



Artikel

Herstellung von Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) durch *Bacillus megaterium* LVN01 unter Verwendung von Biogas-Gärresten

Amanda Lucía Mora Martínez *, María Yepes-Pérez, Karent Alexandra Carrero Contreras und Paola Eliana Zapata Moreno

Grupo de Producción, Estructura y Aplicación de Moléculas, Fakultät für Naturwissenschaften, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Street 59A #63–20, Medellín 050003, Kolumbien; msyepes@unal.edu.co (MY-P.); kacarreroc@unal.edu.co (KACC); pezapata@unal.edu.co (PEZM)

* Korrespondenz: almora@unal.edu.co

Zusammenfassung: Die in Kolumbien heimische Art *Bacillus megaterium* LVN01 hat die Fähigkeit gezeigt, verschiedene Nebenprodukte oder Industrieabfälle (wie etwa Figue-Saft, Zuckerrohrmelasse und Restglycerin) zu verstoffwechseln und Polyhydroxybutyrat (PHB) anzukoppeln, was ihr Potenzial für die Biokunststoffindustrie verleiht. In dieser Forschung wurde das Potenzial von flüssigem Gärrest als Kohlenstoffquelle für die Herstellung von PHA-Polymeren in Fermentationsprozessen mit diesem Bakterienstamm untersucht. Positiv war, dass *B. megaterium* die Nährstoffe aus diesem Restsubstrat nutzt, um sich angemessen zu vermehren und Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV) effizient zu synthetisieren. Aerobe Batch-Fermentation im Labormaßstab unter den Betriebsbedingungen dieser Forschung [Volumen: 3 l; Temperatur: 30,8 °C; Rühren: 400 U/min; pH-Wert: 7,0 ± 0,2; gelöster Sauerstoff: 100 % Sättigung; Antischaummittel: 10 % (v/v)] erzeugte nach 60 Stunden maximale Trockenzellgewichtswerte (DCW) (0,56 g Zellen L⁻¹), während die maximale PHBV-Ausbeute (360 mg PHBV L⁻¹) nach 16 Stunden auftrat, was für die Produktion nachhaltiger abbaubarer Biokunststoffe sehr günstig ist. Darüber hinaus bestätigten GC-MS- und NMR-Analysen, dass das von *B. megaterium* synthetisierte PHBV-Copolymer aus den Monomeren 3-Hydroxybutyrat (3HB) und 3-Hydroxyvalerat (3HV) besteht. Darüber hinaus deuten die per TGA (Tonset = 283,1 °C; Tendset = 296,98 °C; Td = 290,114 °C) und DSC (Tm = 155,7 °C; ΔHf = 19,80 J g⁻¹; Xcr = 18,17 %) ermittelten thermischen Eigenschaften darauf hin, dass es sich um ein thermisch stabiles Biopolymer mit niedrigem Kristallinitätsanteil handelt, das eine Flexibilität bietet, die die Formgebung, Anpassung und Anwendung in verschiedenen Industriezweigen

Schlüsselwörter: Biopolymere; Polyhydroxyalkanoate (PHAs); Polyhydroxybutyrat (PHB); Polyhydroxyvalerat (PHV); *Bacillus megaterium*; flüssige Gärreste; Fischereibiomasserückstände



Zitat: Martínez, ALM;

Yepes-Pérez, M.; Contreras, KAC; Moreno, PEZ Produktion von Poly(3-

hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)

durch *Bacillus megaterium* LVN01

unter Verwendung von Biogas-

Gärresten. Appl. Microbiol. 2024, 4, 1057–

1078. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030072>

appliedmicrobiol4030072

Wissenschaftlicher Redakteur: Nikolaos

Kopsahelis

Empfangen: 23. März 2024

Überarbeitet: 19. Mai 2024

Akzeptiert: 21. Mai 2024

Veröffentlicht: 9. Juli 2024



Copyright: © 2024 bei den Autoren.

Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz.

Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel vertrieben unter den Bedingungen und

Bedingungen der Creative Commons

Namensnennungslizenz (CC BY)

([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

1. Einleitung

Die industrielle Entwicklung hat der Menschheit große Vorteile gebracht, doch viele ihrer Prozesse und Produkte haben auch negative Auswirkungen auf natürliche Ökosysteme und beeinträchtigen die menschliche Gesundheit und alle anderen Lebensformen. Zu den kritischsten Fällen gehört die Produktion und Verwendung konventioneller Kunststoffe. Diese erschöpfen nicht nur nicht erneuerbare fossile Ressourcen, sondern stellen aufgrund ihrer Zersetzungsbeständigkeit auch eine der Hauptquellen der Umweltverschmutzung dar, was zu einer massiven Ansammlung dieser Schadstoffe in verschiedenen Ökosystemen führt [1].

Wie berichtet wurde [2], stieg die Produktion von Kunststoffen von 1,5 Tonnen im Jahr 1950 auf 250 Tonnen im Jahr 2010 und auf 400,3 Tonnen im Jahr 2022. Das Aufkommen von Kreislaufkunststoffen, die eine Zweitverwendung der vorhandenen Kunststoffe ermöglichen, hat zu einem leichten Rückgang der weltweiten Produktion um fast 10 % geführt [2]. Kunststoffe machen einen großen Teil des Abfalls aus, der in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen entsorgt wird, wo Mikroplastik und Kunststoffinseln gefunden wurden [3,4]. Berichten aus dem Jahr 2019 zufolge verursachte die Plastikverschmutzung 1,8 Milliarden Tonnen Treibhausgasemissionen, was 3,4 % der gesamten weltweit erzeugten Emissionen entspricht [5].

Angesichts dieser Umweltkrise etabliert sich die Produktion von Biokunststoffen, also den grünen Polymeren der Zukunft, als Alternative zum Ersatz von Petrokunststoffen [6]. Diese Polyester werden in drei Typen eingeteilt [1]: Polymilchsäure (PLA), Polybutylensuccinat (PBS) und Polyhydroxyalkanoate (PHAs). Letztere sind die einzigen, die auf natürliche Weise von Bakterien synthetisiert und abgebaut werden und daher natürliche chemische Verbindungen sind, was ihrer industriellen Produktion einen höheren Mehrwert verleiht. Schätzungen zufolge wird ihr weltweiter Markt im Jahr 2023 57,8 Milliarden Dollar erreichen.

Wenn die staatlichen Vorschriften und Richtlinien weiterhin zur Reduzierung von Einwegplastik beitragen, ist es möglich, dass der PHA-Markt bis 2028 um fast 50 % wächst, was einem Volumen von 98,5 Milliarden Dollar entspricht [7].

PHAs sind sekundäre Metabolite einer Vielzahl von Bakterien, Pilzen und einigen Pflanzen, die sie als Energiereserve produzieren und ansammeln, wenn äußere Bedingungen ihr Überleben erschweren [8]. Diese Biopolymere bergen erhebliches Potenzial, konventionelle, petrochemisch gewonnene Kunststoffe zu ersetzen, da sie ähnliche physikochemischen Eigenschaften besitzen und gleichzeitig überlegene Eigenschaften in Bezug auf thermische Verarbeitbarkeit und Biokompatibilität aufweisen. Dies macht sie sehr geeignet für die Herstellung von biomedizinischen, zahnmedizinischen und elektronischen Geräten sowie für den Einsatz in verschiedenen Sektoren, darunter Bauwesen, Automobilbau, Verpackung und Landwirtschaft [3,8]. Aufgrund der biologisch abbaubaren und biokompatiblen Eigenschaften von PHAs erstrecken sich ihre Anwendungsgebiete auf die Herstellung von medizinischen und zahnmedizinischen Geräten. Darüber hinaus werden Tests entwickelt, um die Geweberegeneration und die Produktion von Mikrokügelchen für die Verabreichung von Medikamenten zu stimulieren [9].

Obwohl eine Vielzahl von Mikroorganismen (mehr als 300 Arten) zur Gewinnung einer großen Bandbreite von Biopolymeren eingesetzt wird, wurden aufgrund ihrer höheren Effizienz und Produktionsraten nur wenige Bakterien umfassend auf ihre Eignung zur Herstellung von Biokunststoffen untersucht. Dazu gehören *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Halomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. oleovorans*, *R. eutropha* und *Cupriavidus necator* [10]. Insbesondere das Bakterium *Bacillus megaterium* ist eine hervorragende biologische Maschine zur Herstellung von PHAs, da es über ein robustes Expressionssystem und eine Zellwand ohne Lipopolysaccharide verfügt, was die Freisetzung des von den Bakterien intrazellulär synthetisierten Biopolymers erleichtert [11,12].

Strukturell werden PHAs entsprechend der Zusammensetzung ihrer Monomere in (a) kurzkettige (SCL) PHAs eingeteilt, die aus Monomeren mit 3 bis 5 Kohlenstoffen bestehen, wie Poly-3-hydroxyvalerat [P3HV] und Poly-3-hydroxybutyrat [P3HB]; (b) mittelkettige (MCL) PHAs, mit Monomeren von 6 bis 14 Kohlenstoffen, wie das Copolymer 3-Poly-(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat), bekannt als [3 3(HB-co-HV) oder [p(3HB-co-3HV) oder PHBV; und (c) gemischtkettige (MCM), die die beiden vorherigen kombinieren und daher aus Monomeren zwischen 3 und 14 Kohlenstoffen bestehen, wie im Fall von Poly (3HB co-3HV-co-3HHx). Aus industrieller Sicht stechen PHB und das Copolymer PHBV [9] hervor. Die Länge der Kohlenstoffkette bestimmt die Zerbrechlichkeit derjenigen mit einer kurzen oder flexiblen Kette bei mittelkettigen Beispielen [13].

Die Kettenlänge wird in hohem Maße von der Art des Substrats beeinflusst, das zur Induktion der Produktion von PHAs mikrobiellen Ursprungs verwendet wird. Substrate mit einem hohen Kohlenhydratgehalt stimulieren hauptsächlich die Produktion von SCL-PHA-Polymeren (kurzkettige Polyhydroxyalkanoate), während ein hoher Fettsäuregehalt die Produktion von MCM-PHAs stimuliert. Die am besten untersuchten SCL-PHAs sind jene, die aus P3HB gebildet werden. Um die mechanischen Eigenschaften von P3HB zu verbessern und seine Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern, wurde die Produktion von Heteropolymeren wie PHBV untersucht, das aufgrund des Vorhandenseins des 3HV-Monomers in seiner Struktur bessere Flexibilitätseigenschaften aufweist und so die Eigenschaften von PHB verbessert [9].

Um die Produktion von Copolymeren in Bakterien zu induzieren, werden Kohlenstoffsubstrate verwendet, die Mischungen aus reinen flüchtigen Fettsäuren (VFAs) oder Materialien oder Abwässern mit hohem VFA-Gehalt enthalten. Bakterien der Gattung *Bacillus* synthetisieren Copolymere von PHBV in Nutzpflanzen, denen eine Mischung aus VFA aus der kontrollierten Hydrolyse von Erbsenschalen, Apfeltrester, Zwiebelschalen und Kartoffelschalen zugesetzt wurde [14]. Die Autoren fanden heraus, dass *Bacillus cereus* EGU43, kultiviert auf Erbsenschalenhydrolysaten, das Copolymer von PHBV mit einem 3HV-Gehalt von 1 % w/w akkumulierte.

Die Co-Kultur von *Pseudomona* sp. ST2 und *Bacillus* sp. CS8 in Kulturmedien mit Essig- und Propionsäure als Kohlenstoffquelle, ergänzt mit Glucose, produziert bis zu 35 % PHBV-Copolymer [15]; wenn eine Mischung aus Glucose und Propionsäure verwendet wird, produzieren einzelne Stämme mehr PHAs als wenn Glucose als einzige Kohlenstoffquelle verwendet wird. Mit *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599, gezüchtet in Valeriansäure oder Propionsäure, wird PHBV mit besseren Erträgen im ersten Fall erhalten. *Ralstonia eutropha* KCTC 2658, gezüchtet in einer Mischung aus Essig-, Propion- und Buttersäure im Verhältnis 1:2:2 [16], kann eine PHBV-Produktion von 50 % des DCW erreichen. *Cupriavidus necator*, der in Abwasser mit hohem Gehalt an Essig-, Propion- und Buttersäure gezüchtet wird, produziert ohne Zugabe eines exogenen Substrats eine beträchtliche Menge an PHBV-Copolymer (55 % des DCW) [17]. Kürzlich erzielten Ferre-Guell und Winterburn [18] hohe Konzentrationen an PHBV-Copolymer, indem sie *Haloferax mediterranei* in einer Mischung aus Buttersäure und Valeriansäure unter Zugabe von Tensiden (Tween 80) züchteten, um die Bioverfügbarkeit des Substrats zu erhöhen, mit einer Produktivität von 10,2 mg/L·h bei Batch-Fermentation [18]. Solche Ansätze können möglicherweise die Produktionskosten von PHAs senken und durch die Wiederverwendung von Abfällen Umweltvorteile bieten.

Obwohl die globale Produktionskapazität für biobasiertes PHA jedes Jahr steigt, ist die industrielle Produktion von PHA aufgrund seiner Produktionskosten (ca. 4.000 bis 15.000 US-Dollar pro Tonne) begrenzt, die die Kosten für Polymere auf Basis fossiler Brennstoffe (ca. 1.000 bis 1.500 US-Dollar pro Tonne) deutlich übersteigen [3]. Der Rohstoff (das Substrat) macht etwa 50 % der Gesamtproduktionskosten aus [19]; daher wird die Rentabilität der PHA-Produktion weitgehend durch die Kosten der Rohstoffe, insbesondere der Kohlenstoffquellensubstrate, bestimmt. Dies hängt mit der Tatsache zusammen, dass die Ansammlung von PHA unter aeroben Bedingungen erfolgt und daher ein großer Teil des Substrats bei der mikrobiellen intrazellulären Atmung unter Bildung von CO₂ und wasserlöslichen sekundären Metaboliten verwendet wird. Nur ein Teil der Kohlenstoffquelle, weit weniger als die Hälfte, wird für das zelluläre Biomassewachstum und die PHA-Ansammlung verwendet [19].

Darüber hinaus basieren industrielle PHA-Herstellungsprozesse auf Fermentationstechnologie, bei der teure Substrate (gereinigte Zucker, essbare Pflanzenöle usw.) verwendet werden, die zudem Teil des Haushaltskorbs sind. Daher steht diese Technologie mit der Lebensmittelindustrie in Konkurrenz und verteuert die Gesamtproduktion von PHAs. Daher besteht ein dringender Bedarf an Kohlenstoffquellensubstraten, die die Lebensmittelsicherheit nicht beeinträchtigen, wirtschaftlich und erschwinglich sind und für die nachhaltige Synthese von PHAs nachhaltig sind [3,20].

