

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS AND PRACTICAL SIGNIFICANCE OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION BY CYANOBACTERIA

V. Kravchenko, I. Kovshar, Yu. Reznichenko

National University of Food Technologies

Key words:

Polyhydroxybutyrate
Biosynthesis
Biotechnology
Cyanobacteria
Plastics
Biopolymers

Article history:

Received 21.07.2025
Received in revised form
04.08.2025
Accepted 19.08.2025

Corresponding author:

Yu. Reznichenko

E-mail:

reznichenkos@ukr.net

Citation: Кравченко В. В., Ковшар І. Д., Резніченко Ю. М. (2025). Біотехнологічні аспекти та практичне значення одержання полігідроксибутирату ціанобактеріями. *Наукові праці НУХТ*, 31(4), 89–106. DOI: 10.24263/2225-2924-2025-31-4-8

ABSTRACT

This research is dedicated to the study of phototrophic microorganisms, particularly cyanobacteria, as promising biological agents for biotechnological applications. Methods for cultivating these microorganisms, comparing the advantages and disadvantages of open and closed photobioreactors are shown in the paper. It was found that for the synthesis of high-value products, such as polyhydroxybutyrate (PHB), the use of closed systems was the most appropriate, as they provided sterility, precise parameter control, and a high concentration of biomass.

A detailed analysis revealed that cyanobacteria accumulated PHB as a storage compound under conditions of carbon surplus and nutrient deficiency (specifically nitrogen and phosphorus). Studies of modern approaches aimed at increasing PHB yield demonstrated significant progress. The application of metabolic and genetic engineering methods, including the expression of heterologous genes and the overexpression of native ones, has enabled the development of strains with exceptionally high levels of polymer accumulation — in some cases reaching up to 81% of the dry biomass.

Particular attention in this work was devoted to the potential applications of PHB, which stem from its biodegradability and biocompatibility. In the food industry, PHB is used for the production of packaging materials with improved properties, such as thermal stability and barrier permeability. In the medical field, this material showed great potential in tissue engineering, where its scaffolds were used for the regeneration of bone, cartilage, and neural tissues, as well as in drug delivery systems.

Based on the obtained data, it can be concluded that PHB synthesized by cyanobacteria is a high-tech material which, owing to advancements in biotechnology, can become a key element in the development of sustainable biopolymer production, the resolution of environmental issues, and the creation of innovative solutions in medicine.

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОДЕРЖАННЯ ПОЛІГІДРОКСИБУТИРАТУ ЦІАНОБАКТЕРІЯМИ

В. В. Кравченко, І. Д. Ковшар, Ю. М. Резніченко

Національний університет харчових технологій

Дослідження присвячене вивченню фототрофних мікроорганізмів, зокрема ціанобактерій як перспективних біологічних агентів для одержання біополімерів. Розглянуто методи культивування цих мікроорганізмів, визначено переваги та недоліки відкритих і закритих фотобіореакторів. Встановлено, що для синтезу високоцінних продуктів, таких як полігідроксибутират (ПГБ), найбільш доцільним є використання закритих систем, що забезпечують стерильність, контроль параметрів і високу концентрацію біомаси.

Детальний аналіз показав, що ціанобактерії накопичують ПГБ як запасну речовину в умовах надлишку вуглецю та дефіциту поживних речовин (азоту та фосфору). Дослідження сучасних підходів до підвищення виходу ПГБ свідчать про значний прогрес. Застосування методів метаболічної та генетичної інженерії, включаючи експресію чужорідних генів і надекспресію нативних, дало змогу отримати штами з надзвичайно високим рівнем накопичення полімеру, що в деяких випадках сягав до 81% від сухої біомаси.

Особлива увага приділена шляхам використання ПГБ, що обумовлені його здатністю до біодеградації та біосумісністю з іншими матеріалами. У харчовій промисловості ПГБ застосовується для створення пакувальних матеріалів з покращеними властивостями (термостабільність, бар'єрна проникність). У медичній промисловості матеріал демонструє великий потенціал у тканинній інженерії, де його каркаси використовуються для регенерації кісткової, хрящової та нервової тканин, а також у системах доставки ліків.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що ПГБ, синтезований ціанобактеріями, є високотехнологічним матеріалом, який завдяки біотехнологічним досягненням може стати ключовим елементом для створення сталого виробництва біополімерів, вирішення екологічних проблем і розвитку інноваційних рішень у медицині.

Ключові слова: полігідроксибутират, біосинтез, біотехнологія, ціанобактерії, пластмаси, біополімери.

Постановка проблеми. Постійне зростання чисельності населення та забруднення навколишнього середовища внаслідок численних антропогенних дій призвели до різноманітних зусиль для досягнення цілей сталого розвитку. Нині через зростаюче занепокоєння з приводу енергетичної кризи, продовольчої безпеки та екологічних проблем привертають увагу фотосинтезуючі мікроорганізми, особливо ціанобактерії, які здатні акумулювати сонячну енергію в біомасу та корисні вуглецеві сполуки, зокрема полігідроксибутират, що можуть вирішити перераховані проблеми, (Zahra, Choo, Lee, & Parveen, 2020).

Полігідроксibuтират (ПГБ) характеризується високою здатністю до біологічного розкладання, через що він вважається однією з кращих альтернатив пластмасам нафтохімічного виробництва. ПГБ має добрі термічні, механічні та біологічні властивості та широкий спектр застосувань у пакувальній промисловості, сільському господарстві, медичних приладах та обладнанні (Rueda et al., 2020), однак недоліком на сьогодні є собівартість отриманого біополімера.

З огляду на вищенаведену інформацію актуальними є дослідження, спрямовані на пошук нових ціанобактерій для синтезу полігідроксibuтирату або покращення вже існуючих технологічних процесів синтезу та виділення полігідроксibuтирату задля збільшення показників синтезу та зменшення втрат, відповідно, з метою зменшення собівартості отриманого кінцевого продукту.

Мета дослідження: узагальнення літературних даних щодо можливостей отримання полігідроксibuтирату ціанобактеріями, а також умов і механізмів їх біосинтезу.

Матеріали і методи. Матеріалами дослідження стали наукові публікації зарубіжних учених у провідних періодичних і спеціалізованих світових виданнях, що стосуються використання ціанобактерій для біосинтезу полігідроксibuтирату. При написанні огляду використані наукові публікації закордонних вчених в основному за останні десять років. Для пошуку наукових публікацій використовували наукометричні бази даних: Pub-Med, Google Scholar.

Викладення основних результатів дослідження. *Дослідження фототрофних мікроорганізмів у біотехнологічних процесах.* На сьогодні все більше зростає інтерес до дослідження фототрофних мікроорганізмів через їхню здатність перетворювати вуглекислий газ і синтезувати біологічно активні сполуки (Brasil, de Siqueira, Salum, Zanette, & Spier, 2017). Вирощування даних біологічних агентів відбувається в фотобіореакторах, але загалом існує два типи систем для вирощування ціанобактерій і мікрроводоростей — відкриті та закриті. Відкриті системи, у свою чергу, умовно поділяються на природні (озера, лагуни, ставки) та штучні (ставки або контейнери). Найбільш часто використовувані системи включають неглибокі великі ставки, резервуари, круглі ставки та скакові ставки (Suh, & Lee, 2003). Відкриті ставки набагато легше побудувати та експлуатувати, ніж більшість закритих систем. Однак основні обмеження у відкритих водоймах виникають через недостатнє використання світла клітинами, втрату води через випаровування, дифузію CO₂ в атмосферу та потребу у великих площах землі. Всі зазначені обмеження призводять до нижчої продуктивності біомаси для відкритих систем порівняно із закритими системами, проте, зважаючи на просту експлуатації та легке масштабування, ці системи все ще застосовуються в певних випадках, особливо коли необхідно отримати продукт з низькими вимогами до чистоти (Yen, Hu, Chen, Nagarajan, & Chang, 2019; Guedes, Katkam, Varela, & Malcata, 2014).

