

## Coproducción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos por *Enterobacter soli* en cultivo sumergido

Ana Patricia Gayosso<sup>1</sup>, José Andrés Herrera<sup>1</sup>, Neith Aracely Pacheco<sup>2</sup>, Ricardo Hernández<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco subsección sureste, Mérida, Yuc. CP 97302.

<sup>3</sup> CONAHCYT-Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946.

\*odracerhema@gmail.com

### Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopolímeros intracelulares, que en los últimos años, han generado gran interés debido a que poseen características similares a la de plásticos sintéticos además, son de naturaleza biológica y biodegradables. Sin embargo, su industrialización es un reto debido a que los costos de producción son de 4 a 9 veces mayores que el requerido para los plásticos sintéticos, por lo cual surge la necesidad de diseñar estrategias que contribuyan a disminuir los costos de producción. De esta manera, la coproducción de PHA con otros metabolitos de interés industrial surge como alternativa para dar valor agregado a moléculas cuya industrialización es condicionada por los altos costos de producción. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo de cultivo y la fuente de carbono (sacarosa, fructosa y glucosa) sobre la coproducción de PHA y exopolisacáridos por *Enterobacter soli* en cultivo sumergido. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de los biopolímeros esta en función del tiempo de cultivo, por otro lado, al evaluar diferentes fuentes de carbono la producción de exopolisacáridos no mostró diferencias significativas, mientras que la mayor producción de PHA se obtuvo en presencia de sacarosa.

**Palabras Claves:** *Biopolímero, bioplástico, exopolisacárido, coproducción*

### Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are intracellular biopolymers, which in recent years, have generated great interest because they have similar characteristics to synthetic plastics, in addition, they are from biological nature and biodegradable. However, its industrialization is a challenge because production costs are 4 to 9 times higher than that required for synthetic plastics, so there is a need to design strategies that contribute to reducing production costs. In this way, the PHAs co-production with other metabolites of industrial interest emerges as an alternative to give added value to molecules whose industrialization is conditioned by high production costs. Therefore, the present was evaluated the effect of cultivation time and carbon source (sucrose, fructose and glucose) on the co-production of PHAs and exopolysaccharides using *Enterobacter soli* in submerged culture. The results indicated that the production of biopolymers is a function of cultivation time, on the other hand, when evaluating different carbon sources, the production of exopolysaccharides did not show significant differences, while the highest production of PHA was obtained when sucrose was used.

**Key Words:** *Biopolymer, bioplastic, exopolysaccharide, co-production*

## Introducción

Los polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros intracelulares sintetizados por microorganismos como reserva de carbono y energía en respuesta a condiciones de crecimiento adversas (Wang et al., 2019; Kumar et al., 2018; Luo et al., 2020). A lo largo de los años se ha demostrado que los PHA poseen características fisicoquímicas similares a los plásticos convencionales como el polipropileno y el poliestireno (Khatami et al., 2021), por lo cual son considerados clasificados como bioplásticos (Dilshad et al., 2021), dichas características los convierten en una alternativa natural para sustituir a los plásticos convencionales.

Dentro de los principales microorganismos conocidos como productores de PHA se puede destacar bacterias como *Ralstonia* sp., *Bacillus* sp., *Halomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. Asimismo, se ha reportado que las características del biopolímero dependerán de la fuente de carbono y el microorganismo utilizado, y dependiendo de estos se sintetizan diversas unidades monoméricas de hidroxiácidos dentro de la cadena principal, siendo estas unidades las que determinan la aplicación más adecuada (textil, biomédico, agrícola, farmacéutico, entre otros) (Ghosh et al., 2021; Kumar et al., 2021). Por ello, se ha generado interés entre la comunidad científica, generando la expectativa de búsqueda de microorganismos productores de PHA. No obstante, pese a las ventajas que presentan los PHA sobre los plásticos convencionales, la industrialización de estos biopolímeros se ve limitada por los altos costos de producción que van de 4 a 9 veces mayor en comparación a los plásticos sintéticos (Kosseva y Rusbandi 2018).