Als Kohlenstoffquellen für die Produktion von PHAs wurden minderwertige Substrate aus verschiedenen Produktionssektoren bewertet: der Milchindustrie (Käse/Molke, Molkereiabwässer), Öl- und Papierfabriken, landwirtschaftlichen Nutzpflanzen (Ölabwässer aus Palmen/Sojabohnen/Obst) und tierischen Abfällen (Hühner-/Kuhmist) [3]. Dabei handelt es sich jedoch um Substrate, die vorab behandelt werden müssen, um als mikrobielle Kulturmedien verwendet werden zu können, was zusätzliche Kosten verursacht. Aus diesem Grund wurde die Aufmerksamkeit auf die Verwendung von Substraten gerichtet, die einen ersten Nutzen haben, wie die Erzeugung von Biokraftstoffen, insbesondere flüchtigen Fettsäuren (VFA), d. h. Zwischenmetaboliten bei der anaeroben Vergärung (AD) von Restbiomasse, die für die Produktion von Biogas verwendet werden [21]. In diesem Sinne haben die Forscher ihre Aufmerksamkeit auf die Stärkung der VFA-Produktion als Nebenprodukt der Biogasproduktion gerichtet [22]. Kolumbianische Forscher berichteten über eine interessante Arbeit, bei der sie zu diesem Zweck Fischereiabfälle nutzen, mit denen ebenfalls VFA-reiches Gärgut gewonnen wird [23].

Der in Kolumbien beheimatete *Bacillus megaterium* LVN01 hat die Fähigkeit gezeigt, PHAs aus Restglycerin der Biodieselindustrie [24], Johannisbrotfrüchten [25], Rückständen aus der Figue-Verarbeitung (Figue-Saft) [12] und Frittieröl zu produzieren. In dieser Forschung zeigte *B. megaterium* LVN1 die Fähigkeit, PHBV aus flüssigem Gärrest zu synthetisieren, einem Restsubstrat aus der anaeroben Vergärung von Fischvisieren.

In diesem Zusammenhang brachte die Forschungsgruppe PROBIOM (Produktion, Struktur und Anwendung von Biomolekülen) der Universidad Nacional de Colombia ihre Forschungserfahrung in die Produktion von PHAs aus verschiedenen Substraten (Glycerin, Fischsaft, Johannisbrotmark, Frittieröl) ein, um den Abfällen der Fischereiindustrie durch ihre Beteiligung eine zweite Verwendung zu geben.

Teilnahme am Lizenzprojekt „Stärkung der handwerklichen Fischerei im kolumbianischen Nariño Pacific im Hinblick auf eine nachhaltige Nutzung der Ressource. Tumaco“. Im Rahmen des Projekts wurde die erste alternative Verwendung von Fischereiabfällen zur Produktion von Biogas durch die Environmental Prospective Group der Universidad Nacional de Colombia, Hauptsitz Palmira, genutzt. PRO- BIOM verwendet den Gärrest aus dieser ersten Phase als Hauptsubstrat von *B. megaterium* LVN01 zur Herstellung von PHA.

In Kolumbien liefert die handwerkliche Fischerei jährlich rund 12.000 Tonnen Fisch auf den nationalen Markt, das sind 8 % des gesamten Fangs des Landes. Schätzungsweise 45 % des gesamten Fangs der handwerklichen Fischerei werden zu Abfall [23,26], was zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten für diesen Sektor und zu Umweltproblemen im Zusammenhang mit der unzureichenden Abfallentsorgung führt. In Kolumbien werden die Abfälle von Fischerbooten direkt ins Meer geworfen oder an Land gebracht [23].

Die Teilnahme am Projekt „Stärkung der handwerklichen Fischerei im kolumbianischen Nariño-Pazifik im Hinblick auf eine nachhaltige Nutzung der Ressource. Tumaco“, zu dessen Zielen unter anderem die „Steigerung der Nutzung von Fischereiüberschüssen und -abfällen im Nariño-Pazifik“ gehört, bot eine Plattform für diese Initiative. Im Rahmen des oben genannten Ziels liegt der Schwerpunkt zunächst auf der Produktion von Biogas aus Fischereiabfällen durch die Gruppe Environmental Prospective der Universidad Nacional de Colombia mit Sitz in Palmira. Die Autoren dieser Forschung (die PROBIOM-Gruppe) verwenden den Gärrest, ein Nebenprodukt der Anfangsphase, als Hauptsubstrat für das Wachstum von *B. megaterium* LVN01 und die mikrobielle Synthese von PHA, während sie einen neuen, bisher nicht bekannten Abfallstrom erforschen und Fischereiabfällen einen potenziellen Wert zuschreiben.

2. Materialien und Methoden

2.1. Ethikerklärung

Die Ergebnisse dieser Forschung werden gemäß der Vereinbarung über den Zugang zu genetischen Ressourcen und Derivaten Nr. 159, unterzeichnet vom Ministerium für Umwelt und nachhaltige Entwicklung und der Universidad Nacional de Colombia, Resolution 0004, 2. Januar 2018, im Rahmen des Projekts „Produktion und Charakterisierung von Polyhydroxyalkaloiden, die von nativen Stämmen aus organischen Abfällen synthetisiert werden“ dargelegt.

2.2. Untersuchungsgebiet und

Bakterienstamm *B. megaterium* LVN01 (Code GenBank: QJGY00000000.1) wurde von der PROBIOM- Gruppe aus Bodenproben isoliert, die in der Gemeinde Guarne (06°16'50" N und 75°26'37" W, Departement Antioquia, Kolumbien) gesammelt wurden, und zunächst mit molekularen (16S rDNA- Sequenzähnlichkeit), morphologischen und biochemischen Techniken charakterisiert [12]. Die Bakterienkulturen wurden bei 4 °C in Luria-Bertani-Brühe (LB-Brühe, MERCK, Darmstadt, Deutschland) mit 20 % Glycerin (v/v) gelagert.

2.3. Kohlenstoffquelle

Als Substrat für die Fermentation wurde ein flüssiger Rückstand aus der Biogas-Pilotanlage verwendet, die mit Restbiomasse aus Abfällen der handwerklichen Fischerei betrieben wird. Die Anlage befindet sich in der Stadt San Andrés de Tumaco auf dem Gelände der Universidad Nacional de Colombia (in Tumaco, Departement Nariño, Kolumbien). Die Proben wurden von der Forschungsgruppe Environmental Prospective der gleichen Universität im Rahmen des Projekts „Stärkung der handwerklichen Fischerei im kolumbianischen Pazifik von Nariño, hin zu einer nachhaltigen Nutzung der Ressource“ bereitgestellt.

Dieser flüssige Rückstand, bekannt als Gärrest, ist eine wertvolle Quelle für VFA. Zur Konservierung wurde er tiefgefroren bei 4 °C gelagert und vor seiner Verwendung im Prozess durch dickes Papier (Porengröße 20 µm) gefiltert, um Sedimente größer als 20 µm zu entfernen. Dieser Schritt erleichterte die mikrobielle Fermentationsaktivität in dem mit diesem Substrat angereicherten Medium und verhinderte eine Verstopfung der Gerätesensoren, in denen der Prozess durchgeführt wurde.

Die bromatologische Charakterisierung des Gärrestes ergab das Vorhandensein mehrerer Nährstoffe, darunter flüchtige Fettsäuren ($59,04 \pm 0,9$ g/L), mit erheblichen Konzentrationen an Essigsäure

($24,49 \pm 1,82$ g/l), Buttersäure ($11,81 \pm 0,02$ g/l) und Isobuttersäure ($9,36 \pm 0,02$ g/l). Diese Zusammensetzung stellt eine potenzielle Kohlenstoffquelle für *B. megaterium* dar, die für diese Forschung von Interesse ist (Tabelle S1).

2.4. Kulturmedien

Nähragar (Merck, mikrobiologische Qualität, Darmstadt, Deutschland) bestand aus $5,0 \times 10^{-3}$ g/l Pluripepton, $3,0 \times 10^{-3}$ g/l Fleischextrakt, $8,0 \times 10^{-3}$ g/l Natriumchlorid und $15,0 \times 10^{-3}$ g/l Agar mit einem endgültigen pH-Wert von $7,3 \pm 0,2$. Luria-Bertani-Brühe (LB-Brühe, MERCK, Darmstadt, Deutschland) bestand aus 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl, wobei der pH-Wert mit etwa 0,2 ml NaOH (5 N) auf 7,0 eingestellt wurde.

Minimale Mediumsalze (MMS) wurden ergänzt mit KH_2PO_4 (1,5 g/L), Na_2HPO_4 (3,6 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), Hefeextrakt (0,1 g/L), Restglycerin (20 g/L) als Kohlenstoffquelle und 1,0 mL/L Spurenelementlösung (TE), bestehend aus $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,25 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,0 g/L), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,23 g/L), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (0,1 g/L) und 10 mL HCl (35 %), mit einem End-pH-Wert von $7,3 \pm 0,2$.

2.5. Aktivierung des Bakterienstamms und Inokulumpräparation

2.5.1. Aktivierung von *B. megaterium* LVN01

Insgesamt 10 µL der zuvor konservierten Zellen wurden 24 Stunden lang bei 37 °C in LB-Brühe mit 20 % Glycerin auf Nähragarplatten kultiviert. Das Vorhandensein und die Reinheit des Mikroorganismus wurden mittels Gram-Färbung und Sporenfärbung mit Malachitgrün festgestellt. Die PHA-Akkumulationskapazität wurde mittels Nilblau-Färbung verifiziert, die später in diesem Artikel beschrieben wird.

2.5.2. Inokulum-Vorbereitung

Eine Kolonie von *B. megaterium* LVN01 wurde in 10 ml LB-Brühe resuspendiert und 24 Stunden lang in einem Orbitalschüttler (Heidolph Unimax 1010 mit Inkubator 1000, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des aktivierten Mikroorganismus in 50 ml LB-Kulturmedium verdünnt. Die Kulturen wurden 6 Stunden lang in einem Orbitalschüttler (37 °C und 200 U/min) inkubiert oder bis die Lösung in jedem Kolben eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von über 1,0 Einheiten erreichte. Schließlich wurde für das Inokulum eine neue Fermentation mit 100 ml des Vorinokulums und 200 ml MMS-Medium durchgeführt. Die Kultur wurde etwa 24 Stunden lang in einem Orbitalschüttler bei 37 °C und 200 U/min inkubiert, bis die geschätzten OD_{600} -Werte zwischen 0,1 und 0,3 Einheiten lagen.

2.5.3. Charakterisierung von *B. megaterium* und Visualisierung des akkumulierten PHA

Das Gram-Färbeprotokoll [27] wurde verwendet, um die Morphologie der Bakterienzellen von *B. megaterium* LVN01 zu identifizieren. Der gefärbte Objektträger wurde an der Luft trocknen gelassen und unter einem Mikroskop (Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) beobachtet (Abbildung S1). Die Sporenfärbung wurde dann unter Verwendung der Shaeffer-Fulton-Methode [28,29] entwickelt; der Objektträger wurde 2 Minuten lang mit Safranin bedeckt, gewaschen, trocknen gelassen und unter dem Mikroskop beobachtet (Abbildung S2). Die Ansammlung von Polyhydroxyalkanoat (PHA) wurde zunächst mit Nilrot [30] sichtbar gemacht, wobei Kolonien ausgewählt wurden, die unter UV-Licht (340 nm) eine rot-orange Fluoreszenz zeigten und möglicherweise als PHA-Produzenten klassifiziert wurden (Abbildung S3a). Um das Vorhandensein von PHA zu bestätigen, wurden die ausgewählten Kolonien anschließend nach der Methode von Ostle und Holt (1982) [31] mit Nilblau gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 450 nm (Nikon Eclipse 80i, Tokio, Japan) beobachtet. Dieser Prozess ermöglichte die Visualisierung der Biopolymergranulate (Abbildung S3b).

2.6. Aerobe Fermentationsprozesse

Die Bioprozesse wurden in einem 7-l-Bioreaktor mit Rührbehälter (Applikon, ausgestattet mit zwei Rushton-Propellern und einem EZ2-Biocontroller, Serie 2310110012, Delf, Niederlande) durchgeführt, der im Batch-Modus betrieben wurde. Das anfängliche Arbeitsvolumen betrug 3 l (verdünnt

flüssiger Gärrest, MMS und Inokulum im Verhältnis 80:10:10) (Abbildung S4). Die Temperatur wurde auf 30,8 °C, die Rührgeschwindigkeit auf 400 U/min und die Zeit auf 60 h eingestellt. Zu 300 ml MMS wurden 300 ml des *B. megaterium*-Inokulums hinzugefügt, gefolgt von 2,4 l des Gärrests oder der Kohlenstoffquelle. Unter diesen Bedingungen wurde die anfängliche OD600 des Mediums zwischen 0,1 und 0,3 Einheiten aufgezeichnet. Das Fermentationsmedium wurde bei einem pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ gehalten (eingestellt mit HCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland) oder NaOH (MERCK, Darmstadt, Deutschland, 1 M, je nach Bedarf) und der gelöste Sauerstoff wurde auf 100 % Sättigung eingestellt, indem während der Fermentation mehrere Stöße von extra trockenem Industriesauerstoff (1 vvm) durch einen 0,22- μm -Entlüftungsfiter mit einem Sauerstofffluss von 3 l/min injiziert wurden, um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten. Zu Beginn jeder Charge und bei Bedarf wurden Tropfen einer 10 % (v/v) Antischaumlösung aus Silikon (Antioqueña aus der Chemieindustrie, Lebensmittelqualität, Kolumbien) hinzugefügt.

Im Rahmen dieser Studie wurden die von Gómez et al. [24] festgelegten optimalen Betriebsparameter für die PHA-Produktion unter Verwendung von *B. megaterium* LVN01 und Restglycerin als Kohlenstoffquelle in einem 5-l-Bioreaktor angewendet, der im Batch-Modus mit einem effektiven Volumen von 3 l betrieben wurde. Der Anteil des verwendeten Gärrestes (Kohlenstoffquelle) wurde aus einer früheren Laborstudie abgeleitet, die die höchsten Werte von PSC (27,1 mg) und PHA (14,8 mg) nach 36 h während Batch-Fermentationen in 500-ml-Kolben unter Orbitalschütteln (T: 30 °C, 200 U/min), pH: 7,0 und einem MMS-Gärrest-Verhältnis von 20:80 zeigte.

Die Fermentationskinetik wurde 60 Stunden lang überwacht, wobei alle zwei Stunden dreifach Proben (20 ml) entnommen wurden. Das Bakterienwachstum wurde spektrophotometrisch (OD600) gemessen, gefolgt von der Bestimmung des Trockenzellgewichts (DCW) und der Extraktion von Biopolymeren des PHA-Typs.