Закриті системи використовуються при виробництві високоцінних продуктів для застосування у фармацевтичній та косметичній промисловостях. До закритих систем відносять фотобіореактори, які не мають прямого обміну газами та забруднювачами із зовнішнього середовища.

Необхідний газообмін здійснюється через стерилізований газовий фільтр, щоб уникнути забруднення всередині системи культури. Таким чином, закриті систе-

ми характеризуються мінімізацією забруднення порівняно з відкритими системами, але недоліком закритих систем є висока вартість обладнання. Фотобіореактори закритої системи мають кілька важливих переваг перед відкритими системами:

1. Мінімізація забруднення та можливість вирощувати монокультури.
2. Кращий контроль параметрів процесу, а саме: рівень pH, температура, світло, концентрація CO₂ тощо.
3. Менші втрати CO₂ та уникнення випаровування води.
4. Накопичення більшої концентрації клітин.
5. Можливість синтезу складних біофармацевтичних препаратів.

Нині існує кілька типів закритих систем, які застосовуються для вирощування ціанобактерій і мікроводоростей: вертикальні (трубчасті) колони, фотобіореактори з плоскими пластинами та горизонтальні трубчасті фотобіореактори (Yen, Hu, Chen, Nagarajan, & Chang, 2019; Guedes, Katkam, Varela, & Malcata, 2014). Зображення фотобіореакторів для вирощування ціанобактерій і мікроводоростей наведено на рис. 1.

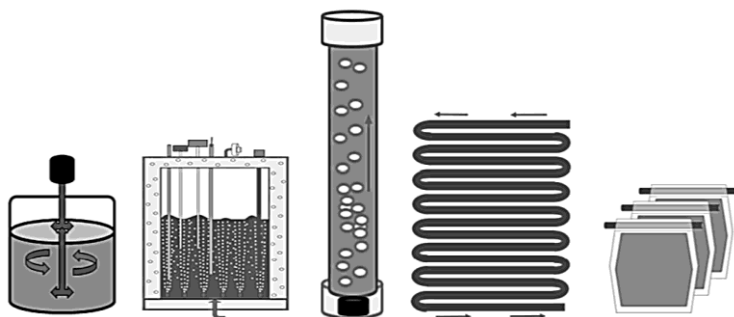


Рис. 1. Схематичне зображення типів фотобіореакторів, які використовуються для вирощування ціанобактерій і мікроводоростей, зліва направо: резервуар з мішалкою, плоска панель, барботажна колона трубчастого типу, пакети

Розглянувши основні переваги та недоліки фотобіореакторів, можна дійти висновку, що на сьогодні існує велика кількість різних типів і форм апаратів, які дозволяють їх використовувати під задані потреби. Для культивування ціанобактерій з метою синтезу вуглецевих метаболітів (глікоген і полігідроксибутират) доцільно використовувати закриті системи, які дають змогу проводити детальне визначення оптимальних параметрів процесу (Guedes, Katkam, Varela, & Malcata, 2014).

Ціанобактерії — це фотосинтезуючі мікроорганізми, які з'явилися на Землі дуже давно, що дозволило їм адаптуватись до жорстких умов навколишнього середовища та виробляти низку запасних сполук, включаючи глікоген і полігідроксибутират, які дають змогу їм виживати при зміні умов середовища (Stal, 1992). Під час надлишку світла та вуглекислого газу глікоген синтезується з надлишком метаболічної енергії, особливо коли ріст обмежений іншими сполуками, такими як азот або фосфор (Kaewbai-Ngam, Incharoensakdi, & Monshupanee, 2016; Singh, Sharma, Mallick, & Mala, 2017), в подальшому синтезований глікоген окиснюється протягом темного періоду як джерело енергії через окислювальний пентозофосфатний шлях (Smith, 1983). Подібно до глікогену, для синтезу полігідроксибутирату

ціанобактерії також використовують надлишок внутрішньоклітинного вуглецю (у формі ацетил-КоА) та відновних еквівалентів (НАДН) для свого синтезу.

Полігідроксibuтират (ПГБ). При вирощуванні ціанобактерій одним із продуктів метаболізму є полігідроксibuтират, який в останні десятиліття набув великого інтересу через свої властивості (Rajan, Thomas, Gopanna, & Chavali, 2019). Полігідроксibuтират — це полімер, отриманий у результаті накопичення вуглецю в клітинах певних видів бактерій. Цей полімер має ряд переваг: порівняно з поліетиленом і поліпропіленом полігідроксibuтират має вищу бар'єрну проникність; порівняно з усіма іншими синтетичними полімерами полігідроксibuтират проявляє здатність до біологічного розкладання в результаті контакту з мікроорганізмами, які знаходяться в навколишньому середовищі (грунт, прісна вода, аеробне та анаеробне компостування) (McAdam, Brennan Fournet, McDonald, & Mojicevic, 2020).

Сьогодні вчені досліджують шляхи підвищення концентрації синтезованого полігідроксibuтирату. Узагальнену характеристику продуцентів полігідроксibuтирату наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Узагальнена характеристика продуцентів полігідроксibuтирату

Продуцент	Світловий режим (світло-темрява)/ рівень освітленості	Час вирощування, діб	Концентрація полігідроксibuтирату, від сухої біомаси, %	Посилання
<i>Synechococcus elongatus</i> UTEX 2973- <i>phaCAB</i>	—/200 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	9	16 (420 мг/л)	Carpine, 2019
<i>Scytonema geitleri</i> Bharadwaja	14:10/95 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	28	7,12	da Silva, Costa, & de Moraes, 2018
<i>Nostoc muscorum</i> NCCU-442	10:14/25 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	7	26,37	Zhang, Liu, & Bryant, 2015
<i>Synechocystis</i> sp.	15:9/102 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	4 + 20	9	Koch, 2020
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803GT_ABEC	—/100 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	30	7	Rajan, Thomas, Gopanna, & Chavali, 2019
<i>Synechocystis</i> PPT1	12:12/50 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	21	81	Singh, Rai, Rai, Singh, & Singh, 2019
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	—/40 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	14	16,4	Khetkorn, Incharoen-sakdi, Lindblad, & Jantaro, 2016
<i>Synechocystis</i> sp. CCALA192		75	12,5	Carpine et al., 2019
<i>Synechocystis</i> PCC6803	16:8/150 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	26	8	Arisaka, Terahara, Oikawa, & Osanai, 2019