En la actualidad, la coproducción de metabolitos en un mismo sistema ha surgido como como estrategia adecuada para la disminución de costos de producción (Kopperi et al., 2021; Kumar et al., 2018). La coproducción hace énfasis en lograr enfoques integradores que conduzcan hacia la obtención de múltiples productos en una misma línea de producción, de esta manera se permite obtener beneficios adicionales al darle valor agregado a metabolitos con valores relativamente bajos (como los PHA), a partir de la co-síntesis de productos con aplicaciones rentables en distintos sectores

industriales (Bongiovani et al., 2019; Dzurendova et al., 2020). En el caso de los PHA se ha reportado su coproducción con exopolisacáridos (EPS) en cultivo sumergido, por ejemplo, Soto et al., 2021 indicaron que *Yangia* sp ND199 co-sintetizó  $3.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHA y  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de EPS utilizando fructosa como fuente de carbono; Bathia et al., 2022 reportaron que *Sphigobium yanoikuyae* BBL01 acumuló 40.8% p/p de PHA, mientras que produjo  $2.83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de EPS, empleando como sustrato biomasa hidrolizada de pino. Por otra parte, Kopperi et al., 2020 obtuvieron valores de 2.62 y  $3.92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHA y EPS, respectivamente, utilizando glucosa como fuente de carbono y como microorganismo la bacteria *Providencia* sp.

Los EPS son polímeros con actividades fisiológicas y funcionales que tienen diversas aplicaciones en la industria de alimentos y medicina, por lo que son considerados biomoléculas de alto interés industrial (Xu et al., 2019; Zhao et al., 2021). En el sector alimenticio los EPS son utilizados como agentes espesantes, estabilizadores o emulsionantes debido a sus propiedades reológicas; por otra parte, en el campo médico sirven como antioxidantes, antibacteriano, anticancerígeno, antihipertensivo y potenciador de la inmunorregulación (Yalda et al., 2019; Zhou et al., 2019).

En el caso particular del género *Enterobacter* se ha observado la capacidad de producir PHAs y EPS, sin embargo, los estudios publicados solo se han centrado en la obtención de dichos biopolímeros sin considerar la coproducción en un mismo sistema (Dhanya et al., 2021; Kringsly et al., 2022; Prakash et al., 2021, Rakkan et al., 2023). Pese a los beneficios que ofrece la generación de bioplásticos como los PHAs, en México no existe investigación suficiente para establecer la producción comercial sostenible, es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la coproducción de PHA y EPS por la bacteria *Enterobacter soli* utilizando diferentes fuentes de carbono.

## Materiales y Métodos

### Microorganismo

La coproducción de PHAs y EPS fue realizada utilizando *Enterobacter soli* perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología

Microbiana del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

## *Pruebas cualitativas para la determinación de la producción de polihidroxicanoatos*

Para determinar la capacidad de producción de PHA por la bacteria *Enterobacter soli* se realizaron dos pruebas cualitativas: Tinción de gránulos con Negro de Sudan y determinación en caja Petri con Azul de Nilo.

### Tinción de gránulos

La cepa *E. soli* se inoculó en placas de agar nutritivo suplementado con 20 g/L de sacarosa, y se mantuvo a 28 °C durante 48 h. Posterior al tiempo de incubación se realizó un frotis a partir de las colonias crecidas en el medio, tiñendo la superficie del portaobjetos con una solución de Negro de Sudán B al 0.3% (en etanol al 70%). Después de 10 min el portaobjetos con la muestra se lavó con xileno, seguido de una coloración con safranina al 0.5% (Prabhudev et al., 2023).