Jede Probe wurde 10 Minuten lang bei 4 °C mit $10.000 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Kalkberg, Deutschland). Die Bakterienpellets wurden zweimal hintereinander mit 20 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Schließlich wurden die Granulate in 700 μl deionisiertem Wasser resuspendiert und bei -80°C eingefroren, bis sie anschließend lyophilisiert wurden (bei -50°C , 0,01 mBar für 24 h). Die gesammelte Bakterienbiomasse wurde bei 60 °C getrocknet (Binder- Ofen Klasse 2.0, Deutschland), bis sie ein konstantes Gewicht erreichte, und wurde als DCW (Gramm Zellen pro Liter Kulturmedium) angegeben.

2.7. Extraktion und Reinigung von PHA

Das Biopolymer wurde aus der gefriergetrockneten Biomasse nach der Methode von Gómez et al. [24] isoliert. Die trockene Biomasse wurde mit einer Mischung aus 10 % (v/v) Natriumhypochlorit (NaClO , Químicos JM, Medellín, Kolumbien) und Chloroform (CHCl_3) (MERCK, 99 %, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:1,5 behandelt. Die Probe wurde durch leichtes und schnelles Schütteln (Vortex) homogenisiert und 3 h bei 40 °C und 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde sie zentrifugiert ($10.000 \times g$, 10 min, 4 °C), um die Phasen zu trennen. Die organische Phase, die das PHA enthielt, wurde durch dickes Filterpapier gefiltert. Das Filtrat wurde bei Raumtemperatur (27 °C) in einer Sicherheitswerkbank (BIOBASE, Modell BBS-DDC, Serie BBS11V1805175D, Shandong, China, Luftgeschwindigkeit 0,3–0,5 m/s) getrocknet und seine Trockenmasse mithilfe einer Waage (Shimadzu, Serie AUW220D, Kyoto, Japan mit einem Arbeitsbereich von 220 μg bis 1 mg) gemessen.

Zur PHA-Reinigung wurde das Verfahren von Gómez et al. [24] mit einigen Modifikationen befolgt: 500 μl kaltes (0–4 °C) 70% v/v Methanol (JT Baker, GR, Phillipsburg, NJ, USA) wurden zu jedem Röhrchen mit dem trockenen Filtrat gegeben, um die Partikel auszufällen. Die Lösung wurde 12 h lang auf 4 °C gekühlt und dann 10 min lang bei $8000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur (27 °C) in einer Gasabzugshaube verdampft, um das PHA zurückzugewinnen.

Anschließend wurde das Biopolymer (PHA) nacheinander mit n-Hexan (MERCK, GR, Darmstadt, Deutschland), Aceton (MERCK, GR, Darmstadt, Deutschland) und Diethylether (Mallinckrodt, 99,9 %, Saint Louis, MO, USA) gewaschen. Jedes Lösungsmittel (250 μl) wurde tropfenweise zur trockenen PHA-Probe gegeben, gefolgt von Zentrifugation ($8000 \times g$, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag 12 h bei Raumtemperatur (27 °C) luftgetrocknet, um alle Lösungsmittelreste zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde 2- bis 3-mal wiederholt, bis ein fast weißes PHA erhalten wurde, um dessen Reinheit sicherzustellen.

Zur Berechnung des PHA-Verhältnisses auf Grundlage der Menge des kumulierten Trockengewichts, ausgedrückt als Prozentsatz, wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\text{PHA (\%)} = \frac{\text{PHAWicht}}{\text{ZellulärTrockengewicht}} \times 100.$$

2.8. PHA-Charakterisierung

2.8.1. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS/SIM)

Die Analyse der Proben erfolgte nach den Richtlinien ISO 12966-2:2017 [32] mit einigen Modifikationen. Als Referenzstandard wurde Poly(3-Hydroxybuttersäure) (Sigma-Aldrich, Lot: 09217BD-337, St. Louis, MO, USA) verwendet. Die chromatographische Analyse erfolgte auf einem GC AT 6890 Series Plus (AT, Palo Alto, CA, USA), gekoppelt mit einem massenselektiven Detektor (AT, MSD 5973), der im SIM-Modus betrieben wurde. Die Injektion erfolgte im Splitless-Modus (Viny = 2 µL). Die für die Analyse verwendete Säule war 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm DB-5MS 5%-Ph-PDMS.

2.8.2. Kernspinresonanzspektroskopie (1H-NMR und 13C-NMR)

Es wurde ein 600 MHz NMR-Spektrometer verwendet (Bruker, Avance III HD, Stickstoff-TCI-Kryosonde, Topspin Software v3.6.5, 5 mm-Röhrchen, Billerica, MA, USA). Die Probe wurde zuvor durch Auflösen von 30 mg Biopolymer in deuteriertem Chloroform (CDCl₃) hergestellt, und 700 µL Tetramethylsilan (TMS) wurden als interne Kontrolle verwendet.

2.9. Thermische Eigenschaften von

PHA 2.9.1. Differenzial-Scanning-Kalorimetrie

Bei dieser Analyse wurde ein Q2000-Kalorimeter (TA INSTRUMENTS, New Castle, DE, USA) für die Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) verwendet. Für die Analyse wurde eine exakt 5,72 mg schwere Probe (PHA) verwendet. Der Test wurde mit einem Stickstoffstrom als Spülgas von 50 ml/min durchgeführt; anschließend wurde das Gerät für das Material parametrisiert. Es gab eine Stabilisierungsphase bei einer Temperatur von 25 °C, wobei mit einer Geschwindigkeit von 10 °C/min auf 200 °C aufgeheizt wurde.

2.9.2. Thermogravimetrische Analyse Für

die thermogravimetrische Analyse (TGA) wurde ein thermogravimetrischer Analysator TGA/SDTA851e (Mettler Toledo, OH, USA) verwendet, der unter Stickstoffatmosphäre mit einer Flussrate von 40 ml/min betrieben wurde. Eine 10 mg Polyhydroxybuttersäure (PHB)-Probe wurde einem Temperaturbereich zwischen 30 °C und 800 °C mit einer Rate von 10 °C/min ausgesetzt.

2.10. Analyse und Präsentation der Ergebnisse

Alle im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführten Tests wurden dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse werden sowohl in Tabellen als auch in Diagrammen als Median ± Standardabweichung dargestellt. Zur Gestaltung der Diagramme wurde die Software Sigma Plot Version 10.0 (Systat Software, Inc.; Chicago, IL; USA) verwendet, und die statistische Analyse wurde in STATGRAPHICS Centurion Version XVI.II (Statgraphics Technologies, Inc.; The Plains, VA, USA) entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1. Fermentationskinetik

Die Verzögerungsphase der Kultur von *B. megaterium* (LVN01) in Gärresten dauerte fast 40 Stunden, wobei die exponentielle Phase zwischen 40 und 66 Stunden auftrat (Abbildung 1). Das System wurde basierend auf früheren Laborexperimenten unter denselben Betriebsparametern bis zu 60 Stunden lang beprobt (Abbildung S5). Die Proben wurden dreifach ausgewertet, um die Genauigkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Aufgrund der Streuung der Daten wurde jedoch festgestellt, dass

Die Verzögerungsphase der Kultur von *B. megaterium* (LVN01) in Gärresten dauerte fast 40 Stunden, wobei ihre exponentielle Phase zwischen 40 und 66 Stunden auftrat (Abbildung 1). Das System wurde basierend auf früheren Laborexperimenten unter denselben Betriebsparametern bis zu 60 Stunden lang 1064 beprobt (Abbildung S5). Die Proben wurden dreifach ausgewertet, um die Genauigkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Aufgrund der Streuung der Daten wurde jedoch entschieden, dass die Berechnung des Mittelwerts jeder Phase in jeder Versuchsreihe ein vernünftiges Maß für die Datenreproduzierbarkeit liefert. Die Berechnung des Mittelwerts jeder Phase in jeder Versuchsreihe ist ein vernünftiges Maß für die Datenreproduzierbarkeit liefert :

$$\bar{X}_y = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{y}_i \times x_i}{N}$$

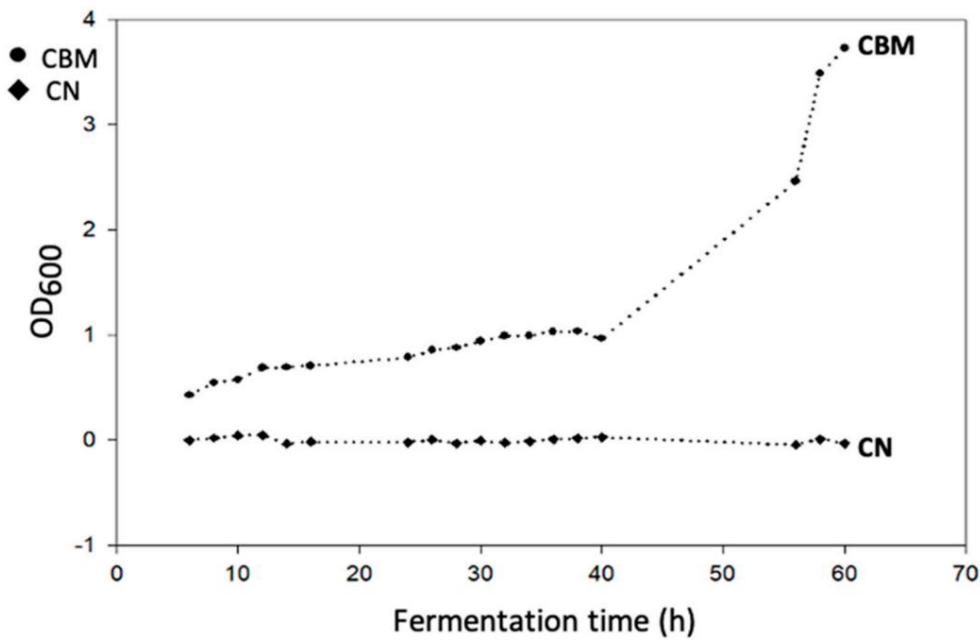


Abbildung 1. Wachstumskurve von *B. megaterium* LVN01 in Biogas-Gärresten (CBM, Kreise) und negativem Kontrollmedium mit Gärresten (CN, Raute). Betriebsbedingungen: 3 l, 400 U/min, 30,8 °C, pH 7.0. Medium mit Gärresten (CN, Raute); Betriebsbedingungen: 3 l, 400 U/min, 30,8 °C, pH 7.0.

3.2. Poly(3-Hydroxybutyrat)-Co-(3-Hydroxyvalerat) (PHBV)-Rückgewinnung 3.2.

Poly(3-Hydroxybutyrat)-Co-(3-Hydroxyvalerat) (PHBV)-Rückgewinnung Die Rückgewinnung des Biopolymers ist entscheidend für die Beurteilung des Erfolgs des Bioprozesses. Die Rückgewinnung des Biopolymers ist für die Beurteilung des Erfolgs des Bioprozesses von entscheidender Bedeutung. DURCH PERSÖNLICHE Gutachten. Unter den Parametern dieser Studie wurden die höchsten PHA- Mengen nach 16 Stunden und 24 Stunden mit Werten von 10,8 mg bzw. 10,3 mg nachgewiesen (Abbildung 2). und 24 Stunden mit Werten von 10,8 mg bzw. 10,3 mg nachgewiesen (Abbildung 2).

Appl. Microbiol. 2024, 4, ZUR BEURTEILUNG

Die optimale Leistung von *B. megaterium* LVN01 im Gärrest wurde nach 16 Stunden erreicht, mit einer PHB-Ausbeute von 2,7 g PHB g Zelle⁻¹ (270 %) und einem DCW von 0,133 g Ly⁻¹ (Abbildung 3). Die Maximalwerte von DCW = 0,563 g Ly⁻¹, die nach 60 Stunden im Fermentationsprozess von *B. megaterium* mit Gärrest erreicht wurden (Abbildung 3), stehen im Gegensatz zur maximalen Produktionsausbeute von PHA (360 mg PHBV Ly⁻¹), die nach 16 Stunden des Prozesses beobachtet wurde. Zwischen Biomasse und PHBV-Produktion ist ein umgekehrter Trend zu beobachten (Abbildung 4).

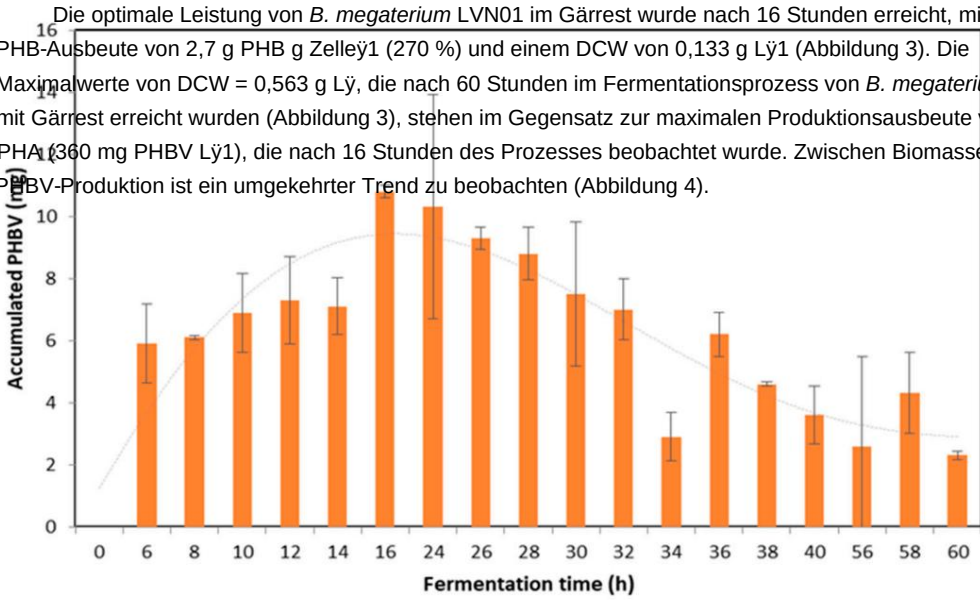
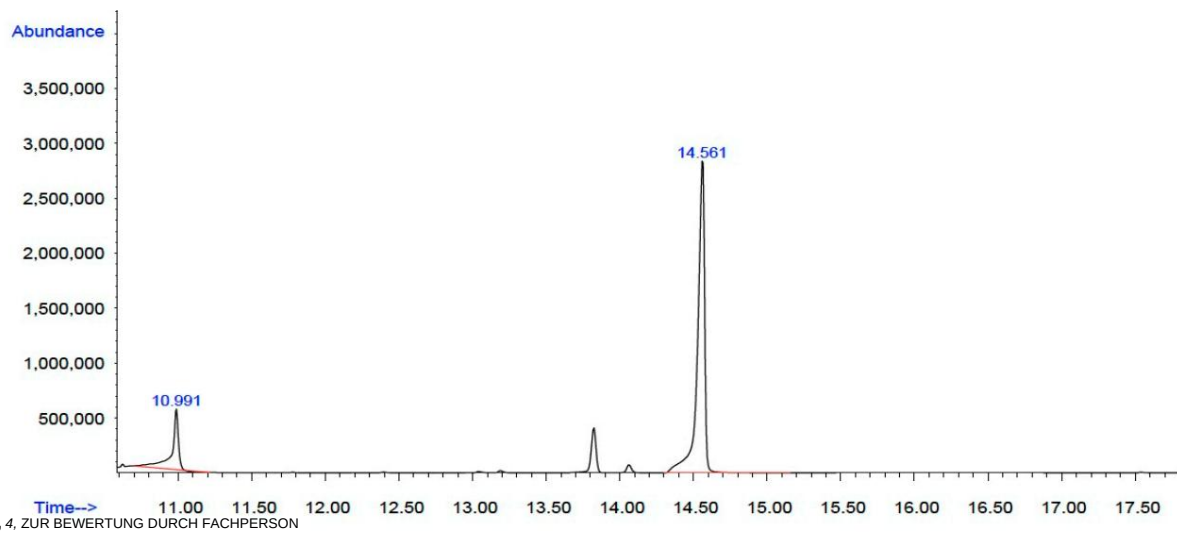


Abbildung 2. Von *B. megaterium* LVN01 unter Verwendung von Biogas-Gärresten angesammeltes PHBV als Funktion der in Stunden (h) ausgedrückten Fermentationszeit. (V: 3 l; t: 60 h; 400 U/min; T: 30,8 °C, pH 7,0). Die gepunktete Linie zeigt die Fermentationszeit in Stunden (h). (V: 3 l; t: 60 h; 400 U/min; T: 30,8 °C, pH 7,0). Die gepunktete Linie zeigt den Akkumulationstrend von PHBV während der Fermentation.