<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	—/250 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	8	3,97	McAdam, Brennan Fournet, McDonald, & Mojicevic, 2020
<i>Synechococcus elongatus</i> UAM–C/S03	—/100 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	9	29,42	Roh, 2021
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 <i>phaA/phaB</i>	—/40 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	9	35	Kavitha, 2016
<i>Synechocystis</i> WD119 (DKOX)	18:6/260 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	40	12	Ansari, & Fatma, 2016
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714/MT a24	—/50-60 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	19	37	Kamravamanesh, 2017
<i>Synechocystis</i> OX <i>rbcLXS</i>	24:0/50 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	14	39	Rueda, & García, 2021
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803/ <i>ntcA</i>	24:0/60 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	14	5,4	Kamravamanesh, 2018
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	12:12/—	20	10,6	Troschl, 2018
<i>Arthrospira platensis</i> RRGK	—	9	131 мг/л	Hondo et al., 2015
<i>Synechocystis</i> sp. PC C 6803	—/50 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	35	5,1 (72 мг/л)	Aikawa, 2014
<i>Nostoc muscorum</i>	12:12/275 мкмоль м ⁻² с ⁻¹	6	1,4	Comer, 2020

У 2015 р. вчені проводили генну модифікацію ціанобактерій *Synechocystis* sp. PCC 6803 для надсинтезу полігідроксибутирату (Hondo et al., 2015). Для конструювання генно-модифікованого штаму в *Synechocystis* sp. PCC 6803 експресували гени *pha*, які відповідали за синтез полігідроксибутирату. В результаті сконструйований штам *Synechocystis* sp. PCC 6803GT_ABEC вирощували впродовж 30 діб на середовищі BG 11 при освітленні 100 мкмоль м⁻²с⁻¹, 30 °С, швидкості перемішування 50 об/хв та внесенні 2% CO₂. Кількість накопиченого ПГБ становив 7% сухої біомаси.

Zhang з співавторами вивчали вплив метаболічної інженерії *Synechococcus* sp. PCC 7002 на синтез полігідроксибутирату (Zhang, Liu, & Bryant, 2015). Для конструювання модифікованого штаму в *Synechococcus* sp. PCC 7002 експресували гени, які відповідають за синтез полігідроксибутирату у *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212. Вирощування модифікованого штаму відбувалось на середовищі A⁺ при 38 °С, та середній інтенсивності освітлення 250 мкмоль м⁻²с⁻¹ з внесенням 1% CO₂. Рівень накопичення полігідроксибутирату становив 3,97% від сухої біомаси.

Kavitha з співавторами вивчали синтез полігідроксибутирату при вирощуванні *Arthrospira platensis* RRGK в відкритих водоймах (Kavitha, 2016). Вирощування проводили в відкритому ставку об'ємом 2 м³, як середовище використовували середовище Zarrouk з додатковим внесенням 60 мМ гідрокарбонату натрію при pH 9,5 та 40 °С. У результаті культивування цей штам накопичував 131 мг/л полігідроксибутирату та 2,2 г/л біомаси.

Ansari з співавтором досліджували синтез полігідроксибутирату за допомогою ціанобактерій (Ansari, & Fatma, 2016). У ході дослідження було розглянуто декілька представників ціанобактерій, серед яких найкращим продуцентом полігідроксибутирату був *Nostoc muscorum* NCCU-442. У подальшому вчені провели оптимізації умов культивування. Було встановлено, що при вирощуванні *N. muscorum* NCCU-442 при pH 7,5 температурі 30 °C з дотриманням світлового режиму 10:14 (світло-темрява) та додатковим внесенням 0,4% глюкози та 1 г/л хлориду натрію, кількість синтезованого полігідроксибутирату становить 26,37% сухої біомаси на сьомий день вирощування. Процес вирощування проводили в колбах Ерленмєєра на середовищі BG 11, із середньою інтенсивністю світла 25 мкмоль м⁻² с⁻¹.

Khetkorn зі співавторами оцінювали вплив надекспресії генів відповідальних за синтез полігідроксибутирату в *Synechocystis* sp. PCC6803 (Khetkorn, Incharoen-sakdi, Lindblad, & Jantaro, 2016). Модифікований штам конструювали шляхом надекспресії нативних генів *Synechocystis* sp. PCC6803 *phaA* і *phaB*. Вирощування проводили на поживному середовищі BG11 без азоту, з додатковим внесення 0,4% ацетату, впродовж 9 діб при 30 °C, 160 об/хв, та середній інтенсивності освітлення 40 мкмоль м⁻²с⁻¹. Після закінчення вирощування накопичення полігідроксибутирату становило 35% від сухої біомаси.

Carpine зі співавторами досліджували генетичну модифікацію *Synechocystis* sp. PCC6803 для посиленого виробництва полігідроксибутирату (Carpine, 2017). Сконструйований штам *Synechocystis* WD119 (DKOX) передбачав надекспресію *xfpk* та делецію *pta* та *ach* в *Synechocystis* sp. PCC6803. Вирощування модифікованого штаму проводили в фотобіореакторі (похила колона) на середовищі BG11 з світловим режимом 18:6 (світло-темрява), середньою інтенсивністю освітлення 260 мкмоль м⁻²с⁻¹, аерацією повітрям з 2% CO₂, при 28 °C впродовж 40 діб. У результаті сконструйований штам накопичував полігідроксибутират у кількості 12% від сухої біомаси.

Kamravanesh зі співавторами оцінювали спроможність синтезу полігідроксибутирату ціанобактеріями *Synechocystis* sp. PCC 6714 (Kamravanesh, 2017). У результаті вирощування штаму *Synechocystis* sp. PCC 6714 на середовищі BG11 без азоту та фосфору при 28 °C, pH 8,5, 300 об/хв та внесенні повітря з 2% CO₂ із середньою інтенсивністю освітлення 40 мкмоль м⁻²с⁻¹ на 14 день накопичення полігідроксибутирату становило 16,4% від сухої біомаси.

У 2018 р. вчені досліджували пілотне виробництво полігідроксибутирату в трубчастому фотобіореакторі при культивуванні *Synechocystis* sp. CCALA192 (Troschl, 2018). Експерименти проводили в трубчастому фотобіореакторі об'ємом 200 л впродовж 75 діб, вирощування культури відбувалось на середовищі BG11 з внесенням бікарбонату натрію та карбонату натрію, процес синтезу ПГБ здійснювали поетапно, впродовж 75 діб було проведено чотири етапи, один етап вирощування характеризується поступовим накопиченням біомаси зі споживанням усього азоту та зміною забарвлення середовища та, починаючи із шостої доби, подальшим накопиченням полігідроксибутирату. В результаті чотирьох етапів синтезу ПГБ середнє значення накопичення полімеру становило 12,5% від сухої біомаси, а середній вміст глікогену складав 20,4% від сухої біомаси, під час вирощування відбувалось внесення вуглекислого газу, середнє споживання якого становило 2 г/л.

Kamravamanesh зі співавторами оцінювали вплив випадкового мутагенезу *Synechocystis* sp. PCC 6714 на синтез полігідроксibuтирату (Kamravamanesh, 2018). Для отримання мутантного штаму клітини витримували під ультрафіолетовим випромінюванням. Процес синтезу полігідроксibuтирату проводили у дві стадії: перша стадія відбувалась на поживному середовищі BG11 впродовж 135 год, а друга — на поживному середовищі BG11 без азоту та фосфору з 135 год до 450 год. Вирощування проводили при 28 °C та інтенсивності освітлення 50 мкмоль м⁻²с⁻¹, стадію синтезу (друга фаза) проводили при 300 об/хв, pH 8,5 з внесення повітря з вмістом 2% CO₂ та інтенсивністю освітлення 60 мкмоль м⁻²с⁻¹. У результаті мутантний штам MT_a24 накопичував полігідроксibuтират у кількості 37% від сухої біомаси, а максимальна концентрація глікогену спостерігалась на 200 год та становила 50% від сухої біомаси.