### Medio Azul de Nilo

La cepa *E. soli* se inoculó en placas de agar nutritivo suplementada con 8 g/L de sacarosa y 0.5 mg/mL de azul de Nilo B y se mantuvo a 28 °C durante 72 h. La aparición de un color naranja fluorescente tras la irradiación con luz ultravioleta de las colonias que crecieron en las placas son indicativo resultado positivo para la producción de PHAs (Vega-Vidaurre et al., 2022).

### *Preparación del inóculo y conservación de la cepa*

La cepa se reactivó en tubos inclinados con agar nutritivo (23 g·L<sup>-1</sup>) suplementado con glucosa (10 g·L<sup>-1</sup>), y fue mantenida a 28 °C por 24 h. La cepa reactivada se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio compuesto por (g·L<sup>-1</sup>): caldo nutritivo (8) y glucosa (20 g·L<sup>-1</sup>). Los matraces se mantuvieron a 32 °C por 24 h a 150 rpm, la biomasa producida se consideró como el inóculo.

Para la conservación, la cepa se inoculó en tubos inclinados de Agar Nutritivo (23 g·L<sup>-1</sup>) suplementado con glucosa (10 g·L<sup>-1</sup>) y se mantuvo a 32 °C por 24 h. La biomasa producida en los tubos se cosecho con 5 mL de tween 80 al 0.01% y la suspensión fue inoculada (para aumentar la biomasa) en matraces Erlenmeyer que contenían Caldo Nutritivo. El cultivo se mantuvo a 32 °C por 24

h a 150 rpm, la biomasa se recuperó por centrifugación a 10,000 x g por 15 min, el pellet obtenido se lavó dos veces y fue resuspendido en agua. Finalmente, la suspensión fue colocada en criovales que contenían glicerol al 50 % y esferas de vidrio estériles y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso (Castilla-Marroquín et al., 2020). A la cepa conservada se le determinó viabilidad al menos cada tres meses y fue conservada periódicamente.

### *Coproducción de Polihidroxicanoatos y Exopolisacáridos*

La coproducción de PHAs y EPS se llevó a cabo por cultivo sumergido utilizando matraces de 125 mL que contenían 75 ml de medio compuesto por (g·L<sup>-1</sup>): caldo nutritivo (8); fuente de carbono (20); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.5), ajustando el inóculo a 2x10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> y fue mantenido en agitación a 32 °C y 150 rpm. Para determinar el efecto de la fuente de carbono sobre la coproducción de metabolitos se utilizó sacarosa, glucosa y fructosa.

### *Extracción de Polihidroxicanoatos*

La extracción de PHA se realizó por digestión de acuerdo a lo descrito por Meneses et al., 2022 con algunas modificaciones. La biomasa producida en el sistema se separó del medio del cultivo por centrifugación a 10,000 x g por 15 min, fue lavada dos veces con agua destilada y liofilizada. La digestión fue realizada resuspendiendo la biomasa en 3 mL de solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v), la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente por 3 h y centrifugada, los pellets recuperados fueron lavados con agua destilada. Finalmente, la purificación de los PHAs se realizó lavando con isopropanol frío y secados por liofilización para su análisis.

### *Recuperación de Exopolisacáridos*

Los EPS fueron recuperados por precipitación adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por cada volumen de sobrenadante; la mezcla fue mantenida a 4°C por 24 h (Anguluri et al., 2022). Los EPS precipitados se recuperaron por centrifugación a 10,000 x g, fueron lavados dos veces con etanol al 80% (v/v) y se liofilizaron para su análisis (Aramsangtienchai et al., 2020).

## *Caracterización de Polihidroxicanoatos y Exopolisacáridos*

Los PHA y EPS producidos por *E. soli* se caracterizaron mediante la técnica espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (F-TIR). Los espectros infrarrojos de las muestras purificadas se registraron en la región 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  (Soto et al., 2020).