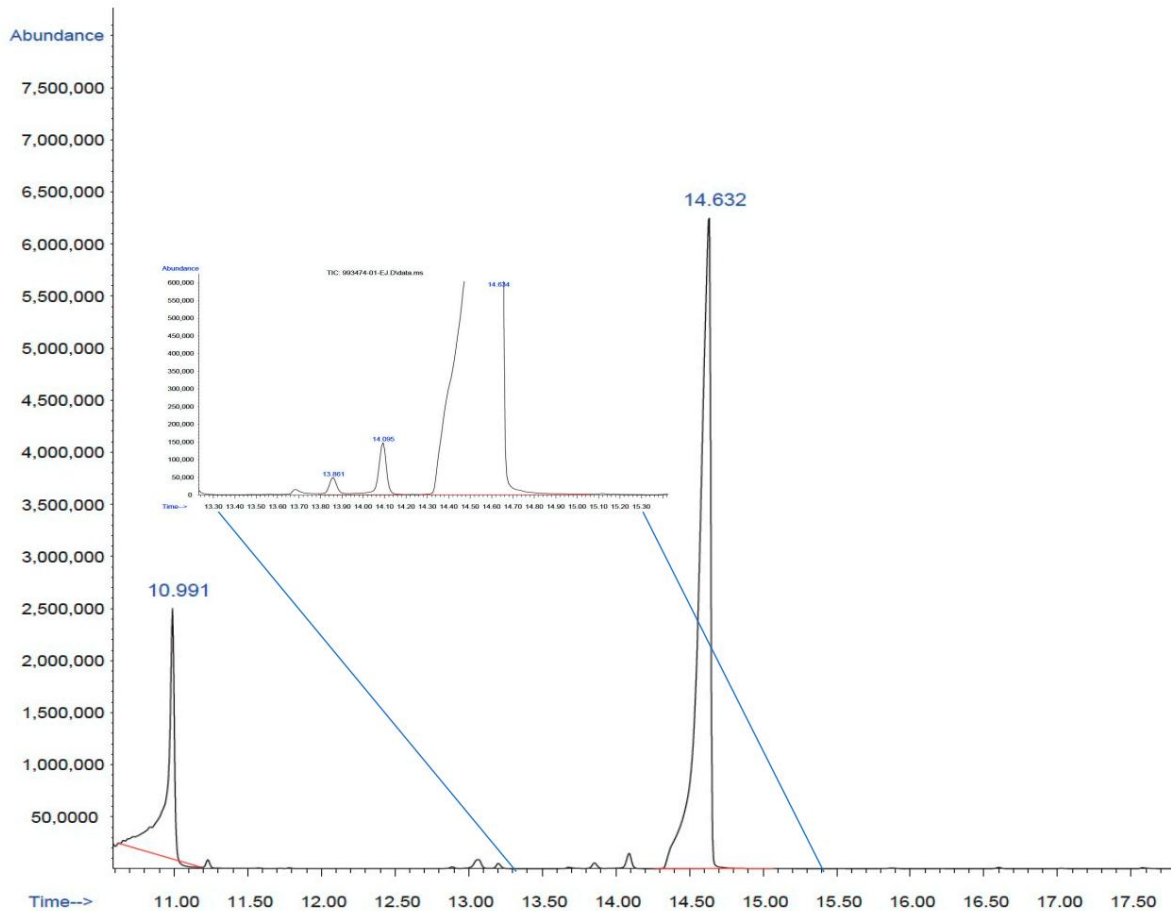
10

3.3.2. Kernspinresonanz-NMR

Um die aus der GC–MS-Analyse abgeleitete chemische Struktur des PHA zu bestätigen, wurde NMR-Spektroskopie (^1H -NMR und ^{13}C -NMR) verwendet. Die Analyseergebnisse zeigten das Copolymer, Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV), das aus den Monomeren 3HB und 3HV besteht (Abbildung 6), was in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GC-MS-Analyse steht.



(A)



(B)

Abbildung 5. Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC–MS): (A) Chromatogramm des handelsüblichen Polymers Poly(3-hydroxybuttersäure-co-3-hydroxyvaleriansäure) (Teilenummer 403121, Sigma-Aldrich, Charge : Charge: MKBL7384V); (B) Chromatogramm des von *B. megaterium* LVN01 MKBL7384V biosynthetisierten Copolymers; (B) Chromatogramm des von *B. megaterium* LVN01 aus Biogas-Gärresten biosynthetisierten Copolymers. Die Vergrößerung zeigt die Werte der drei Peaks, von links nach rechts: Biogas-Gärreste. Die Vergrößerung zeigt die Werte der drei Peaks von links nach rechts: 13,861; 13,861; 14,095 und 14,634. 14,095 und 14,634.

Darüber hinaus wird ein weiterer Peak bei 10,991 min beobachtet, der den in der Analyse verwendeten internen Standard, d. h. Benzoesäureester, darstellt. Das Vorhandensein dieses internen Standards ist unerlässlich, um die Genauigkeit der Quantifizierung und die Konsistenz der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.3.2. Kernspinresonanz (NMR)

Zur Bestätigung der aus der GC-MS-Analyse abgeleiteten chemischen Struktur des PHA wurde NMR-Spektroskopie (1H-NMR und 13C-NMR) verwendet. Die Analyseergebnisse zeigten das Polymer Poly(3-hydroxybuttersäure-co-3-hydroxyvaleriansäure) (Teilenummer 403121, Sigma-Aldrich, Copolymer, Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV), bestehend aus Charge: MKBL7384V). (B) Chromatogramm des von *B. megaterium* LVN01 biosynthetisierten Copolymers, der Monomeren 3HB und 3HV (Abbildung 6); das vollständig mit den Ergebnissen aus Biogas-Gärresten übereinstimmt. Die Vergrößerung zeigt die Werte der drei Peaks, von links nach rechts: GC-MS-Analyse: 13,861, 14,095 und 14,634.

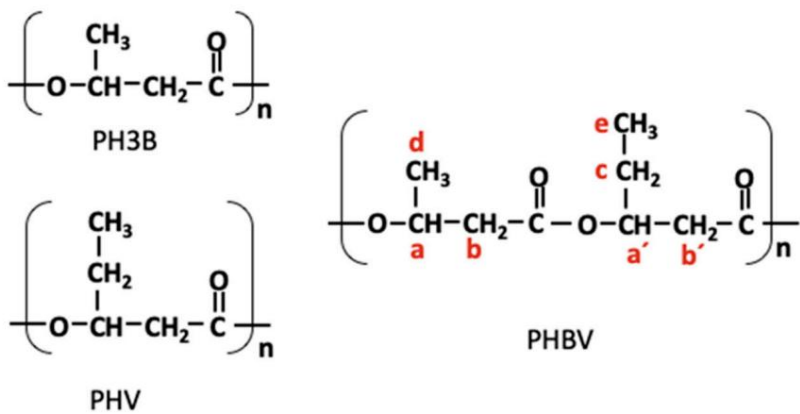


Abbildung 6. Chemische Struktur des PHBV-Copolymers. PH3B: Poly(3-Hydroxybuttersäure); PHV: Poly(3-Hydroxyvaleriansäure); PHBV: Poly(3-Hydroxybuttersäure-co-3-Hydroxyvaleriansäure); n: Wiederholung monomerer Einheiten; a: CH; b: CH2; c: CH2; d: CH3; e: CH3; a': CH; b': CH2.

Das 1H-NMR-Spektrum (Abbildung 7) zeigte charakteristische Signale der PHBV-Verbindung (Tabelle 1). Einige Verschiebungen sind typisch für die beiden Monomere (3HB und 3HV). Diejenigen, die den Unterschied zwischen den beiden Untereinheiten markieren, erscheinen jedoch bei δ 1,73–1,78 ppm, δ 1,38 ppm und δ 1,00 ppm.

Tabelle 1. Charakterisierung von Protonen 1H-NMR.

Art des Protons		Chemische Verschiebung δ (ppm)
'A und ein	Methin (-CH-) in PHV und PHB	5.356 und 5.363
B' und B	Methylen (-CH2) in PHV und PHB	2,59–2,57 und 2,69–2,73
c	Methylen (-CH2) in PHV	1,73–1,78
D	Methyl (-CH3) in PHB	1,38
t	Methyl (-CH3) in PHV	1,00

Das 13C-NMR-Spektrum (Abbildung 8) zeigt die chemischen Verschiebungen der Signale, die den verschiedenen Arten von Kohlenstoffatomen entsprechen, die in der Struktur des durch Fermentation von *B. megaterium* LVN01 erhaltenen Biopolymers vorhanden sind. Durch Vergleich dieser Signale (C=O δ 169,18 ppm; CH δ 67,63 ppm; CH2 δ 40,80 ppm; und CH3 δ 19,77 ppm) mit denen des kommerziellen PHBV-Spektrums und denen, die von anderen Autoren für PHB [24,33] berichtet wurden, kann gefolgert werden, dass *B. megaterium* LVN01 hauptsächlich PHB anreichert, was erhebliche Auswirkungen auf verschiedene biotechnologische und ökologische Anwendungen hat.



Abbildung 7. Aminosäure-Spektren im RSP-Modus, synthetisiert durch die Gärfermentation von *Escherichia coli* (Batch Fermentation) Fermentationsbedingungen: Versuchsplanung mit charakteristischen funktionellen Gruppen dargestellt. (A) (A) keine Zelle Standard (Abbildung S7 (A1, B1)), (B) *S. cerevisiae* (Abbildung S7 (B1, B2)), (C) *B. subtilis* (Abbildung S7 (C1, C2)), (D) *S. cerevisiae* (Abbildung S7 (D1, D2)).

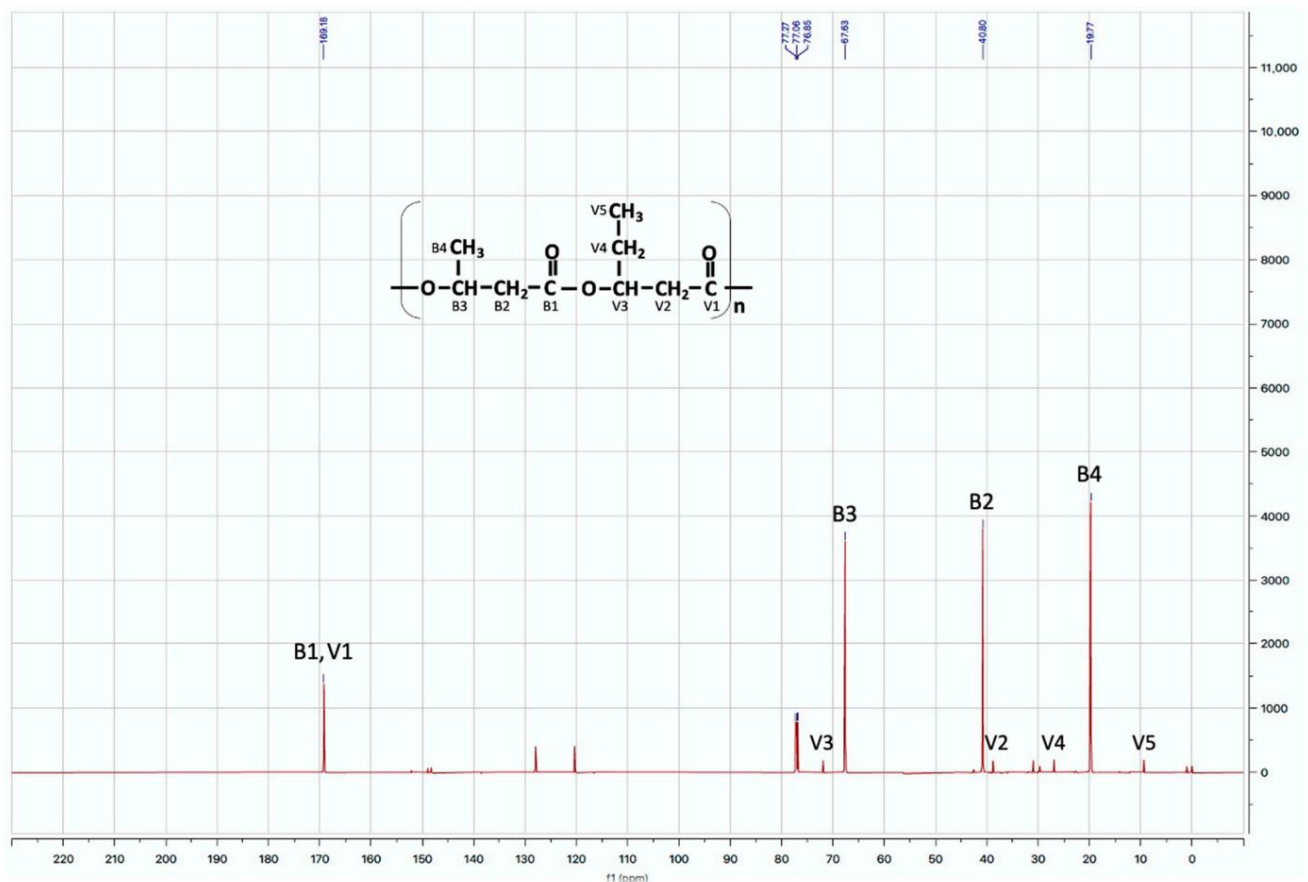


Abbildung 8. ^{13}C -NMR-Spektrum, entsprechend der von *B. megaterium* synthetisierten PHBV-Probe. **Abbildung 9.** ^{13}C -NMR-Spektrum, entsprechend der von *B. megaterium* LVN01 in flüssigem Carrest synthetisierten PHBV-Probe. LVN01 in flüssigem Carrest.