Da Silva з співавторами оцінювали вплив відходів отриманих після екстракції біополімерів на синтез полігідроксibuтирату при вирощуванні *Spirulina* sp. LEB 18 (da Silva, Costa, & de Morais, 2018). Під час дослідів *Spirulina* sp. LEB 18 вирощували в вертикальному трубчастому реакторі на середовищі Zarrouk з додатковим внесенням відходів після екстракції біополімерів, з світловим режимом 12:12 (світло-темрява), при 30 °C, впродовж 20 діб. В результаті експериментів найкращі показники синтезу полігідроксibuтирату (10,6% від сухої біомаси) були продемонстровані при внесенні 25% відходів в поживне середовище.

Arisaka з співавторами досліджували вплив надекспресії гена *ntcA* у *Synechocystis* sp. PCC 6803 на синтез полігідроксibuтирату (Arisaka, Terahara, Oikawa, & Osanai, 2019). У ході дослідів було визначено, що ген *ntcA* бере участь у перерозподілі внутрішньоклітинних джерел вуглецю для синтезу полігідроксibuтирату. Модифікований штам вирощували в два етапи: спочатку на середовищі BG11 впродовж 7 діб, а в подальшому на середовищі BG11 без хлориду амонію, умови вирощування однакові для двох етапів, а саме: 30 °C, постійне освітлення, інтенсивність освітлення 60 мкмоль м⁻²с⁻¹, аерація повітрям з вмістом 1% CO₂. У результаті вирощування найвищий показник синтезованого полігідроксibuтирату (5,4% від сухої біомаси) спостерігався на 7 день азотного голодування, що становило 14 день загального культивування (спочатку 7 діб вирощування на середовищі з усіма компонентами, а в подальшому 7 діб азотного голодування).

Singh з співавторами досліджували вплив параметрів культивування *Scytonema geitleri* Bharadwaja на синтез полігідроксibuтирату (Singh, Rai, Rai, Singh, & Singh, 2019). Процес культивування проводили в колбах Ерленмеєра, з дотриманням режиму світло-темрява 14:10, та середньою інтенсивністю світла 95 мкмоль м⁻²с⁻¹ впродовж 28 діб. Під час визначення впливу параметрів на синтез полігідроксibuтирату розглядали рівень pH, температуру та джерело вуглецю, в результаті найвищий синтез полігідроксibuтирату (7,12% сухої біомаси) спостерігався при pH 8,5, температурі 30 °C та внесенні 30 мМ ацетату.

Sarpine з співавторами проводили дослідження, спрямоване на визначення впливу азоту на синтез полігідроксibuтирату при культивуванні ціанобактерій (Sarpine et al., 2019). У ході дослідження було встановлено, що найкращим продуцентом полігідроксibuтирату є *Synechocystis* PCC6803, який накопичував найбільшу кіль-

кість ПГБ порівняно з іншими розглянутими представниками. В результаті порівняння впливу азоту на синтез полігідроксибутирату було визначено, що найвищий синтез (8% сухої біомаси) відбувається при вирощуванні культури на середовищі BG11 з зменшеною вдвічі концентрацією нітрату натрію. Експерименти проводили в барботажній колоні об'ємом 800 мл, з дотриманням світлового режиму 16:8 (світло-темрява), з освітленням $150 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ при 25°C та внесенні повітря з 2% CO_2 .

У 2020 р. застосовували метаболічну інженерію *Synechocystis* sp. PCC 6803, для надсинтезу полігідроксибутирату (Koch et al., 2020). Для конструювання штаму проводили делецію регуляторного білка PirC та експресували два гени *phaA* та *phaB*, відподальних за синтез ПГБ у *Cupriavidus necator*. Сконструйований штам *Synechocystis* PPT1 вирощували при 125 об/хв, 28°C на середовищі з BG11 без нітрату натрію та калію гідроортофосфату з додатковим внесенням 10 мМ ацетату, рівень освітлення $50 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$, світловий режим 12:12 (світло-темрява). При вирощуванні на безазотно-фосфорному середовищі рівень накопичення ПГБ становило 63% сухої біомаси, а при додатковому внесенні ацетату кількість ПГБ збільшувалась до 81% сухої біомаси.

У 2021 р. вчені вивчали генну модифікацію ціанобактерій для промислового виробництва полі- β -гідроксибутирату (Roh et al., 2021). В процесі дослідів для конструювання генно-модифікованого штаму в *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 вводили гени *phaCAB* від *Cupriavidus necator* H16. Отриманий штам вирощували при 38°C , на середовищі BG11, зі ступенем освітлення $200 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$, рН 8,0 та аерацією повітрям з 5% CO_2 . У результаті культивування на 9 добу спостерігалась найвища концентрація синтезованого полігідроксибутирату 420 мг/л , що відповідало 16,7% від сухої біомаси.

Rueda з співавтором у 2021 р. проводили оптимізацію процесу синтезу полігідроксибутирату фототрофними ціанобактеріями шляхом моделювання кінетичної моделі (Rueda, & García, 2021). На основі інформації, що одним із важливих факторів синтезу великої кількості полігідроксибутирату є обмеження кількості поживних речовин, вчені провели оптимізацію безперервного виробництва та прийшли до висновку, що для виробництва ПГБ необхідно використовувати реактори в серії, тобто в одному реакторі відбувається вирощування ціанобактерій і споживання поживних речовин, а в подальшому з цього реактора, після досягнення певних параметрів, середовище направляють у другий реактор, де відбувається накопичення глікогену та полігідроксибутирату. Схематичне зображення безперервного процесу виробництва полігідроксибутирату наведено на рис. 2.

Також у (Rueda, & García, 2021) проведено оптимізацію процесу безперервного синтезу полігідроксибутирату та визначено, що оптимальний ріст клітин у реакторі складає чотири доби з необхідним початковим вмістом азоту 50 мг/л та фосфору 10 мг/л , а в реакторах накопичування полігідроксибутирату час утримання становить 20 діб. У результаті досягається синтез полігідроксибутирату в кількості 9% від сухої біомаси та з продуктивністю $5 \text{ мл/л} \times \text{добу}$. Всі досліді проводили з *Synechocystis* sp. культивування при освітленні $102 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ протягом 15 год на добу.