## *Análisis estadístico*

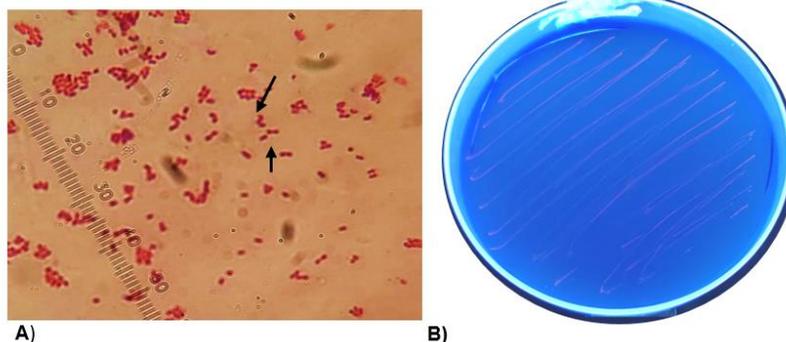
Se realizó un análisis de varianza unidireccional para detectar diferencias significativas entre las medias de los resultados obtenidos a partir de las diferentes fuentes de carbono. Para realizar la separación de medias se hizo la prueba de Tukey con un  $\alpha = 0.05$ .

## Resultados y Discusión

### *Determinación de la capacidad de producción de polihidroxicanoatos*

Se realizaron las pruebas de tinción con Negro de Sudán B y siembra en medio Azul de Nilo

para verificar la capacidad de producción de PHA por *Enterobacter soli*, los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 1. El resultado de ambas pruebas fue positivo para la producción de PHAs, por un lado la tinción con Negro de Sudán B indicó la presencia de gránulos negros al interior de la célula (figura 1A), esta reacción sucede debido al contacto del colorante con el grupo ácido de los PHAs. Mientras que, los resultados de la siembra en placas con Azul de Nilo demostraron que el crecimiento celular al ser irradiado con luz ultravioleta mostraba una coloración naranja fluorescente (figura 1B), indicando la presencia de PHAs en el medio. De acuerdo con Hong et al., 2020 el Azul de Nilo es un colorante lipofílico que emite fluorescencia en entornos hidrofóbicos, es por ello por lo que los PHA al ser de naturaleza lipídica interaccionan con el colorante, resultando en la coloración fluorescente en luz ultravioleta. Con los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas se determinó que *E. soli* tiene la capacidad de acumular PHAs.

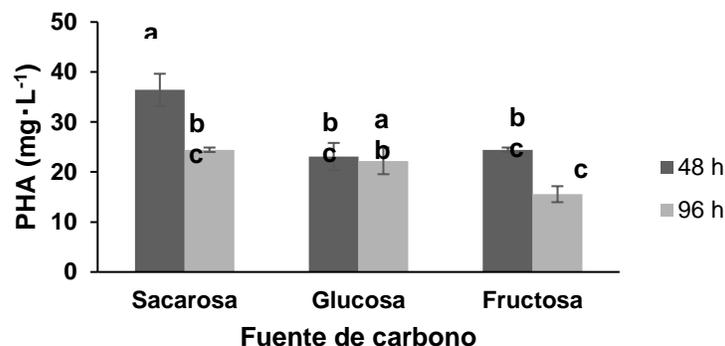


**Figura 1.** Pruebas cualitativas para la determinación de capacidad de producción de PHA. A) Tinción con Negro de Sudán, presencia de inclusiones negras al interior de la célula correspondientes a gránulos de PHA. B) Acumulación de PHA detectada por el método Azul de Nilo.