3.4. Bestimmung der thermischen Eigenschaften

Die thermischen Eigenschaften des von *B. megaterium* produzierten PHBV wurden mittels Differenzial-Scanning-Kalorimetrie (DSC) und Thermogravimetrie (TGA) unter einer Stickstoffatmosphäre analysiert.

Die thermische Stabilität des erhaltenen Biopolymers wurde durch thermogravimetrische Analyse ermittelt. Basierend auf den thermogravimetrischen (TG) und abgeleiteten (DTG) Kurven (Abbildung 9) wird gefolgert, dass das erhaltene PHBV eine einzige Zersetzungsstufe in einem kontinuierlichen und gleichmäßigen Prozess aufweist. Das TG-Kurvenprofil (Abbildung 9A) zeigt, dass es sich im Temperaturbereich von 35,0 bis 254,540 °C um ein thermisch stabiles Copolymer handelt, das nach 23,58 min einen Td 1 % von 266,2 °C erreicht (die Temperatur, bei der ein Gewichtsverlust von 1 % auftritt). Es setzt sich mit der Zeit mit geringfügigen Massenverlusten fort, bis ein Td 10 % von 280,9 °C erreicht wird. Anschließend beginnt das Material zu zerfallen, mit einer anfänglichen Zersetzungstemperatur Td (Tonset) von 283,1 °C und einer endgültigen Zersetzungstemperatur (Tendset) von 296,98 °C. In diesem Temperaturbereich und in nur 2 Minuten verliert die Verbindung etwa 72 % ihres Gewichts, mit einer maximalen Td von 290,114 °C, bei der die maximale Zersetzungsrage erreicht wird (Abbildung 9B). Im Tendset wird ein Gewichtsverlust von 86 % beobachtet, und im Temperaturbereich von 253,376 °C bis 308,084 °C gehen etwa 90 % der Masse verloren.

B

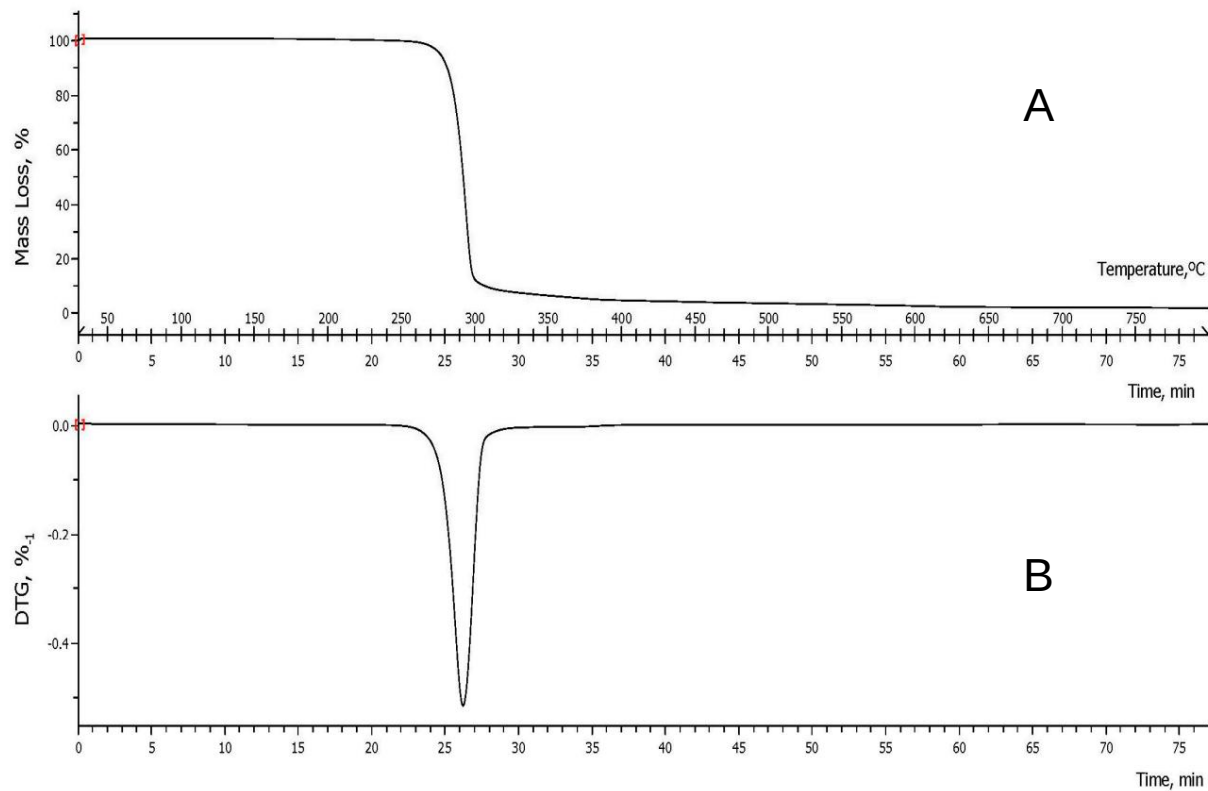


Abbildung 9. Kurven des Thermogramms (TG) **(A)** und seiner Ableitung (DTG) **(B)** der von *B. megaterium* LVN01 aus Biogas-Gärresten synthetisierten PHBV-Probe.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von Gómez et al. (2020), die für von *B. megaterium* unter Verwendung von Restglycerin als Substrat synthetisiertes PHB einen Td von 266,2 °C und einen Gewichtsverlust von 97,7 % im Temperaturbereich von 230 °C bis 300 °C berichteten [24], kann der Schluss gezogen werden, dass *B. megaterium* seine biochemische Batterie anpasst, um Biogasgärreste zu verstoffwechseln, und dabei ein PHA mit besseren physikalischen Eigenschaften produziert als das von den Bakterien unter Verwendung von Restglycerin synthetisierte. In diesem Zusammenhang ist die thermische Stabilität des Materials besonders wichtig, die mit dem Td verbunden ist. PHAs mit niedrigen Schmelztemperaturen und/oder höheren thermischen Stabilitätswerten sind wünschenswerter [34]. Der deutliche Unterschied zwischen den für das von *B. megaterium* synthetisierte PHA aufgezeichneten Td-Werten im Hinblick auf Biogas-Gärreste (Td = 290,114 °C) und Restglycerin (Td = 266,2 °C) lässt uns auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher chemischer Strukturen schließen, was die Ergebnisse von GC-MS und NMR ergänzt.

In jedem Fall liegt der Td-Wert (290,114 °C) des untersuchten PHBV über den in der Literatur für PHB berichteten maximalen Td-Werten: 220 °C [34], 252 °C [35] und 280 °C [36], um nur einige zu nennen. Obwohl er diese Werte überschreitet, liegt er andererseits näher an den für PHBV berichteten Td-Werten: 279,236 °C [34], 285,9 °C [37] und 286 °C [37], um nur einige zu nennen.

Die DSC-Analyse des von *B. megaterium* LVN01 aus dem Biogas-Gärrest synthetisierten Biopolymers ergab drei exotherme thermische Ereignisse (Abbildung 10). Die beiden bedeutendsten haben Schmelztemperaturen von $T_{m1} = 143,01\text{ °C}$ und $T_{m2} = 155,7\text{ °C}$ sowie Fusionsenthalpien von $(\Delta H_f) = 1,541\text{ J g}^{-1}$ und $(\Delta H_f) = 19,80\text{ J g}^{-1}$. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein; beispielsweise gewannen Abbasi et al. [38] PHBV durch Fermentation von Milchviehmist mit gemischten mikrobiellen Konsortien (MMC) mit 3HV-Gehalten zwischen 16 % und 24 % und berichteten, dass einige der extrahierten PHBV zwei Schmelztemperaturen (T_m) aufwiesen; Die niedrigste T_{m1} -Temperatur lag zwischen 126,1 °C und 159,7 °C, und die höchste T_{m2} -Temperatur schwankte zwischen 152,1 °C und 170,1 °C.

Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein. Beispielsweise haben Abbasi et al. [38] PHBV durch Fermentation von Milchviehmist mit gemischten mikrobiellen Konsortien (MMC) mit 3HV-Gehalten zwischen 16 % und 24 % gewonnen und berichteten, dass einige der extrahierten PHBV zwei Schmelztemperaturen (T_m) aufwiesen. Die niedrigste T_{m1} lag zwischen 126,1 °C und 159,7 °C und die höchste T_{m2} variierte zwischen 152,1 °C und 170,1 °C.

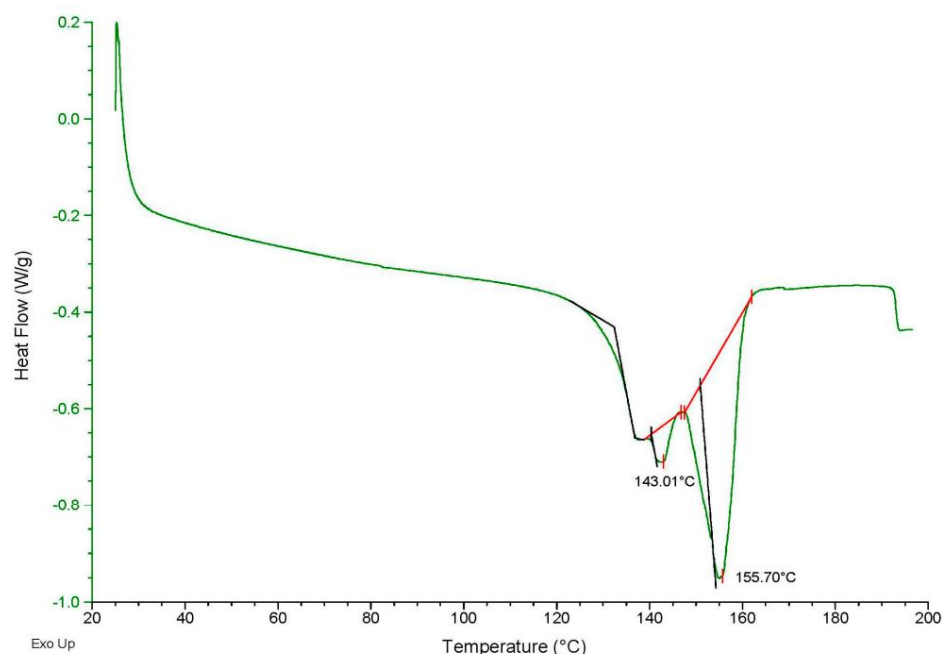


Abbildung 10. DSC-Thermogramm der von *B. megaterium* LVN01 aus Biogas-Gärresten synthetisierten PHBV-Produkte (grüne Kurve). Die rote Linie zeigt die Temperaturänderung zwischen dem mehrphasigen Ereignis. Die schwarze Linie entspricht dem Glasübergang.

Die Autoren Abbasi et al. [39] weisen darauf hin, dass das Vorhandensein von Isomorphiephänomenen zum Auftreten von zwei Schmelzspitzen führen kann [38–40]. Da PHBV eine teilkristalline Struktur hat, haben Kristalle mit höherem HV-Gehalt ein höheres amorphes Phasenverhältnis und schmelzen daher beim Erhitzen zuerst (T_{m1}). In Kristallen mit geringerem HV-Gehalt ist das Kristallinitätsverhältnis höher, sodass die Kristalle bei einer höheren Temperatur (T_{m2}) schmelzen [39,41].

Der Kristallinitätsgrad X_{cr} (%) wurde aus den im kalorimetrischen Kurve (DSC) mit der Gleichung:

$$X_{cr}(\%) = 100 \times \frac{\dot{y}_H f}{\dot{y}_H f \dot{y}}$$

Wo:

$\dot{y}_H f$: Fusionsenthalpie von PHB, das von *B. megaterium* LVN01 produziert wird; $\dot{y}_H f$: Fusionsenthalpie von reinem PHB, äquivalent zu 109 J g⁻¹ [42].

Die mit dem signifikantesten Ereignis verbundenen Berechnungen ergaben einen X_{cr} -Wert von 18,17 % für das unter den Betriebsparametern dieser Untersuchung erhaltene PHBV, der niedriger ist als der für das von der gleichen Art (*B. megaterium* LVN01) aus Restglycerin synthetisierte Biopolymer (PHB), das einen X_{cr} -Wert von 35,7 % erreichte [24]. Andere Autoren haben X_{cr} -Werte für PHB im Bereich von 30 % bis 60 % angegeben [43–45].

4. Diskussion

Die Maximierung der Produktion von PHA-artigen Biopolymeren durch die mikrobielle Biofermentation verschiedener Substrate ist zu einem entscheidenden Forschungsgebiet geworden angesichts der wachsende Nachfrage nach nachhaltigen Alternativen für die Produktion von Kunststoffen. Diese Bioindustrie sucht nach umweltfreundlichen und wirtschaftlich tragfähigen Prozessen, die mit der erdölbasierten Kunststoffindustrie konkurrieren können [46]. Das Hauptproblem bei der kommerziellen Entsorgung von Biokunststoffen sind die hohen Produktionskosten, zu denen die Rohstoffe erheblich beitragen [20,46–48]. Vor diesem Hintergrund haben sich Forscher der Suche nach wirtschaftlichen und nachhaltigen Substraten, insbesondere Restbiomasse, zugewandt, die einen industriellen Prozess rentabel machen.

In dieser Forschung wurde die Ausnutzung der Fähigkeit von *B. megaterium* LVN01, verschiedene Substrate über verschiedene Wege zu metabolisieren [12,24,49–52], als wichtig für die Bewertung von Biogas-Gärresten erachtet, einem Nebenprodukt der anaeroben Vergärung der Abfallprodukte der handwerklichen Fischerei. Dies wurde bisher nicht untersucht; oder zumindest wurde darüber noch nicht im gleichen Sinne berichtet wie in dieser Forschung.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Biogasgärreste, ein Substrat aus Resten, das reich an flüchtigen Fettsäuren ist, ein hervorragendes Substrat für das Wachstum von *B. megaterium* und die Produktion von Biokunststoffen des PHA-Typs sind. Die Dynamik des Zellwachstums (Abbildung 1) unter den Betriebsbedingungen dieser Arbeit zeigt den Vorteil von Biogasgärresten gegenüber Restglycerin, einem anderen Substrat, das unter ähnlichen Bedingungen bewertet wurde. Wie beobachtet wurde, dauert die adaptive Phase von *B. megaterium* (LVN01) im Gärrest 40 Stunden, fast doppelt so lange wie die berichtete Zeit (24 Stunden) für denselben mikrobiellen Stamm in Restglycerin [50]. Sobald die späte stationäre Phase oder exponentielle Phase erreicht ist, beginnt der mikrobielle Stoffwechsel von *B. megaterium* normalerweise mit der Ansammlung von PHA [53]. Die Akkumulationsreaktion kann jedoch je nach Art des Substrats variieren [54]. Wenn es sich bei dem Substrat um Gärreste handelt, steigt die Effizienz der PHBV-Akkumulation (360 mg PHBV L⁻¹ in 16 Stunden) in früheren Phasen. Dies kann auf die Stressbedingungen zurückgeführt werden, denen es ausgesetzt ist [54], wenn man bedenkt, dass Gärreste ein ziemlich komplexes Substrat sind. Die optimale Leistung von *B. megaterium* (LVN01) in Gärresten wurde nach 16 Stunden erreicht. Im Gegensatz dazu zeigten Gómez et al., dass *B. megaterium* (LVN01) in Restglycerin 48 Stunden benötigt, um eine Ausbeute von 137,5 g PHB L⁻¹ mit einem DCW von 58,1 mg PHB g cell⁻¹ zu erreichen; nach dieser Zeit nehmen diese Parameter drastisch ab [49].