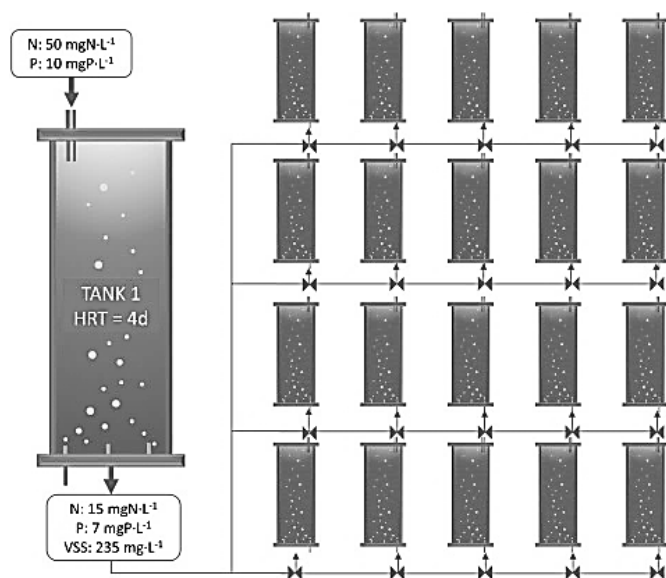


Рис. 2. Схематичне зображення безперервного процесу виробництва полігідроксибутирату

González-Resendiz зі співавторами досліджували синтез полігідроксибутирату при вирощуванні ціанобактерій, виділених з невеликого ставка в посушливому регіоні з середньою температурою 39 °C, Мексика (González-Resendiz et al., 2021). Ізольовану культуру ідентифікували як *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03. Вирощування проводили на середовищі BG11 без азоту впродовж 9 діб при 35 °C та середній інтенсивності освітлення 100 мкмоль м⁻²с⁻¹, з внесенням 250 мг/л×д CO₂. У результаті накопичення полігідроксибутирату становило 29,42% від сухої біомаси.

У праці (Tharasirivat, & Jantaro, 2023) оцінювали вплив надмірної експресії генів *RuBisCO* в *Synechocystis* sp. PCC 6803 на синтез біомаси та виробництво полігідроксибутирату *Synechocystis* OX *rbclXS* з надекспресією гена *RuBisCO*. Вирощування проводили в два етапи: спочатку впродовж 7 діб на поживному середовищі BG11 з додатковим внесенням 20 мМ бікарбонату натрію, а після 7 діб на середовищі BG11 з вилученим азотом і фосфором. Культивування відбувалося при 30 °C з постійним освітленням інтенсивністю освітлення 50 мкмоль м⁻²с⁻¹. На 7 день вирощування на середовищі без азоту та фосфору модифікований штам накопичував 39% від сухої біомаси полігідроксибутирату та 31,9% від сухої біомаси глікогену.

Застосування полігідроксибутирату. Полігідроксибутират привернув до себе значну увагу як екологічно чистий біополімер, пропонуючи стійку альтернативу традиційним пластмасам, отриманим з нафтохімії. Здатність до біорозкладання і біосумісність полімеру роблять його привабливим матеріалом у різних галузях промисловості, особливо там, де вплив на навколишнє середовище викликає занепокоєння. Полігідроксибутират, отриманий у результаті життєдіяльності мікроорганізмів, проявляє властивості, притаманні синтетичним полімерам, що робить

його перспективним альтернативним кандидатом звичним пластикам для подальшого зменшення пластикових відходів. Через схожі із синтетичними полімерами властивостями та здатність до біорозкладання, полігідроксibuтират може використовуватись в харчовій і медичній промисловостях.

У харчовій промисловості полігідроксibuтират можна використовувати як пакування. Але чистий полігідроксibuтират є відносно крихким і може демонструвати низьку гнучкість, що може призвести до тріщин при використанні як харчового пакування. З огляду на таку інформацію *Manikandan* зі співавторами оцінювали можливість покращення властивостей нанокompозиту полігідроксibuтирату для пакування харчових продуктів (*Manikandan, Pakshirajan, & Pugazhenthii, 2020*). У результаті досліджень вчені визначили, що додаткове внесення 0,7% графенових нанопластин до полігідроксibuтирату значно покращує показники термостійкості, міцності на розрив і зменшення проникнення ультрафіолетового та видимого світла. Також було проведено модальне дослідження з визначення терміну придатності при використанні цього матеріалу під час пакування картопляних чипсів і молочних продуктів. Отриманий матеріал продемонстрував чотирикратне збільшення терміну зберігання, що свідчить про можливість використання цього композиту як пакувального матеріалу для харчових продуктів.

На додаток до звичної заміни пластику на біодеградубельний природний полімер полігідроксibuтират також може використовуватись в антимікробних плівкових покриттях, які допомагають зберігати продукт більш тривалий період, що з огляду на щорічну кількість викинутих продуктів через їх псування є важливим.

У дослідженні (*Xavier, Babusha, George, & Ramana, 2015*) розглядали можливість виробництва антимікробних плівок на основі полігідроксibuтирату з додаванням ваніліну. Під час досліджень визначали антимікробні властивості отриманих плівок з різними концентраціями ваніліну проти харчових патогенів, а саме *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* та *Staphylococcus aureus*, а також грибів, таких як *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum* та *Penicillium clavigerum*. Встановлено, що отримані плівкові покриття демонстрували зниження максимального термічного розкладання і міцності плівок на розрив, однак у результаті швидкого вивільнення ваніліну в харчові продукти вони демонстрували гарні показники мінімальної інгібуючої дії: для бактерій від 80 мкг/г ПГБ, а для грибів — від 50 мкг/г ПГБ.

Correa з співавторами (*Correa et al., 2017*) досліджували вплив активації нізном біорозкладної плівки полігідроксibuтирату/полікапролактону на покращення термінів зберігання шинки. Дослідження показало, що отримана плівка давала змогу збільшити термін зберігання шинки шляхом значного інгібування *Lactobacillus plantarum* CRL691, який використовувався як модельна бактерія псування обробленого м'яса.

У 2018 р. вчені проводили дослідження щодо використання біорозкладної упаковки для зберігання лосося (*Ma, Li, & Wang, 2018*). Дослідники встановили, що використання плівкового покриття з полімолочної кислоти/полігідроксibuтирату з внесенням гліцерин монолаурату як пластифікатора демонструє значно менші показники утворених бактерій (4,65 КУО/г на 17 день), в той час як подібна плівка,

тільки з внесенням монокаприліну гліцерату як пластифікатора, та плівка на основі етиленвінілового спирту демонстрували значно гірші показники — 6,65 і 6,35 КУО/г на 15-й день зберігання, відповідно.

У праці (Rech et al., 2021) досліджували вплив внесення ефірних олій у плівки з полігідроксибутирату на антимікробні властивості. Внесення ефірних олій в плівки з полігідроксибутирату покращило термічну стабільність і знизило температуру плавлення полімеру в результаті його пластифікації порівняно з чистим полігідроксибутиратом. Також комбінація ефірних олій у плівках з полігідроксибутирату, зокрема кориці і чайного дерева (мелалеуки) та кориці і цитронели демонстрували антимікробний ефект щодо *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 19093, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Aspergillus niger* ATCC 6275 та *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Також через біодоступність полігідроксибутирату перспективним напрямком використання є біомедицина. Одним із перспективних варіантів використання полігідроксибутирату є використання його в кістковій інженерії. Так, Karahaliloglu зі співавторами оцінювали вплив створених наноструктур з полігідроксибутирату на клітинні функції остеобластів (Karahaliloglu et al., 2015). Для створення мембран з полігідроксибутирату вчені проводили лужну обробку полімеру гідроксидом натрію, яка дала змогу збільшити гідрофільність поверхні полігідроксибутирату. Отримана мембрана демонструвала покращену проліферацію людських остеобластів, а також інгібувала ріст *Staphylococcus aureus* більш ніж на 60% після 48 год культивування.

Degli Esposti зі співавторами розробляли біосумісні та біорозсмоктувані наноструктурні пористі каркаси на основі полігідроксибутирату для інженерії кісткової тканини (Degli Esposti, Chiellini, Bondioli, Morselli, & Fabbri, 2019). Отриманий матеріал демонстрував повну цитосумісність і здатність підтримувати адгезію і проліферацію мишачих преостеобластних клітин MC3T3-E1, а також на створеному каркасі переважали клітини остецитоподібної морфології.