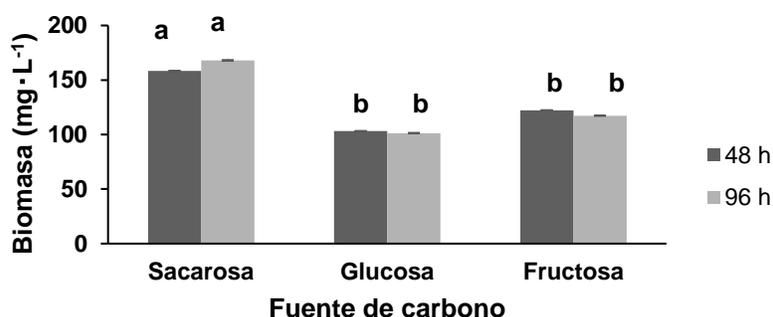
### *Producción de polihidroxicanoatos*

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de PHA utilizando sacarosa, glucosa y fructosa como fuente de carbono. Los resultados de la producción de biomasa y PHAs que se muestran en la figura 2 y 3 muestran que tanto la producción de biomasa como PHAs fue mayor cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono. Sin embargo, la máxima producción de PHAs fue observada a las 48 h mientras que la máxima producción de biomasa a las 96 h con las tres fuentes de

carbono (Figura 2). Los resultados obtenidos pueden ser el reflejo del posible agotamiento de nutrientes, la baja disponibilidad de enzimas para la biosíntesis de PHAs y/o el consumo de PHAs como fuente de carbono por las células microbianas (reserva energética) (Gomaa, 2014), estos resultados apoyan a la determinación del tiempo adecuado para la recuperación de PHAs (Geethu et al., 2021). Por lo anterior se considera que el tiempo óptimo para la recuperación de PHA con *E. soli* es a las 48 h, en las condiciones evaluadas.



**Figura 2.** Producción de PHA por *E. coli* utilizando tres fuentes de carbono indicada en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 3.** Producción de biomasa por *E. coli* utilizando diferentes fuentes de carbono indicada en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los resultados de la evaluación del efecto de la fuente de carbono indicaron que la mayor producción de biomasa se obtuvo a las 96 h utilizando sacarosa ( $168 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mientras que la menor producción se presentó a las 96 h ( $103 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en presencia de glucosa (Figura 3). Los resultados mostraron que no existe una relación entre la producción de biomasa y PHAs, ya que el mayor contenido de PHAs se observó a las 48 h en presencia de sacarosa 22.75% p/p y un rendimiento de  $36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , seguido de glucosa (22.30% p/p,  $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y fructosa (19.7 % p/p,  $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), con respecto a la biomasa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que se ha reportado el mayor rendimiento de biomasa y PHAs utilizando sacarosa como fuente de carbono. Asimismo, en 2022 Muneer et al. indicaron que al utilizar sacarosa al 2% con *Pseudomonas* sp. AK-3 y *Pseudomonas* sp. AK-4, cuando se obtenía la máxima concentración de biomasa había una

acumulación de PHB de 50 y 47% p/p, respectivamente. Además, Li et al., 2021 al evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono (azúcares y ácidos grasos de cadena corta) sobre la producción de PHB con la bacteria *Vibrio alginolyticus*, encontraron la mayor producción de biomasa ( $4.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con un contenido de PHB del 37% p/p utilizando sacarosa como fuente de carbono, en contraste, cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono la máxima concentración de biomasa fue de  $1.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y el contenido de PHB fue menor al 10% p/p. También, estudios con la bacteria *Marinobacterium zhoushanense* mostraron que el mayor rendimiento de biomasa ( $4.57 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y PHB ( $2.89 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fue obtenido en presencia de sacarosa (Wang et al., 2022).