Es wurde hervorgehoben, dass im Gärrest die DCW-Werte höher sind und die Bakterienzellen in kurzer Zeit eine größere Menge PHBV pro Gramm Biomasse ansammeln. Die ausgezeichnete Speicherkapazität des Biopolymers ist besonders nach den ersten 24 Stunden der Inkubation deutlich und bleibt bis 32 Stunden auf relativ hohem Niveau (Abbildung 2). In Übereinstimmung mit den Berichten anderer Autoren wird daraus geschlossen, dass die erste Phase der Fermentation eine Phase der anfänglichen Anpassung ist, in der sich die Bakterien vermehren und ihre Biomasse erhöhen, bevor sie beginnen, PHA effizient zu synthetisieren und anzusammeln [53,55–57].

Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die mikrobielle Kinetik stark von der chemischen Beschaffenheit der Kohlenstoffquelle beeinflusst wird. Im Gegensatz zu Restglycerin ist der Gärrest eine komplexe Mischung organischer Verbindungen, die Fettsäuren und andere Nebenprodukte der anaeroben Vergärung von organischem Material enthält. Diese Komplexität könnte bedeuten, dass *B. megaterium* (LVN01) eine längere Zeit benötigt, um sich an das Medium anzupassen und die verfügbaren Nährstoffe zu assimilieren, um effizient zu wachsen, was seine verlängerte Wachstumskinetik erklärt. Darüber hinaus wird in den frühen Stadien der Fermentation ein schnelles Bakterienwachstum (höherer DCW) beobachtet, bevor die Bakterien der PHBV-Synthese den Vorzug geben. Diese inverse Beziehung (Abbildung 4) zwischen Biomasse und PHB-Produktion folgt dem Trend, den andere Autoren für *B. megaterium* aus anderen Substraten berichtet haben [11,24,50,58].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lag-Phase (Adaptionsphase) bei der Fermentation eine entscheidende Rolle spielt, da sie wichtig ist, damit der Mikroorganismus seinen Stoffwechsel aktivieren und die Nährstoffe im Kulturmedium optimal nutzen kann. In komplexen Substraten wie Gärresten benötigt *B. megaterium* lange Akklimatisierungszeiten, bevor es optimales Wachstum erreicht, während es sich in einfachen Substraten schnell vermehren kann. Diese Informationen sind für die Gestaltung und Optimierung von Fermentationsprozessen von entscheidender Bedeutung, da die mikrobielle Adaptionszeit in Bezug auf das Substrat die Produktivität und Effizienz des Prozesses erheblich beeinflussen kann [21]. In dieser Forschung konnte *B. megaterium* während der ersten Stunden des Bioprozesses (16–32 Stunden) PHBV synthetisieren und akkumulieren, wobei Biogasgärreste als Kohlenstoffquelle verwendet wurden, was für eine effiziente industrielle Produktion vielversprechend ist. Gleichzeitig könnte es die Abhängigkeit von Öl, einer nicht erneuerbaren Ressource, und von teuren und weniger nachhaltigen Kohlenstoffquellen wie landwirtschaftlichen Nutzpflanzen verringern [59–63].

Die chemische Charakterisierung des von *B. megaterium* aus Biogas-Gärresten synthetisierten Biopolymers erfolgte mittels Gaschromatographie mit einem massenselektiven Detektor (GC-MS) und Kernspinresonanzspektroskopie (1H-NMR und 13C-NMR).

Die in dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse zeigen die Fähigkeit von *B. megaterium*, PHBV aus verschiedenen Substraten durch Fermentationsprozesse zu produzieren. Das Chromatogramm (GC–MS) des Polymerextrakts (Abbildung 5) wurde mit dem des kommerziellen PHBV- Standards verglichen. In beiden Fällen wurden zwei Hauptspitzen mit Retentionszeiten (RT) von 10,9 min und 14,6 min beobachtet, die über die GC–MS-Datenbank als 2-Butensäuremethylester bzw. Methylester der 3-Hydroxybuttersäure identifiziert wurden, die für das 3HB ch Monomer.

Der Peak mit niedrigerer Intensität, der bei 14,1 min auftrat, wird dem Methylester der 2-Pentansäure zugeschrieben, der typisch für das 3HV-Monomer ist und vom Datensystem des Teams mit einer Qualität von 97 % identifiziert wurde (Abbildung S6). Diese entstehen durch Methanolyse von 3HB, was zu C4-Estern führt, und 3HV, was zu C4- und C5-Estern führt [33]. 2-Butensäure, 3-Hydroxybuttersäure und 2-Pentansäure sind ebenfalls Nebenprodukte des thermischen Abbaus von PHBV [64]. Die über GC-MS erhaltenen Informationen stützen das vorherrschende Vorkommen von Polyhydroxybuttersäure und, in geringeren Anteilen, Polyhydroxyvaleriansäure in den Extrakten von *B. megaterium*.

Mithilfe der Kernspinresonanzspektroskopie konnten wir die chemische Struktur des von *B. megaterium* LVN01 im Rahmen einer batchweisen aeroben Fermentation mit Kohlenstoffquellen-Biogas-Gärresten synthetisierten Biopolymers aufklären. Die ¹H-NMR- (Abbildung 7) und ¹³C-NMR -Spektren (Abbildung 8) der gereinigten PHBV-Probe und des reinen Standards waren ähnlich und zeigten sieben typische Signale des Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat)-Copolymers zwischen 0,75 ppm und 5,50 ppm, die mit den chemischen Verschiebungen (δ) der 3HB- (3-Hydroxybutyrat) und 3HV- (3-Hydroxyvalerat)-Untereinheiten des Copolymers PHBV in Zusammenhang stehen.

Die H-NMR-Signale weisen auf das Vorhandensein charakteristischer funktioneller Gruppen beider monomeren Fraktionen (3HB und 3HV) hin, d. h. δ = 5,356–5,363 ppm (a und a'), was die Protonen der Methingruppe (–CH) betrifft, und δ = 2,57–2,59 ppm und δ = 2,69–2,73 ppm (b und b'), was den Protonen der Methylengruppe (CH₂) entspricht. Insbesondere weist die 3HB- Untereinheit ein δ = 1,25–1,26 ppm auf, das zur Methylgruppe (CH₃) gehört (c). Andererseits führt 3HV zu Verschiebungen bei δ = 1,73–1,78 ppm (d) und δ = 1,0 ppm (e), die es uns ermöglichen, auf die Resonanz der Methylen- (d) und Methylprotonen (e) in der Seitenkette (Ethyl) zu schließen.

Diese letzten Verschiebungen markieren den Unterschied zwischen den Monomeren (HV und HB) und bestätigen das Vorhandensein von PHBV. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stimmen mit denen überein, die von anderen Autoren für das PHBV-Copolymer berichtet wurden [39,65–70].

Die Ergebnisse der ¹³C-NMR-Analyse stimmen mit denen der ¹H-NMR überein (Abbildung 7). Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt Signale, die die nicht äquivalenten Kohlenstoffatome in jedem Monomer identifizieren. Für HB wurden Kohlenstoffverschiebungen bei 19,65 ppm, 40,68 ppm und 67,52 ppm beobachtet, die den Methyl- (–CH₃), Methylen- (–CH₂–) bzw. Estergruppen (–O–CH–) entsprechen. Insbesondere für HV wurden die Signale der beiden Methylengruppen (–CH₂–) bei 26,74 ppm und 30,82 ppm beobachtet. In diesem Monomer verschob sich der Peak, der der Estergruppe (–O–CH–) entspricht, auf 71,90 ppm. Schließlich wird für beide Monomere (3-HB und 3-HV) eine Resonanz bei 169,14 ppm der Kohlenstoffatome der Carbonylgruppe (–C–) angezeigt. Diese Daten stimmen mit den von anderen Forschern berichteten Daten überein [38,39,56,69] und ermöglichen es uns, das Vorhandensein des PHBV-Copolymers im Polymerextrakt von *B. megaterium* zu bestimmen.

Die chemische Charakterisierung des *B. megaterium*-Biopolymers stimmt mit den Merkmalen überein, die aus der Analyse der thermischen Eigenschaften des Biopolymers mittels TGA (Abbildung 9) und DSC (Abbildung 10) abgeleitet wurden. Die Werte der thermischen Eigenschaften (T_m = 153 °C und T_d = 290,14 °C) des von *B. megaterium* aus Biogas-Gärresten produzierten PHBV liegen im Bereich der von Wang et al. [71] gemessenen Werte, die drei von *Ralstonia eutropha* aus Lävulinsäure synthetisierte PHAs analysierten. Die Forscher ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) von 101,93 °C, 150,18 °C und 172,05 °C sowie thermische Zersetzungstemperaturen (T_d) von 284,4 °C, 298,3 °C und 263,4 °C für PHB mit 0 %, 0,16 % bzw. 53 %. Der Prozentsatz der Kristallinität (% X_{cr}) = 18 des untersuchten PHBV unterschied sich jedoch deutlich von den für PHB berichteten Werten mit 0 % (% X_{cr} = 61,44 %), 0,16 % (% X_{cr} = 50,34 %) und HV 53 % (% X_{cr} = 51,92 %). Dennoch sind die Ergebnisse dieser Untersuchung in Bezug auf diesen Parameter auch mit denen von Abbasi et al. vergleichbar, die für eine Reihe von durch Fermentation hergestellten PHBV X_{cr}-Werte über DSC zwischen 16,6 % und 29 % berichteten [39]. In

Ihrer Untersuchung zufolge wies das PHBV mit dem niedrigsten 3HV-Gehalt (0,16) das höchste Xcr (29 %) auf. Abbasi et al. [39] und andere Forscher [71] kamen aus ihrer Studie zu dem Schluss, dass der Kristallinitätsgrad und der Schmelzpunkt des Biopolymers mit dem HV-Gehalt im Polymer abnehmen, was möglicherweise zu einer Verbesserung der Duktilität und Flexibilität des Polymers führt.

Das im Rahmen dieser Forschung hergestellte Biopolymer weist thermodynamische Eigenschaften auf, die es von der PHB-Struktur unterscheiden und es näher an die PHBV-Linie heranführen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu beachten, dass ein Copolymer wie PHBV laut Literatur einen niedrigeren Schmelzpunkt und eine höhere Flexibilität aufweist als das PHB-Homopolymer [72]. Die geringere Kristallinität und der niedrigere Schmelzpunkt von PHBV aus *B. megaterium* deuten auf einen nennenswerten Anteil von HV mit einer flexibleren Strukturordnung hin. Dies steht im Einklang mit der Charakterisierung kurzkettiger Biopolymere, die bekanntermaßen eine geringere Kristallinität und niedrigere Schmelzpunkte aufweisen, wodurch sie als Elastomere klassifiziert werden und eine Bruchdehnung von über 100 % aufweisen [73,74].

In dieser Studie zeigte *B. megaterium* LVN01 seine effiziente Fähigkeit, PHBV aus Biogas-Gärresten, einem Substrat, das reich an flüchtigen Fettsäuren ist, in nur 16 bis 24 Stunden Fermentationszeit zu produzieren. Dies ist vielversprechend für die industrielle Produktion von Biopolymeren, da PHBV nicht nur geeignete physikalische Eigenschaften für den Einsatz in verschiedenen Industriebereichen aufweist, sondern auch einen hohen Grad an biologischer Abbaubarkeit hat, was es für die pharmazeutische Biopolymerindustrie sehr attraktiv macht.

Die physikalischen Eigenschaften von PHBV aus *B. megaterium* hängen eng mit den biologischen Abbaubarkeitseigenschaften und der Zersetzungsfreundlichkeit von PHAs zusammen. Diese Abbauprozesse werden durch die spezifische chemische Zusammensetzung des Polymers und die umgebenden Umweltbedingungen beeinflusst. Der Abbau von Objekten aus PHAs kann laut Berichten sehr unterschiedlich lange dauern und von einigen Monaten in Böden mit stabilen Temperaturen bis zu einigen Jahren in Meeresumgebungen reichen. Es ist zu beachten, dass bestimmte Arten von PHAs, wie Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat), in ihrer Kristallinität deutlich beeinträchtigt werden, was ihre Abbaugeschwindigkeit moduliert [75].

Das Potenzial des aeroben Fermentationsprozesses mit dem *B. megaterium*-System unter Verwendung von Biogas-Gärresten wird durch die Verwendung eines wirtschaftlichen Substrats für die Herstellung von Biopolymeren des PHA-Typs, insbesondere PHBV, gestärkt. Die Hauptvorteile der Verwendung von Gärresten liegen in ihrer Verfügbarkeit und ihren geringen Kosten, wenn man bedenkt, dass es sich um ein Nebenprodukt des Biogasherstellungsprozesses aus Restbiomasse der handwerklichen Fischereiindustrie in Tumaco, Kolumbien, handelt. Neben dem wirtschaftlichen Vorteil gibt es positive Auswirkungen auf Umwelt und Gesellschaft: Erstens stellen Gärreste Alternativen zu Kunststoffen auf Erdölbasis dar, die bei ihrer Herstellung erhebliche Umweltverschmutzung verursachen und eine nicht erneuerbare Ressource verbrauchen; zweitens werden Fischereiabfälle (Fischeingeweide) zur Herstellung von Biogas verwendet und dann werden aus dem Restabwasser (Gärreste, die reich an flüchtigen Fettsäuren sind) Biopolymere des PHA-Typs hergestellt. Mit diesem Ansatz wird die Verschmutzung durch Fischereiabfälle vermieden, die oft ins Meer geworfen werden. All dies wird in einer Bioraffinerienumgebung durchgeführt und trägt dazu bei, den Mehrwert der Produktionskette der handwerklichen Fischerei in Gemeinden, die unter schwierigen Bedingungen leben, sowie die Kreislaufbioökonomie der Biogasproduktion zu steigern.