Meischel зі співавторами оцінювали вплив імплантів полімерних композитів з полігідроксибутирату на кістки щурів (Meischel et al., 2016). Дослідження проводили на стегновій кістці зростаючих щурів, в результаті було встановлено що композит PNB з ZrO_2 із 30% вмістом Herafill, а також Mg-сплав WZ21 показали найвищі показники накопичення кісткової тканини навколо імпланту. Всі досліджувані варіанти полігідроксибутиратових композитів не демонстрували розкладання після 36 тижнів. Показники пружності, міцності на розрив і деформаційні властивості отриманих композитів близькі до кістки, однак сила адгезії між кісткою та імплантами є низькою.

Вплив крохмалю на полігідроксидні каркаси для інженерії кісткової тканини досліджували у (Asl, Karbasi, Beigi-Boroujeni, Benisi, & Saeed, 2021). Встановлено, що оптимальна концентрація крохмалю в полігідроксибутиратному каркасі становить 10%. Таке доповнення сприяє збільшенню міцності на розрив отриманого каркасу, також збільшується проліферація клітин MG-63 та активність лужної фосфатази. У сформованих клітинах MG-63 на полімерному каркасі відбувається мінералізація та відкладення кальцію, що робить цей каркас перспективним кандидатом у подальшій інженерії кісткової тканини.

Полігідроксibuтирати також знаходять застосування як агенти для доставки ліків.

Chaturvedi зі співавторами оцінювали використання полігідроксibuтирату як агента для пероральної доставки інсуліну (Chaturvedi et al., 2015). В дослідженні використовувався пегільований полігідроксibuтират, конюгований дезоксихолевою кислотою. Отримані наночастинки з інкапсульованим інсуліном демонстрували незначне вивільнення речовини в кислому середовищі та повне вивільнення в лужному середовищі. Тестування *in vivo* продемонструвало, що при внесенні досліджуваних наночастинок з інкапсульованим інсуліном діабетичним щурам призводило до значного зменшення рівня глюкози в крові, починаючи з 4 год і до 24 год, тобто такий спосіб доставки інсуліну давав змогу вводити його з пролонгованим вивільненням.

Використання полігідроксibuтирату як потенційного наноносія для доставки протипухлинних пептидів оцінювали в (Karoor et al., 2016). У ході експериментів вчені провели конюгацію полігідроксibuтирату з поліетиленгліколем. Цей матеріал використовували для інкапсуляції протиракового пептиду NuBCP-9. Ефективність інкапсуляції препарату становила 61%, а час вивільнення пептиду 26 діб відповідно. Наночастинки продемонстрували індукції апоптозу в клітинах MCF-7. Додатково було проведено внутрішньочеревинне введення 20 мг/кг наночастинок полігідроксibuтирату з інкапсульованим пептидом двічі на тиждень протягом трьох тижнів мишам, що спричинило 90% регресію пухлин.

Babos з співавторами оцінювали можливість використання наночастинок полігідроксibuтирату для доставки комбінації протипухлинних препаратів, а саме сорафенібу та доксорубіцину (Babos et al., 2020). У результаті досліджень було отримано наночастинки полігідроксibuтирату з інкапсульованим доксорубіцином та сорафенібом, частину яких додатково кон'югували поліетиленгліколем. У подальшому досліджували цитотоксичність отриманих наночастинок з інкапсульованими препаратами на клітинах колоректальної карциноми HCT-116. Результати експериментів продемонстрували, що через 6 год обидва варіанти наночастинок діяли подібно до контрольного розчину препаратів, в той час як через 24 год цитотоксичний ефект наночастинок значно посилювався.

Perveen з співавторами досліджували ефективність наночастинок полігідроксibuтирату завантажених епірубіцином (Perveen, Masood, & Nameed, 2020). Наночастинки полігідроксibuтирату з інкапсульованим епірубіцином, було отримано шляхом нанопреципітації. В результаті отримані наночастинки з препаратом продемонстрували тривале вивільнення препарату (8 днів) при pH 4,0, в той час як при pH 7,0 вивільнення препарату відбувалось значно швидше (2 дні). Також при визначенні антибактеріальних властивостей отриманих наночастинок було продемонстровано значно кращий результат порівняно зі стандартним використанням препарату. Покращення антибактеріальних властивостей відбулось приблизно в 6,5 раза проти метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus*.

Pandian зі співавторами вивчали використання наночастинок полігідроксibuтирату для доставки урсолової кислоти з метою терапії раку (Pandian et al., 2022). В ході дослідження виявлено, що ефективність інкапсуляції становила 54%, а максимальна ефективність доставки сформованих наночастинок відбувалась на 96 год, що підтверджується максимальною цитотоксичністю щодо ракових клітин (HeLa).

Полігідроксibuтират також демонструє значний потенціал у формуванні каркасів. Його застосування охоплює інженерію опорно-рухового апарату та нервової тканини, де він підтримує адгезію, проліферацію та диференціацію клітин, а також сприяє процесам регенерації та відновлення тканин.

Ching з співавторами досліджували використання нановолокнистих каркасів, виготовлених із сумішей полігідроксibuтирату/полігідроксіоктаноату, для інженерії хрящової тканини (Ching et al., 2016). Конструкції були виготовлені за допомогою електропрядіння, в результаті чого були отримані волокнисті структури, що імітують сітку колагенових фібрил нативного хряща. Дослідження дало змогу оптимізувати жорсткість, швидкість деградації та біосумісність каркасів, виявивши, що композит полігідроксibuтирату/полігідроксіоктаноату в співвідношенні 1 до 0,25 забезпечує міцність, наближену до міцності нативного хряща. *In vitro* людські суглобові хондроцити, культивовані на цих каркасах, продемонстрували високу життєздатність з утворенням гіаліноподібного хряща. Протягом чотирьох місяців деградація каркасу зменшувала його міцність, що сприяло інтеграції новоутвореного хрящового матриксу. Дослідження продемонструвало, що полігідроксibuтират/полігідроксіоктаноат каркаси є перспективними для клінічної регенерації хряща і можуть слугувати платформою для створення каркасів для інших тканин.

Sanhueza зі співавторами досліджували вплив нановолокон желатину подвійного розміру з мікроволокнами полігідроксibuтирату для загоєння діабетичних ран (Sanhueza et al., 2021). Оптимізовані умови електроспінування дали змогу отримати структуру, що імітує позаклітинний матрикс, — біоміметичний каркас. Зшитий з геніпіном, цей каркас продемонстрував високу життєздатність фібробластів, гемосумісність і покращене загоєння ран у діабетичних щурів. Каркас желатин/полігідроксibuтират покращив регенерацію тканин завдяки кращому формуванню епідермісу, відкладенню колагену та розвитку волосяних фолікулів, перевершуючи монокомпонентні каркаси та контрольні зразки.

Köse з співавторами оцінили взаємодію мезенхімальних стовбурових клітин людини з випадковими r-ПГБ та вирівняними a-ПГБ електроспінованими ПГБ-матрицями (Köse, Kaya, Denkbaş, Korkusuz, & Cetinkaya, 2016). Дослідники виявили, що мезенхімальних стовбурові клітини на a-ПГБ матрицях мають веретеноподібну морфологію та вищу остеогенну диференціацію, в той час як r-ПГБ підтримують більш рівномірне поширення клітин. Обидві матриці сприяли адгезії, життєздатності та диференціації мезенхімальних стовбурових клітин, що вказує на потенціал для застосування в інженерії кісткової та нервової тканин.