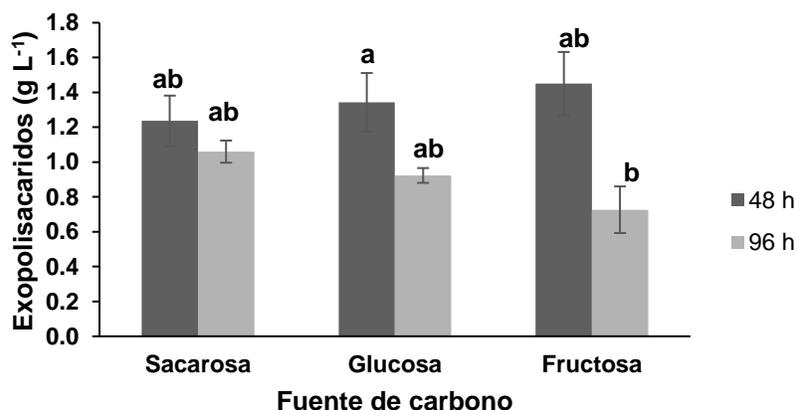
Los resultados obtenidos en el presente trabajo se alinean a lo reportado por Clifton-García et al., 2020, quienes sugieren que para la producción de PHA es importante considerar el uso de microorganismos que metabolizan fuentes de carbono de bajo costo

y fácil disponibilidad como lo es la sacarosa, mismo que se puede encontrar en la melaza de caña de azúcar, un coproducto abundante en la industria azucarera (Sohn et al., 2020), motivo por el cual la producción de PHAs con *E. soli* puede ser un proceso susceptible de escalamiento para poder producir estas biomoléculas a gran escala.

### Producción de exopolisacáridos

La cepa *Enterobacter soli* fue capaz de producir EPS en el mismo medio que se recuperaron los PHAs, utilizando diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa) (Figura 4). Los rendimientos más altos se obtuvieron a las 48 h de incubación, los cuales oscilaron entre 1.24 a 1.45 g·L<sup>-1</sup>. Aunque la mayor producción de EPS se observó cuando se utilizó fructosa como

fente de carbono, el análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa en el rendimiento de EPS a las 48 h con respecto al uso de sacarosa, glucosa y fructosa como fuente de carbono, tal y como se puede observar en la Figura 4. Los rendimientos obtenidos en el presente trabajo son superiores a lo reportado para bacterias ácido-lácticas como *Streptococcus thermophilus* 29 mg·L<sup>-1</sup> (Karadeniz et al., 2021) y *Lactobacillus paracasei* TD 062 0.609 g·L<sup>-1</sup> (Zhang et al., 2021). Sin embargo, bacterias del género *Leuconostoc* producen mayor contenido de EPS, por ejemplo, *L. mesenteroides* SN-8 produjo 2.42 g·L<sup>-1</sup> de EPS (Li et al., 2020) y *L. pseudomesenteroides* A24 3.726 g·L<sup>-1</sup> (Aita y Moon, 2020), teniendo sacarosa en el medio de cultivo a una concentración de 50 g/L.



**Figura 2.** Rendimientos del precipitado recuperado en cultivo sumergido por *E. soli* con tres fuentes de carbono, indicado en g·L<sup>-1</sup>. Letras diferentes indican diferencias significativas

Por lo anterior, se considera que los rendimientos de EPS obtenidos se encuentran dentro del rango de lo publicado en la literatura. Además, es importante considerar que la concentración de fuente de carbono en el medio fue inferior a lo reportado por los autores anteriores, por lo que el rendimiento de dichos biopolímeros por *E. soli* es susceptible de ser mejorado.

### Conclusiones

Se demostró que *Enterobacter soli* es capaz de coproducir polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos en el mismo cultivo, siendo la sacarosa la mejor fuente de carbono para la obtención de ambos polímeros.

### Referencias

- Aita GM, Moon YH (2023) EPS-Producing Microorganisms from Louisiana's Crusher Juice and the Effect of Processing Conditions on EPS Production. *Sugar Tech*, 25: 482-490. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01235-y>
- Anguluri K, La China S, Brugnoli M, De Vero L, Pulvirenti A, Cassanelli S, Gullo M (2022) Candidate Acetic Acid Bacteria Strains for Levan Production, 14: 2000. <https://doi.org/10.3390/polym14102000>
- Aramsangtienchai P, Kongmon T, Pechroj S, Srisook (2020) Enhanced production and immunomodulatory activity of levan from the acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*, 163: 574-581.

