбия Такур И.С. Биоматериальные полигидроксикалканаты: возможности, проблемы и перспективы. Дж. Чистый. Прод. 2020, 263, 121500. [\[CrossRef\]](#)
61. Абд Эль-Малек, Ф.; Хайри, Х.; Фараг, А.; Омар, С. Устойчивость микробного биопластика, производства и применения. Межд. Дж. Биол. Макромоп. 2020, 157, 319–328. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
62. Лоизиду, М.; Муштакас, К.; Рехаң, М.; Низами, АС.; Табатабаи, М. Новые разработки в области устойчивых систем переработки отходов в энергию. Поддерживать. Energy Rev. 2021, 151, 111581. [\[CrossRef\]](#)
63. Ламберт, С.; Вагнер, М. Экологические характеристики биоразлагаемых и биоразлагаемых пластиков: путь вперед. Хим. Соц. Преподобный. 2017, 46, 6855–6871. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
64. Сян, X.; Вэнь, X.; Миу, X.; Ли, Ю. Чжоу, З.; Чжу, М. Механизм термической деполимеризации поли(3-гидроксibu тират-ко-3-гидроксивалерат). Прогр. Нат. нау. к. Матер. Межд. 2016, 26, 58–64. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
65. Миранда, Д.А.; Мориң, К.; Судмаң, О.; Хеденстрем, М.; Киллагаман, Дж.; Горжас, А.; Брозом, М.; Карлберг, М.; Лундвист, Дж.; Ромеро-Сотол. Йонсоң, Ц.; и другие. Получение и характеристика поли(3-гидроксibu тирата) из *Halomonas boliviensis* LC1, культивированного в гидролизатах стеблей киноа. Ферментация 2023, 9, 556. [\[CrossRef\]](#)
66. Сирохи, Р.; Панди, JP; Тарафдар, А.; Агвал, А.; Чаудхури, СК; Синдху, Р. Экологически устойчивый экологически чистый процесс использования поврежденных зерен пшеницы для производства поли-3-гидроксibu тирата. Окружающая среда. Технол. Иннов. 2021, 21, 101271. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
67. Жуиков В.А.; Жуикова ЮВ.; Мухина, ТК; Мышина ВЛ.; Рукавов А.; Усеинов А.; Войнова В.В.; Бонарцева Г.А.; Берлиң, А.А.; Бонарцев А.П.; и другие. Сравнительная характеристика структурных свойств пленок поли(3-гидроксibu тират-ко-3-гидроксивалерата) при гидролитической и ферментативной деструкции: определение точки перехода в содержании 3-гидроксивалерата. Полимеры 2020, 12, 728. [\[CrossRef\]](#)
68. Мхатра, С.; Паттнаик, С.; Мити, С.; Шарма, С.; Ахтар, Дж.; Пати, С.; Самантарай, ДП; Варма, А. Сравнительный анализ продукции ПОА *Bacillus megaterium* OUAТ 016 при глутаминном и твердотопливном ферментации. Саудовская Дж. Биол. нау. к. 2020, 27, 1242–1250. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
69. Хаң, Дж.; Хоу, Дж.; Чжаң, Ф.; Ай, Г.; Ли, М.; Кай, С.; Лю, X.; Ваң, Л.; Ваң, З.; Чжаң, С.; и другие. Множественные пути снабжения пропионил-ко-А для производства биопластика поли(3-гидроксibu тират-ко-3-гидроксивалерата) у *Haloferax mediterranei*. Прил. Окружающая среда. Микробиол. 2013, 79, 2922–2931. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
70. Ченг, X. H.; Бисвас, А.; Вермилион, К.; Мелендес-Родригес, Б.; Лагарон, JM ЯМР-анализ и распределение триадных последовательностей поли(3-гидроксibu тират-ко-3-гидроксивалерат). Полим. Тест. 2020, 90, 106754. [\[CrossRef\]](#)
71. Ваң, Ю. Чең, Р.; Кай, Дж.; Лю, З.; Чжаң, Ю. Ваң, X.; Ли, К.; Оң, Н. Биосинтез и термические свойства поли(3-гидроксibu тират-ко-3-гидроксивалерат) *Ralstonia eutrofa*. PLoS ONE 2013, 8, e60318. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Фори, Д.; Би, Г.; Кройцер, М.; Венк, К. Новые биоразлагаемые пластики в питании овец. Влияние предварительной обработки поли(3-гидроксibu тират-ко-3-гидроксивалерата) NaOH на усвояемость *in vivo* и исчезновение *in vitro* (Rusitec). Дж. Аним. Физ. Аним. Нутрит. 1999, 81, 41–50. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
73. Эллес, Мнгеро, А.Е.; Гарсия-Эчеверри, Калифорния Mezcla Sinérgica Entre Polihidroxibutirato (PHB) и Caucho Natural (Látex) для Получения сополимера. Бакалаврская диссертация, Университет Картахены, Картахена, Колумбия, 2012.
74. Бархам, П.; Келлер, А.; Огуң, Э.; Холмс, П. Кристаллизация и морфология бактериального термoplasta: поли-3-гидроксibu тират. Дж. Матер. нау. к. 1984, 19, 2781–2794. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
75. Гутьеррес, Г.; Гецабет, М. Производство полигидроксикалканатов для бактерий рода *Bacillus* de Origen Marino. Магистр. Диссертация, Центр биологических исследований, Мадрид, Испания, 2008 г.

Отказ от ответственности/Примечание издателя: Заявления, мнения и данные, содержащиеся во всех публикациях, принадлежат исключительно отдельному автору (ам) и соавтору(ам), а не MDPI и/или редактору (ам). MDPI и/или редактор(ы) не несет ответственности за любой вред людям или имуществу, возникший в результате любых идей, методов, инструкций или продуктов, упомянутых в контенте.