Codreanu зі співавторами досліджували потенціал модифікованого бактеріальною целюлозою полігідроксibuтирату для створення кісткової тканини при критичних кальваріальних дефектах у мишей (Codreanu et al., 2020). Дослідження продемонструвало, що матриця полігідроксibuтират/целюлоза підтримує проліферацію преадипоцитів 3T3-L1 та сприяє диференціації остеобластів *in vivo*, що призводить до утворення нової кісткової тканини через 20 тижнів. Посилення остеогенезу пояснювалося підвищенням активності лужної фосфатази та мінералізацією, що спостерігалася за допомогою рентгенографії, і гістологічними ознаками зрілої кісткової тканини. Матриці мали механічні властивості, близькі до кіст-

кової тканини, і продемонстрували біосумісність без значної токсичності. Ці результати свідчать про те, що матриця полігідроксibuтират/целюлоза може слугувати ефективним біоматеріалом для відновлення великих кісткових дефектів.

Висновки

Проведений аналіз демонструє значний потенціал ціанобактерій як ефективних продуцентів полігідроксibuтирату (ПГБ) — біорозкладного полімеру, що є перспективною альтернативою традиційним пластикам. Дослідження показують, що ключовими стратегіями для підвищення виходу ПГБ є метаболічна та генетична інженерія, яка передбачає експресію генів, відповідальних за його синтез. Крім того, суттєве збільшення накопичення ПГБ досягається завдяки оптимізації умов культивування. Перехід від лабораторних експериментів до пілотного виробництва в трубчастих фотобіореакторах і розробка кінетичних моделей свідчать про те, що технологія готова до масштабування. У харчовій промисловості ПГБ використовують не лише як біорозкладний пакувальний матеріал, але й як основу для створення активних плівок. Внесення таких добавок, як графенові нанопластики, ванілін або ефірні олії, дає змогу покращити його фізико-хімічні властивості, збільшити термін зберігання продуктів та інгібувати ріст патогенних мікроорганізмів. Особливе значення ПГБ має в біомедицинській сфері, де його біосумісність і здатність до біодеградації відкривають нові можливості. Він успішно застосовується для створення каркасів у тканинній інженерії, сприяючи проліферації та диференціації клітин кісткової, хрящової та нервової тканин. Крім того, наночастинки на основі ПГБ є перспективними носіями для цільової та пролонгованої доставки ліків, зокрема інсуліну та протипухлинних препаратів.

Отже, біотехнологія виробництва ПГБ з використанням ціанобактерій є надзвичайно перспективною для створення сталого виробництва біополімерів.

Література

- Aikawa, S., Nishida, A., Ho, S. H., Chang, J. S., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2014). Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. *Biotechnology for biofuels*, 7, 1—8. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-88>.
- Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PloS one*, 11(6), e0158168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168>.
- Arisaka, S., Terahara, N., Oikawa, A., & Osanai, T. (2019). Increased polyhydroxybutyrate levels by ntcA overexpression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Algal Research*, 41, 101565. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101565>.
- Asl, M. A., Karbasi, S., Beigi-Boroujeni, S., Benisi, S. Z., & Saeed, M. (2021). Evaluation of the effects of starch on polyhydroxybutyrate electrospun scaffolds for bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 500—513. <https://doi.org/10.1016/j.ijbmac.2021.09.078>.
- Babos, G., Rydz, J., Kawalec, M., Klim, M., Fodor-Kardos, A., Trif, L., & Feczko, T. (2020). Poly (3-hydroxybutyrate)-based nanoparticles for sorafenib and doxorubicin anticancer drug delivery. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7312. <https://doi.org/10.3390/ijms21197312>.
- Brasil, B. D. S. A. F., de Siqueira, F. G., Salum, T. F. C., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2017). Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal research*, 25, 76—89. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035>.

Carpine, R., Du, W., Olivieri, G., Pollio, A., Hellingwerf, K. J., Marzocchella, A., & dos Santos, F. B. (2017). Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly- β -hydroxybutyrate overproduction. *Algal research*, 25, 117—127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>.

Carpine, R., Olivieri, G., Hellingwerf, K. J., Pollio, A., Pinto, G., & Marzocchella, A. (2019). Photoautotrophic production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria: nitrate effects and screening of strains. *Environ Eng Manag J.*, 18(6), 1337—1346. <http://dx.doi.org/10.30638/eemj.2019.127>.

Catarina Guedes, A., Katkam, N. G., Varela, J., & Xavier Malcata, F. (2014). Photobioreactors for cyanobacterial culturing. *Cyanobacteria: an economic perspective*, 270—292. <https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch17>.

Chaturvedi, K., Ganguly, K., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E., Krauss, L., Nadagouda, M. N., & Aminabhavi, T. M. (2015). Oral insulin delivery using deoxycholic acid conjugated PEGylated polyhydroxybutyrate co-polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 10(10), 1569—1583. <https://doi.org/10.2217/nmm.15.36>.

Ching, K. Y., Andriotis, O. G., Li, S., Basnett, P., Su, B., Roy, I., ..., & Stolz, M. (2016). Nanofibrous poly (3-hydroxybutyrate)/poly (3-hydroxyoctanoate) scaffolds provide a functional microenvironment for cartilage repair. *Journal of biomaterials applications*, 31(1), 77—91. <https://doi.org/10.1177/0885328216639749>.

Codreanu, A., Balta, C., Herman, H., Cotoraci, C., Mihali, C. V., Zurbau, N., & Hermenean, A. (2020). Bacterial cellulose-modified polyhydroxyalkanoates scaffolds promotes bone formation in critical size calvarial defects in mice. *Materials*, 13(6), 1433. <https://doi.org/10.3390/ma13061433>.

Comer, A. D., Abraham, J. P., Steiner, A. J., Korosh, T. C., Markley, A. L., & Pfleger, B. F. (2020). Enhancing photosynthetic production of glycogen-rich biomass for use as a fermentation feedstock. *Frontiers in energy research*, 8, 93. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00093>.

Correa, J. P., Molina, V., Sanchez, M., Kainz, C., Eisenberg, P., & Massani, M. B. (2017). Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 31—39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.11.004>.

Da Silva, C. K., Costa, J. A. V., & de Moraes, M. G. (2018). Polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Spirulina* sp. LEB 18 using biopolymer extraction waste. *Applied biochemistry and biotechnology*, 185, 822—833. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2687-x>.

Degli Esposti, M., Chiellini, F., Bondioli, F., Morselli, D., & Fabbri, P. (2019). Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 286—296. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.014>.

González-Resendiz, L., Sánchez-García, L., Hernández-Martínez, I., Viguera-Ramírez, G., Jiménez-García, L. F., Lara-Martínez, R., & Morales-Ibarria, M. (2021). Photoautotrophic poly (3-hydroxybutyrate) production by a wild-type *Synechococcus elongatus* isolated from an extreme environment. *Bioresource Technology*, 337, 125508. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125508>.

Hondo, S., Takahashi, M., Osanai, T., Matsuda, M., Hasunuma, T., Tazuke, A., ..., & Asayama, M. (2015). Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(5), 510—517. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.004>.