# Artículos

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.001>

Bathia SK, Gurav R, Ñim B, Kim S, Cho D-H, jung H, Kim Y-G, Yang Y-H (2022) Coproduction of exopolysaccharide and polyhydroxyalkanoates from *Sphingobium yanoikuyae* BBL01 using biochar pretreated plant biomass hydrolysate *Bioresource Technology*, 361: 127753.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127753>

Bongiovani N, Popovich CA, Martínez AM, Constela D, Leonardi PI (2019) Biorefinery Approach from *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978: Neutral Lipid and Carotenoid Co-Production Under Nitrate or Phosphate Deprivation. *Bioenergy Research*, 13: 518-529.

<https://doi.org/10.1007/s12155-019-10045-2>

Castilla-Marroquin JD, Hernández-Martínez R, Debernardi de la Vequia H, Rojas-López M, Hernández-Rosas F (2020). Dextran synthesis by native sugarcane microorganisms, 19: 177-185. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1793>

Clifton-García B, González-Reynoso O, Robledo-Ortiz JR, Villafaña-Rojas J, González-García Y (2020) Forest soil bacteria able to produce homo and copolymers of polyhydroxyalkanoates from several pure and waste carbon sources. *Letters in Applied Microbiology*, 70(4): 300-309.

<https://doi.org/10.1111/lam.13272>

Dhanya BE, Athmika, Rekha PD (2021) Characterization of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp. YU16-RN5 and its potential to alleviate cadmium induced cytotoxicity in vitro. *3 Biotech*, 11 (12): 491.

<https://doi.org/10.1007/s13205-021-03034-w>

Dilshad E, Waheed H, Ali U, Amin A, Ahmed I (2021) General Structure and Classification of Bioplastics and Biodegradable Plastics. In *Bioplastics for Sustainable Development*. Kuddus M, Roohi (eds). Springer, Singapore. pp. 61-82.

Dzurendova S, Zimmermann B, Kohler A, Tafintseva V, Slany O, Certik M, et al (2020) Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced coproduction of high-value metabolites in

oleaginous Mucoromycota fungi. *PLoS ONE*, 15(6): e0234870.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234870>

Geethu M, Chandrashekar HR, Divyashree MS (2021). Statical optimisation of polyhydroxyalkanoates production in *Bacillus endophyticus* using sucrose as sole source of carbon. *Archives of Microbiology*, 203: 5993-6005.

<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02554-6>

Ghosh S, Lahiri D, Nag N, Dey A, Sarkar T, Pathak SK, Atan H, Pati S, Ray R (2021) Bacterial biopolymer: its role in pathogenesis to effective biomaterials. *Polymers*, 13(8): 1242. Doi [10.3390/polym13081242](https://doi.org/10.3390/polym13081242)

Gomaa EZ (2014). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57: 145-154, [10.1590/S1516-89132014000100020](https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100020)

Hong K, Beld J, Davis TD, Burkart MD, Palenik B (2020) Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene *PhaC* in cyanobacteria. *Journal of Phycology* 57(3): 754-765. <https://doi.org/10.1111/jpy.13123>

Karadeniz DG, Kaskatepe B, Kiyimaci ME, Tok KC, Gumustas M, Karaasian C (2021) Microbial exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus* and its anti-quorum sensing activity. *Archives of Microbiology*, 203: 3331-3339.