In Bezug auf die Nachhaltigkeit des Substrats ist es wichtig zu erwähnen, dass die handwerkliche Fischerei im kolumbianischen Pazifik große Mengen an Abfall erzeugt, der eine wertvolle Quelle erneuerbarer organischer Stoffe für die effiziente Produktion von PHBV durch Fermentation mit *B. megaterium* darstellt. Somit könnten die Rohstoffkosten für die groß angelegte PHBV-Produktion erheblich gesenkt werden, was wichtige Auswirkungen in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit und die ökologische Nachhaltigkeit hätte.

5. Schlussfolgerungen

Flüssiger Gärrest, ein Nebenprodukt der Biogasproduktion durch anaerobe Vergärung von Restbiomasse aus der handwerklichen Fischereiindustrie, ist ein erneuerbares Sekundärsubstrat, das sich für die Kultivierung der einheimischen kolumbianischen Bakterien *B. megaterium* LVN01 eignet und

Synthese von Biopolymeren des PHA-Typs, insbesondere des Copolymers Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV).

Unter den Betriebsbedingungen dieser Forschung produziert das *B. megaterium*-Gärrestsystem in nur 16 Stunden nennenswerte Mengen PHBV mit PHBV-Produktivitäten von 360 mg/L·h, was den Fischereirückständen (Fischeingeweiden) einen weiteren Wert verleiht. Im Rahmen der Kreislaufwirtschaft könnte dies die Biogas-Bioindustrie stärken und der Produktionskette der handwerklichen Fischerei in Kolumbien einen Mehrwert bieten. Analysen des PHBV-Copolymers zeigen, dass es sich um ein thermostabiles, flexibles Polymer handelt. In Kombination mit seiner biologischen Abbaubarkeit deutet dies auf seine potenzielle Nützlichkeit in einer Vielzahl von industriellen Anwendungen hin. Es sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um die prozentualen Anteile des HV-Monomers an der PHBV-Polymerstruktur zu bestimmen, sowie ergänzende Untersuchungen, um optimale Bioprozessabläufe zu etablieren.

Ergänzende Materialien: Die folgenden unterstützenden Informationen können unter <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol4030072/s1> heruntergeladen werden. **Abbildung S1:** Gram-Färbung von *Bacillus megaterium*, 24 h in Luria-Bertani-Brühe inkubiert; **Abbildung S2:** Beobachtung gefärbter Sporen von *Bacillus megaterium*-Wildtypproben, die unter Stressbedingungen (44 °C) auf Nähragar gezüchtet wurden, bei 100-facher Vergrößerung; **Abbildung S3:** Beobachtung des Wachstums von *Bacillus megaterium*-Wildtyp, der an Gärreste aus dem homogenen Tank der Biogasanlage in Tumaco angepasst ist, unter dem Fluoreszenzmikroskop ($\lambda = 510\text{--}560\text{ nm}$) . A. Wachstum auf Nilrot-Agar, B. Nilblau-Färbung; **Abbildung S4:** Laborversuche zum Wachstum von *B. megaterium* in Gärresten unter den folgenden Bedingungen: pH 7,0, Temperatur: 30,8 °C, Rühren 200 U/min und drei Gärrest: MMS-Verhältnisbedingungen 100:0, 80:20, 50:50; **Abbildung S5:** Wachstumskurve im Labormaßstab von *B. megaterium* LVN01 in Biogasgärresten, Betriebsbedingungen: 10 ml, 200 U/min, 30,8 °C, pH 7,0; **Abbildung S6:** Rekonstruiertes Ionenstrom-Massenspektrum für PHBV, gewonnen aus der Fermentation von *Bacillus megaterium* LVN01 in Gärresten; **Tabelle S1:** Zusammensetzung von flüssigen Abfallgärresten, gemeldet von der Forschungsgruppe „Environmental Prospective“ der Universidad Nacional de Colombia – Hauptsitz in Palmira.

Beiträge der Autoren: Konzeptualisierung, ALMM, MY-P., KACC und PEZM; Datenkuratierung, ALMM, MY-P., KACC und PEZM; Labor, ALMM, MY-P., KACC und PEZM; Methodik, ALMM, MY-P., KACC und PEZM; Projektverwaltung, ALMM, MY-P. und KACC; Ressourcen, ALMM und MY-P.; Überwachung, ALMM und MY-P.; Validierung, ALMM, MY-P., KACC und PEZM; Visualisierung, ALMM, MY-P. und KACC; Schreiben – Originalentwurf, ALMM, MY-P. und KACC; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, ALMM, MY-P., KACC und PEZM. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und stimmen ihr zu.

Finanzierung: Universidad Nacional de Colombia: Stärkung der handwerklichen Fischerei im kolumbianischen Nariñense-Pazifik hin zu einer nachhaltigen Nutzung der Ressource. Tumaco, Code Hermes: 49521, BPIN: 2020000100068, General System of Royalties (SGR).

Erklärung des Institutional Review Board: Nicht zutreffend.

Einverständniserklärung: Nicht zutreffend.

Datenverfügbarkeitserklärung: Die Daten sind im Artikel und in ergänzenden Materialien enthalten.

Danksagungen: Die Autoren bedanken sich beim General Royalties System für die finanzielle Unterstützung durch das Projekt BPIN 2020000100068. Darüber hinaus danken sie den Leitern des Labors für chemische Analyse und Umweltprozesse, des Labors für natürliche Gifte und des Labors für biologische Prozesse der Universidad Nacional de Colombia, Campus Medellín, für ihre Zusammenarbeit und Unterstützung mit der physischen Infrastruktur, Ausrüstung und in einigen Fällen wichtigen Reagenzien zur Durchführung der experimentellen Tests. Dank gilt auch dem Labor für Umweltforschung auf dem Campus Palmira der Universidad Nacional de Colombia, insbesondere Luz Stella Cadavid Rodríguez für die Bereitstellung der Gärrestproben für diese Forschung, und Elena Stashenko, Leiterin des Labors für Chromatographie und Massenspektrometrie an der Universidad Industrial de Santander, für ihre Unterstützung bei der Analyse der PHA-Proben.

Interessenkonflikte: Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Verweise

1. Jaso Sánchez, MA Bioplastische Chirurgie: Ein technisches Labor. *Acta Univ.* **2020**, *30*, 1–24. 2.
Plastics Europe, eine nachhaltige Zukunft ermöglichen. Kunststoffe – die wichtigsten Fakten. Infografik. 2023. Online verfügbar: <https://plasticseurope.org/es/plastics-europe-publica-plastics-the-fast-facts-2023/> (abgerufen am 20. März 2024).
3. Saratale, RG; Cho, SK; Saratale, GD; Kadam, AA; Ghodake, GS; Kumar, M.; Bh Bharagava, RN; Kumar, G.; Kim, DS; Mulla, SI; et al. Ein umfassender Überblick und aktuelle Fortschritte bei der Produktion von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) unter Verwendung verschiedener organischer Abfallströme. *Bioresour. Technol.* **2021**, *325*, 124685.
4. Sohn, YJ; Kim, HT; Baritugo, KA; Jo, SY; Song, HM; Park, SY; Park, SK; Pyo, J.; Cha, HG; Kim, H.; et al. Jüngste Fortschritte in nachhaltigem Kunststoff-Upcycling und Biopolymeren. *Biotechnol. J.* **2020**, *15*, 1900489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Organización de las Naciones Unidas. Alles in allem ist es notwendig, die Kontamination durch Kunststoffe zu vermeiden. ONU-Programm für die mittlere Umgebung. Online verfügbar : <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-contaminacion-por-plasticos> (abgerufen am 25. April 2023).
6. Grigore, ME; Grigorescu, RM; Iancu, L.; Ion, RM; Zaharia, C.; Andrei, ER Synthesemethoden, Eigenschaften und biomedizinische Anwendungen von Polyhydroxyalkanoaten: Eine Übersicht. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2019**, *30*, 695–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Madhumitha Jaganmohan. Online verfügbar: <https://www.statista.com/aboutus/our-research-commitment/2234/madhumitha-Abonnieren> (abgerufen am 20. März 2024).
8. Anjum, A.; Zuber, M.; Zia, KM; Noreen, A.; Anjum, MN; Tabasum, S. Mikrobielle Produktion von Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) und deren Copolymeren: Ein Überblick über die jüngsten Fortschritte. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 161–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kaniuk, Y.; Stachewicz, U. Entwicklung und Vorteile biologisch abbaubarer PHA-Polymere auf Basis elektrogesponnener PHBV-Fasern für Tissue Engineering und andere biomedizinische Anwendungen. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 5339–5362. [[CrossRef](#)]
10. Koller, M. Produktion von Polyhydroxyalkanoat (PHA)-Biopolyestern durch Extremophile. *MOJ Polym. Sci.* **2017**, *1*, 1–19. [[CrossRef](#)]
11. Cal, AJ; Kibblewhite, RE; Sikkema, WD; Torres, LF; Hart-Cooper, WM; Orts, WJ; Lee, CC Herstellung von Polyhydroxyalkanoat-Copolymeren mit 4-Hydroxybutyrat in gentechnisch verändertem *Bacillus megaterium*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *168*, 86–92. [[Querverweis](#)] [[PubMed](#)]
12. Sánchez Moreno, SA; Marín Montoya, MA; Mora Martínez, AL; Yepes Pérez, MDS Identifizierung von Polyhydroxyalkanoat-produzierende Bakterien in mit FIQUE-Abfällen kontaminierten Böden. *Rev. Colomb. De Biotecnol.* **2012**, *14*, 89–100.
13. Dhangdhariya, JH; Dubey, S.; Trivedi, HB; Pancha, I.; Bhatt, JK; Dave, BP; Mishra, S. Polyhydroxyalkanoat aus marinem *Bacillus megaterium* unter Verwendung von CSMCRIs Dry Sea Mix als neuartiges Wachstumsmedium. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *76*, 254–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kumar, P.; Ray, S.; Kalia, VC Herstellung von Copolymeren von Polyhydroxyalkanoaten durch Regulierung der Hydrolyse von Bioabfällen. *Bioresour. Technol.* **2016**, *200*, 413–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Munir, S.; Jamil, N. Produktion von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) in bakterieller Co-Kultur unter Verwendung von Glucose und flüchtigen Fettsäuren als Kohlenstoffquelle. *J. Basic Microbiol.* **2018**, *58*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yun, JH; Sawant, SS; Kim, BS Produktion von Polyhydroxyalkanoaten durch *Ralstonia eutropha* aus flüchtigen Fettsäuren. *Korean J. Chem. Ing.* **2013**, *30*, 2223–2227. [[CrossRef](#)]
17. Martinez, GA; Bertin, L.; Scoma, A.; Rebecchi, S.; Braunegg, G.; Fava, F. Produktion von Polyhydroxyalkanoaten aus dephenolisiertem und fermentiertem Olivenöl-Abwasser durch Einsatz einer Reinkultur von *Cupriavidus necator*. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *97*, 92–100. [[Querverweis](#)]
18. Ferre-Guell, A.; Winterburn, J. Erhöhte Produktion von Polyhydroxyalkanoaten mit kontrollierbarer Zusammensetzung und konsistenter Materialeigenschaften durch Fed-Batch-Fermentation. *Biochem. Eng. J.* **2019**, *141*, 35–42. [[CrossRef](#)]
19. Hermann-Krauss, C.; Koller, M.; Muhr, A.; Fasl, H.; Stelzer, F.; Braunegg, G. Archaeale Produktion von Polyhydroxyalkanoat (PHA) -Co- und Terpolyestern aus Nebenprodukten der Biodieselindustrie. *Archaea* **2013**, *2013*, 129268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sirohi, R.; Pandey, JP; Gaur, VK; Gnansounou, E.; Sindhu, R. Kritischer Überblick über Biomasse-Rohstoffe als nachhaltige Substrate für die Herstellung von Polyhydroxybutyrat (PHB). *Bioresour. Technol.* **2020**, *311*, 123536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Vu, DH; Wainaina, S.; Taherzadeh, MJ; Åkesson, D.; Ferreira, JA Produktion von Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) durch *Bacillus megaterium* unter Verwendung von flüchtigen Fettsäuren aus säurebildenden Fermentationen von Lebensmittelabfällen. *Bioengineered* **2021**, *12*, 2480–2498. [[CrossRef](#)]
22. Kleerebezem, R.; Joosse, B.; Rozendal, R.; Van Loosdrecht, MC Anaerobe Vergärung ohne Biogas? *Rev. Environ. Wissenschaft. Bio/Techn.* **2015**, *14*, 787–801. [[CrossRef](#)]
23. Cadavid-Rodríguez, LS; Castro-López, VE; Placido, J. Bewertung optimaler Fermentationsbedingungen für die Produktion flüchtiger Fettsäuren aus handwerklichen Fischabfällen. *Res. Sq.* **2020**. [[CrossRef](#)]
24. Gómez-Cardozo, JR; Velasco-Bucheli, R.; Marín-Pareja, N.; Ruíz-Villadiego, OS; Correa-Londoño, GA; Mora-Martínez, AL Fed-Batch-Produktion und Charakterisierung von Polyhydroxybutyrat durch *Bacillus megaterium* LVN01 aus Restglycerin. *Dyna* **2020**, *87*, 111–120. [[CrossRef](#)]
25. Salazar, A. Parámetros Operacionales Óptimos Para La Producción de Bioplásticos a Partir de Fuentes Renovables Azucaradas; Universität Nacional de Colombia: Medellín, Kolumbien, 2011.
26. Rai, AK; Swapna, HC; Bhaskar, N.; Halami, PM; Sachindra, NM Wirkung der Fermentation und Silierung auf die Ölgewinnung aus Eingeweide von Süßwasserfischen. *Enzym. Microb. Technol.* **2010**, *46*, 9–13. [[CrossRef](#)]
27. López-Jácome, LE; Hernández-Durán, M.; Colín-Castro, Kalifornien; Ortega-Peña, S.; Cerón-González, G.; Franco-Cendejas, R. Las Grundlegende Tinciones im Labor für Mikrobiologie. *Investig. En Discapac.* **2014**, *3*, 10–18.