Kaewbai-Ngam, A., Incharoensakdi, A., & Monshupanee, T. (2016). Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemicola* TISTR 8095. *Bioresource technology*, 212, 342—347. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.035>.

Kamravamanesh, D., Kovacs, T., Pflügl, S., Druzhinina, I., Kroll, P., Lackner, M., & Herwig, C. (2018). Increased poly- β -hydroxybutyrate production from carbon dioxide in randomly mutated cells of cyanobacterial strain *Synechocystis* sp. PCC 6714: Mutant generation and characterization. *Bioresource technology*, 266, 34—44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.057>.

Kamravamanesh, D., Pflügl, S., Nischkauer, W., Limbeck, A., Lackner, M., & Herwig, C. (2017). Photosynthetic poly- β -hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714. *AMB express*, 7, 1—12. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9>.

- Kapoor, S., Gupta, D., Kumar, M., Sharma, S., Gupta, A. K., Misro, M. M., & Singh, H. (2016). Intracellular delivery of peptide cargos using polyhydroxybutyrate based biodegradable nanoparticles: Studies on antitumor efficacy of BCL-2 converting peptide, NuBCP-9. *International journal of pharmaceuticals*, 511(2), 876—889. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.077>.
- Karahaliloglu, Z., Ercan, B., Taylor, E. N., Chung, S., Denkbaş, E. B., & Webster, T. J. (2015). Antibacterial nanostructured polyhydroxybutyrate membranes for guided bone regeneration. *Journal of biomedical nanotechnology*, 11(12), 2253—2263. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2106>.
- Kavitha, G., Kurinjimalar, C., Sivakumar, K., Aravind, R., Shree, C. G., Arthi, K., ..., & Rengasamy, R. (2016). Mass cultivation of UV-B adapted *Arthrospira platensis* RRGK under open raceway pond for the production of Poly-β-hydroxy butyrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1304—1316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.105>.
- Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., & Jantaro, S. (2016). Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresource technology*, 214, 761—768. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>.
- Koch, M., Bruckmoser, J., Scholl, J., Hauf, W., Rieger, B., & Forchhammer, K. (2020). Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator PirC. *Microbial cell factories*, 19, 1—12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01491-1>.
- Köse, S., Kaya, F. A., Denkbaş, E. B., Korkusuz, P., & Cetinkaya, F. D. (2016). Evaluation of biocompatibility of random or aligned electrospun polyhydroxybutyrate scaffolds combined with human mesenchymal stem cells. *Turkish Journal of Biology*, 40(2), 410—419. <http://dx.doi.org/10.3906/biy-1508-18>.
- Ma, Y., Li, L., & Wang, Y. (2018). Development of PLA-PHB-based biodegradable active packaging and its application to salmon. *Packaging Technology and Science*, 31(11), 739—746. <https://doi.org/10.1002/pts.2408>.
- Manikandan, N. A., Pakshirajan, K., & Pugazhenth, G. (2020). Preparation and characterization of environmentally safe and highly biodegradable microbial polyhydroxybutyrate (PHB) based graphene nanocomposites for potential food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 866—877. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.084>.
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>.
- Meischel, M., Eichler, J., Martinelli, E., Karr, U., Weigel, J., Schmöller, G., ..., & Stanzl-Tschegg, S. E. (2016). Adhesive strength of bone-implant interfaces and in-vivo degradation of PHB composites for load-bearing applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 53, 104—118. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.004>.
- Pandian, S. R. K., Kunjiappan, S., Pavada, P., Sundarapandian, V., Chandramohan, V., & Sundar, K. (2022). Delivery of ursolic acid by polyhydroxybutyrate nanoparticles for cancer therapy: in silico and in vitro studies. *Drug Research*, 72(02), 72—81. <https://doi.org/10.1055/a-1640-0009>.
- Perveen, K., Masood, F., & Hameed, A. (2020). Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 144, 259—266. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.049>.
- Rajan, K. P., Thomas, S. P., Gopanna, A., & Chavali, M. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB): A standout biopolymer for environmental sustainability. In *Handbook of ecomaterials*, 1—23. Springer, Cham. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_92.
- Rech, C. R., Brabes, K. C., Silva, B. E., Martinez, M. A., Silveira, T. F., Alberton, J., & Martelli, S. (2021). Antimicrobial and physical-mechanical properties of polyhydroxybutyrate edible films containing essential oil mixtures. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 1202—1211. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-020-01943-0>.
- Roh, H., Lee, J. S., Choi, H. I., Sung, Y. J., Choi, S. Y., Woo, H. M., & Sim, S. J. (2021). Improved CO₂-derived polyhydroxybutyrate (PHB) production by engineering fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for potential utilization of flue gas. *Bioresource technology*, 327, 124789. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124789>.

- Rueda, E., & García, J. (2021). Optimization of the phototrophic Cyanobacteria polyhydroxybutyrate (PHB) production by kinetic model simulation. *Science of the Total Environment*, 800, 149561. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149561>.
- Rueda, E., García-Galán, M. J., Díez-Montero, R., Vila, J., Grifoll, M., & García, J. (2020). Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures. *Bioresource technology*, 295, 122233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122233>.
- Sanhueza, C., Hermosilla, J., Bugallo-Casal, A., Da Silva-Candal, A., Taboada, C., Millán, R., & Acevedo, F. (2021). One-step electrospun scaffold of dual-sized gelatin/poly-3-hydroxybutyrate nano/microfibers for skin regeneration in diabetic wound. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111602. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111602>.
- Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Mala, J. (2017). Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1213—1232. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-016-1006-1>.
- Singh, M. K., Rai, P. K., Rai, A., Singh, S., & Singh, J. S. (2019). Poly-β-hydroxybutyrate production by the cyanobacterium *Scytonema geitleri* Bharadwaja under varying environmental conditions. *Biomolecules*, 9(5), 198. <https://doi.org/10.3390/biom9050198>.
- Smith, A. J. (1983). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, 134(1), 93—113. [https://doi.org/10.1016/S0769-2609\(83\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S0769-2609(83)80099-4).
- Stal, L. J. (1992). Poly (hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. *FEMS Microbiology Reviews*, 9(2—4), 169—180. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90307-A](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90307-A).
- Suh, I. S., & Lee, C. G. (2003). Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 8, 313—321. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02949274>.
- Tharasirivat, V., & Jantaro, S. (2023). Increased biomass and polyhydroxybutyrate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 overexpressing RuBisCO genes. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6415. <https://doi.org/10.3390/ijms24076415>.
- Troschl, C., Meixner, K., Fritz, I., Leitner, K., Romero, A. P., Kovalcik, A., & Drosch, B. (2018). Pilot-scale production of poly-β-hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal research*, 34, 116—125. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.011>.
- Xavier, J. R., Babusha, S. T., George, J., & Ramana, K. V. (2015). Material properties and antimicrobial activity of polyhydroxybutyrate (PHB) films incorporated with vanillin. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, 1498—1510. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1660-9>.
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Nagarajan, D., & Chang, J. S. (2019). Design of photobioreactors for algal cultivation. In *Biofuels from algae*, 225—256. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00010-X>.
- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., & Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments*, 7(2), 13. <https://doi.org/10.3390/environments7020013>.
- Zhang, S., Liu, Y., & Bryant, D. A. (2015). Metabolic engineering of *Synechococcus* sp. PCC 7002 to produce poly-3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate. *Metabolic engineering*, 32, 174—183. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.10.001>.