<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02313-7>

Khatami K, Perez-Zabaleta M, Owusu-Agyeman I (2021) Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?. *Waste Management*, 119: 374-388.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>

Kopperi H, Amulya A, Venkata S (2021) Simultaneous biosynthesis of bacterial polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS): Process optimization and Scale-up. *Bioresource Technology*, 341: 125735.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125735>

5

Kosseva MR, Rusbandi E (2018) Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 107: 762-778. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054>

Kringsly JS, Chathalingath N, Parthiban ST, Sivakumar D, Sabtharishi S et al (2022) Utilization of sugarcane molasses as the main carbon source for the production of polyhydroxyalkanoates from *Enterobacter cloacae*. *Energy Nexus*, 6: 100071. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100071>

Kumar AN, Katakajwala R, Amulya K, Venkata S. 2021. Polyhydroxybutyrate Production from Dark-Fermentative Effluent and Composite Grafting with Bagasse Derived  $\alpha$ -Cellulose in a Biorefinery approach. *Chemosphere*, 279: 130563. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130563>

Kumar P, Kim BS (2018) Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269: 544-556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>

Kumar P, Kim BS (2018) Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269: 544-556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>

Li H-F, Wang M-R, Tian L-Y, Li Z-J (2021) Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Salt Fields. *Molecules*, 26(20): 6283. <https://doi.org/10.3390/molecules26206283>

Luo C-B, Li H-C, Li D-Q, Nawaz H, You TT, Xu (2022) Efficiently unsterile polyhydroxyalkanoate production from lignocellulose by using alkali-halophilic *Halomonas alkalicola* M2. *Bioresource Technology*, 351: 126919. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126919>

Meneses L, Esmail A, Matoa M, Sevrin C, Grandfils C, Barreiros S, Reis MAM, Freitas F, Paiva A (2022) Subcritical Water as a Pre-Treatment of Mixed Microbial Biomass for the Extraction of Polyhydroxyalkanoates. *Bioengineering*, 9: 302.

<https://doi.org/10.3390/bioengineering9070302>

Muneer F, Rasul I, Oasim M, Sajid A, Nadeem H (2020) Optimization, Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Indigenously Isolated Novel Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*, 30: 3523-3533. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02444-y>

Prabhudev S, Shihavi K, Prakashrao (2023) Polyhydroxyalkanoates biosynthesis and optimization of thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain K4E3\_SPR\_NPP. *Extremophiles* 27 (13). <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01300-8>

Prakash K, Rajkumar P, Ramya V, Sivabalan S, Kings AJ, Monisha LR (2021) Exopolysaccharide production by optimized medium using novel marine *Enterobacter cloacae* MBB8 isolate and its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2: 100070. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100070>

Rakkan T, Paichid N, Sangkharak K (2022) The Integration of Methylene Blue Decolorization with Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production Using *Enterobacter* Strain TS1L. *Journal of Polymers and the Environment*, 31: 1202-1208. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02692-y>

Sohn YJ, Kim, HT, Baritugo K-A, Song HM, Ryu MH, Kang KH, Jo SY, Kim H, Kim YJ, Choi J et al (2020). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149: 593-599. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.254>

Soto L, Thabet H, Maghembe R, Gameiro D, Van-Thuoc D, Dishisha T, Hatti-Kaul R (2020) Metabolic potential of the moderate halophile *Yangia* sp. ND199 for co-production of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *Microbiology Open*, 10: e1160. Doi 10.1002/mbo3.1160

Vega-Vidaurre JA, Hernández-Rosas F, Ríos-Corripio MA, Rojas-López M, Hernández-Martínez R (2022). Coproduction of polyhydroxyalkanoates and

# Artículos

exopolysaccharide by submerged fermentation using autochthonous bacterial strains. *Chemical Papers*, 76: 2419-2429. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-02046-3>

Wang M-R, Li H-F, Yi J-J, Tao S-Y, Li (2022) Production of polyhydroxyalkanoates by three novel species of *Marinobacterium*. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 195(15): 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.019>

Xu Y, Cui Y, Yue F, Liu L, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Lü X (2019) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94: 475-499.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>

Yalda RS, Ahmad YK, Bahram PG A (2019) A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrates Polymers*, 217: 79-89.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>

Zhao D, Jiang J, Liu L, Wang S, Ping W, Ge J (2021) Characterization of exopolysaccharides produced by *Weissella confusa* XG-3 and their potential biotechnological applications. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 178: 306-315.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.182>