28. Tinción de Esporas: Fundamento, Técnicas y Usos. Lifeder. Online verfügbar: <https://www.lifeder.com/tincion-de-esporas/> (abgerufen am 18. Januar 2024).
29. Pérez, R.; Juárez, M.; Rodríguez, LP Manual de Laboratorio de Técnicas Microbiológicas; Departamento de Ciencias Básicas Academia de Microbiología. Instituto Politécnico Nacional: Pereira, Kolumbien, 2011.
30. Spiekermann, P.; Rehm, BH; Kalscheuer, R.; Baumeister, D.; Steinbüchel, A. Eine empfindliche Methode zur Färbung lebender Kolonien mit Nilrot zum direkten Screening von Bakterien, die Polyhydroxyalkansäuren und andere Lipidspeicherverbindungen ansammeln. Arch. Microbiol. **1999**, *171*, 73–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Ostle, AG; Holt, JG Nilblau A als Fluoreszenzfarbstoff für Poly-beta-Hydroxybutyrat. Appl. Environ. Microbiol. **1982**, *44*, 238–241. [\[Querverweis\]](#)
32. ISO 12966-2:2017; Tierische und pflanzliche Fette und Öle – Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern – Teil 2: Herstellung von Methylestern von Fettsäuren. Internationale Organisation für Normung: Genf, Schweiz, 2017.
33. Pradhan, S.; Dikshit, PK; Moholkar, VS Produktion, Charakterisierung und Anwendungen von biologisch abbaubaren Polymeren: Polyhydroxyalkanoate. In Fortschritte bei nachhaltigen Polymeren: Synthese, Herstellung und Charakterisierung; Springer: Singapur, 2020; S. 51–94.
34. Liu, J.; Zhao, Y.; Diao, M.; Wang, W.; Hua, W.; Wu, S.; Chen, P.; Ruan, R.; Cheng, Y. Poly (3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat) -Produktion durch *Rhodospirillum rubrum* unter Verwendung einer zweistufigen Kulturstrategie. J. Chem. **2019**, *2019*, 8369179. [\[CrossRef\]](#)
35. Jakšić, M.; Vrandečić, NS; Erceg, M. Thermischer Abbau von Poly (3-hydroxybutyrat)/Poly (ethylenoxid)-Mischungen: Thermo-Gravimetrische und kinetische Analyse. Eur. Polym. J. **2016**, *81*, 376–385. [\[CrossRef\]](#)
36. Vahabi, H.; Michely, L.; Moradkhani, G.; Akbari, V.; Cochez, M.; Vagner, C.; Renard, E.; Saeb, MR; Langlois, V. Thermische Stabilität und Entflammbarkeitsverhalten von Verbundwerkstoffen auf Basis von Poly(3-hydroxybutyrat)(PHB). Materials **2019**, *12*, 2239. [\[CrossRef\]](#)
37. Thiré, RM; Arruda, LC; Barreto, LS Morphologie und thermische Eigenschaften von Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)/Attapulgit- Nanokompositen. Mater. Res. **2011**, *14*, 340–344. [\[CrossRef\]](#)
38. Abbasi, M.; Coats, ER; McDonald, AG Grüne Lösungsmittelextraktion und Charakterisierung der Eigenschaften von Poly (3-Hydroxybutyrat-co- 3-Hydroxyvalerat), das von gemischten mikrobiellen Konsortien, die mit fermentiertem Milchviehdung gefüttert wurden, biosynthetisiert wird. Bioresour. Technol. Rep. **2022**, *28*, 101065. [\[CrossRef\]](#)
39. Abbasi, M.; Pokhrel, D.; Coats, ER; Guho, NM; McDonald, AG Einfluss des 3-Hydroxyvalerat-Gehalts auf die thermischen, mechanischen und rheologischen Eigenschaften von Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat)-Biopolymeren aus fermentiertem Milchviehmist . Polymers **2022**, *14*, 4140. [\[CrossRef\]](#)
40. Guho, NM; Pokhrel, D.; Abbasi, M.; McDonald, AG; Alfaro, M.; Brinkman, CK; Coats, ER Pilotproduktion von Poly- 3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat aus fermentiertem Milchviehmist: Prozessleistung, Polymercharakterisierung und Auswirkungen auf die Skalierung. Bioresour. Technol. Rep. **2020**, *12*, 100588. [\[CrossRef\]](#)
41. Souza Junior, OF; Staffa, LH; Costa, LC; Chinelatto, MA Thermisches und rheologisches Verhalten von binären Mischungen aus Poly(hydroxybutyrat-co-hydroxyvalerat) und Poly(ethylen-co-vinylacetat) mit unterschiedlichem Vinylacetat-Gehalt. Macromol. Symp. **2019**, *383*, 1800020. [\[CrossRef\]](#)
42. Chan, CH; Kummerlöwe, C.; Kammer, HW Kristallisations- und Schmelzverhalten von Poly(3-hydroxybutyrat)-basierten Mischungen. Macromol. Chem. Phys. **2004**, *205*, 664–675. [\[CrossRef\]](#)
43. Bora, L.; Das, R.; Gohain, D. Ein neuartiges schmelzstabiles und zugfestes Biopolymer (Polyhydroxyalkanoate) aus *Bacillus megaterium* (MTCC10086) und seine Charakterisierung. J. Basic Microbiol. **2014**, *54*, 1012–1016. [\[CrossRef\]](#)
44. Castillo, D. Wirkung des Gens fadH1 bei der Herstellung von PHA-Inhalten, ungesättigt von *Pseudomona Putida*; Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá, Kolumbien, 2008.
45. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthese, Struktur und Eigenschaften von Polyhydroxyalkanoaten: Biologische Polyester. Prog. Polym. Sci. **2000**, *25*, 1503–1555. [\[CrossRef\]](#)
46. Wang, J.; Liu, S.; Huang, J.; Qu, Z. Eine Übersicht über die Produktion von Polyhydroxyalkanoaten aus landwirtschaftlichen Abfällen Biomasse: Entwicklung, Fortschritte, zirkulärer Ansatz und Herausforderungen. Bioresour. Technol. **2021**, *342*, 126008. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Kosseva, MR; Rusbandi, E. Trends in der Bioproduktion von Polyhydroxyalkanoaten mit Schwerpunkt auf der Weiterverarbeitung. Int. J. Biol. Macromol. **2018**, *107*, 762–778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Song, J.; Murphy, R.; Narayan, R.; Davies, G. Biologisch abbaubare und kompostierbare Alternativen zu herkömmlichen Kunststoffen. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. **2009**, *364*, 2127–2139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Gómez Cardozo, JR; Velasco-Bucheli, R.; Del Cerro, C.; Mata, IDL; Mora Martínez, AL Engineering von *Bacillus megaterium* für Verbesserung der PHA-Produktion aus Glycerin. Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. **2019**, *27*, 64–72.
50. Gómez Cardozo, JR; Mora Martínez, AL; Yepes Pérez, M.; Correa Londoño, GA Produktion und Charakterisierung von Polyhydroxyalkanoaten und nativen Mikroorganismen, synthetisiert aus Fettabfällen. Int. J. Polym. Sci. **2016**, *2016*, 6541718. [\[CrossRef\]](#)
51. Salazar, A.; Yepes, M.; Correa, G.; Mora, A. Polyhydroxyalkanoat-Produktion aus unerforschten Zuckersubstraten. Dyna **2014**, *81*, 73–77. [\[CrossRef\]](#)
52. Cardona, AC; Mora, AL; Marín, M. Identifizierung molekularer Bakterien, die Produkte von Polyhydroxidkanülen und Nebenprodukten von Bakterien und Säuren produzieren. Rev. Fac. Nac. De Agron. Medellín **2013**, *66*, 7129–7140.
53. Salgaonkar, BB; Mani, K.; Braganca, JM Charakterisierung von Polyhydroxyalkanoaten, die durch eine mäßig halophile Salzpflanzenisolat *Bacillus megaterium* Stamm H16. J. Appl. Microbiol. **2013**, *114*, 1347–1356. [\[CrossRef\]](#)

54. Alkotaini, B.; Sathiyamoorthi, E.; Kim, B.S. Potenzial von *Bacillus megaterium* für die Produktion von Polyhydroxyalkanoaten unter Verwendung der Rotalge *Gelidium amansii*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2015**, *20*, 856–860. [\[CrossRef\]](#)
55. Winnacker, M. Polyhydroxyalkanoate: Jüngste Fortschritte in ihrer Synthese und Anwendung. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2019**, *121*, 1900101. [\[CrossRef\]](#)
56. Chen, GQ; Jiang, XR; Guo, Y. Synthetische Biologie von Mikroben, die Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthetisieren. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2016**, *1*, 236–242. [\[CrossRef\]](#)
57. Tian, P.; Shang, L.; Ren, H.; Mi, Y.; Fan, D.; Jiang, M. Biosynthese von Polyhydroxyalkanoaten: Aktuelle Forschung und Entwicklung. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 709–714.
58. Cavaleiro, JM; Raposo, RS; De Almeida, MCM; Cesário, MT; Sevrin, C.; Grandfils, C.; Da Fonseca, M. Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Produktion von Poly (3-Hydroxybutyrat-co-4-Hydroxybutyrat) und Poly (3-Hydroxybutyrat-4-Hydroxybutyrat- 3-Hydroxyvalerat) durch *Cupriavidus necator* unter Verwendung von Abfallglycerin. *Bioresour. Technol.* **2012**, *111*, 391–397. [\[CrossRef\]](#)
59. Markt für Polyhydroxyalkanoate (PHA) nach Typ (kurze Kettenlänge, mittlere Kettenlänge), Produktionsmethoden (Zuckerfermentation, Pflanzenölermentation), Anwendung (Verpackung & LebensmittelDienstleistungen, biomedizinisch) und Region – globale Prognose bis 2028. Online verfügbar: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html?gad_source=1&gclid=Cj0_KCQjwhtWvBhD9ARIsAOP0GogViHNhj3GJBVD8HaHD2hl_z9qSSB0dUmUTmrudbLClu9nmLCiaAgzzEALw_wcB (abgerufen am 15. Mai 2024).
60. Kumar, M.; Rathour, R.; Singh, R.; Sun, Y.; Pandey, A.; Gnansounou, E.; Lin, KY; Tsang, DC; Thakur, IS. Bakterielle Polyhydroxyalkanoate: Chancen, Herausforderungen und Perspektiven. *J. Clean. Prod.* **2020**, *263*, 121500. [\[CrossRef\]](#)
61. Abd El-malek, F.; Khairy, H.; Farag, A.; Omar, S. Die Nachhaltigkeit mikrobieller Biokunststoffe, Produktion und Anwendungen. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *157*, 319–328. [\[CrossRef\]](#)
62. Loizidou, M.; Moustakas, K.; Rehan, M.; Nizami, AS; Tabatabaei, M. Neue Entwicklungen bei nachhaltigen Abfall-zu-Energie-Systemen. Erneuern. Aufrechterhalten. *Energy Rev.* **2021**, *151*, 111581. [\[CrossRef\]](#)
63. Lambert, S.; Wagner, M. Umweltverträglichkeit von biobasierten und biologisch abbaubaren Kunststoffen: Der Weg in die Zukunft. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6855–6871. [\[CrossRef\]](#)
64. Xiang, H.; Wen, X.; Miu, X.; Li, Y.; Zhou, Z.; Zhu, M. Thermische Depolymerisationsmechanismen von Poly (3-Hydroxybutyrat-Co-3-Hydroxyvalerat). *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2016**, *26*, 58–64. [\[CrossRef\]](#)
65. Miranda, DA; Marín, K.; Sundman, O.; Hedenström, M.; Quillaguaman, J.; Gorzsás, A.; Brosrom, M.; Carlborg, M.; Lundvist, J.; Romero-Soto LJonsson, LJ; et al. Produktion und Charakterisierung von Poly(3-hydroxybutyrat) aus *Halomonas boliviensis* LC1, kultiviert in Hydrolysaten von Quinoa-Stielen. *Fermentation* **2023**, *9*, 556. [\[CrossRef\]](#)
66. Sirohi, R.; Pandey, JP; Tarafdar, A.; Agarwal, A.; Chaudhuri, SK; Sindhu, R. Ein ökologisch nachhaltiger grüner Prozess zur Nutzung beschädigter Weizenkörner für die Produktion von Poly-3-Hydroxybutyrat. *Environ. Technol. Innov.* **2021**, *21*, 101271. [\[Querverweis\]](#)
67. Zhuikov, VA; Zhuikova, YV; Makhina, TK; Myshkina, VL; Rusakov, A.; Useinov, A.; Voinova, VV; Bonartseva, GA; Berlin, AA; Bonartsev, AP; et al. Vergleichende Struktur-Eigenschafts-Charakterisierung von Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)-Filmen unter hydrolytischem und enzymatischem Abbau: Ermittlung eines Übergangspunkts im 3-Hydroxyvalerat-Gehalt. *Polymers* **2020**, *12*, 728. [\[CrossRef\]](#)
68. Mohapatra, S.; Pattnaik, S.; Maity, S.; Sharma, S.; Akhtar, J.; Pati, S.; Samantaray, DP; Varma, A. Vergleichende Analyse der PHA-Produktion durch *Bacillus megaterium* OUAT 016 unter Submers- und Feststofffermentation. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 1242–1250. [\[Querverweis\]](#)
69. Han, J.; Hou, J.; Zhang, F.; Ai, G.; Li, M.; Cai, S.; Liu, H.; Wang, L.; Wang, Z.; Zhang, S.; et al. Mehrere Propionyl-Coenzym- A-liefernde Wege zur Produktion des Biokunststoffs Poly (3-Hydroxybutyrat-Co-3-Hydroxyvalerat) in *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 2922–2931. [\[CrossRef\]](#)
70. Cheng, HN; Biswas, A.; Vermillion, K.; Melendez-Rodriguez, B.; Lagaron, JM. NMR-Analyse und Triadensequenzverteilungen von Poly (3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat). *Polym. Test.* **2020**, *90*, 106754. [\[CrossRef\]](#)
71. Wang, Y.; Chen, R.; Cai, J.; Liu, Z.; Zheng, Y.; Wang, H.; Li, Q.; He, N. Biosynthese und thermische Eigenschaften von PHBV produziert aus Lävulinsäure durch *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60318. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Forni, D.; Bee, G.; Kreuzer, M.; Wenk, C. Neue biologisch abbaubare Kunststoffe in der Schafernahrung – Auswirkungen der NaOH-Vorbehandlung von Poly (3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) auf die Verdaulichkeit in vivo und das Verschwinden in vitro (Rusitec). *J. Anim. Phys. Anim. Nutrit.* **1999**, *81*, 41–50. [\[CrossRef\]](#)
73. Elles Montero, AE; García Echeverry, CA. Mezcla Sinérgica Entre Polihidroxibutirato (PHB) y Caucho Natural (Látex) para Hacer un Polímero. Bachelorarbeit, Universidad de Cartagena, Cartagena, Kolumbien, 2012.
74. Barham, P.; Keller, A.; Otun, E.; Holmes, P. Kristallisation und Morphologie eines bakteriellen thermoplastischen Kunststoffs: Poly-3-hydroxybutyrat. *1984*, *19*, 2781–2794. [\[CrossRef\]](#)
75. Gutiérrez, G.; Getzabeth, M. Herstellung von hydrolysierten Bakterien durch Bakterien des Gattungsbakteriums *Bacillus de Origen Marino*. Master Diplomarbeit, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spanien, 2008.

Haftungsausschluss/Anmerkung des Herausgebers: Die in allen Veröffentlichungen enthaltenen Aussagen, Meinungen und Daten sind ausschließlich die der einzelnen Autoren und Mitwirkenden und nicht die von MDPI und/oder den Herausgebern. MDPI und/oder die Herausgeber lehnen jegliche Verantwortung für Personen- oder Sachschäden ab, die aus den im Inhalt erwähnten Ideen, Methoden, Anweisungen oder Produkten resultieren.