

폴리하이드록시부틸레이트 회수를 위한 물리적 세포 파쇄용 돌기형 탄소나노튜브 분리막 제작

문지원·백영빈[†]

인하대학교 바이오시스템융합학과

(2023년 12월 4일 접수, 2023년 12월 7일 수정, 2023년 12월 7일 채택)

Development of Physical Cell Lysis Using a Spiked CNT Membrane for Polyhydroxybutyrate Recovery

Jiwon Mun and Youngbin Baek[†]

Department of Biological Science and Bioengineering, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

(Received December 4, 2023, Revised December 7, 2023, Accepted December 7, 2023)

요약: 석유기반 플라스틱의 대체제인 폴리하이드록시부틸레이트(polyhydroxybutyrate, PHB)의 기존 추출방법은 분자량 감소 및 물성 변형을 일으킨다. 본 연구에서는 기능화 된 탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)를 부착한 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통해 물리적 파쇄를 발생시켜 미생물 내 축적된 PHB를 추출하고자 하였다. 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 물리적 파쇄를 확인하기 위해 대장균 용액으로 여과 실험을 수행하여 불활성화를 관찰하였다. 또한 PHB를 축적한 미생물 용액의 여과를 수행하여 PHB가 추출되었는지 확인하였더니 가장 대표적인 추출방법인 chloroform과 비교하여도 여과로 인한 추출이 4% 높은 성능을 가진 것을 관찰하였다. 본 결과를 통해 친환경적 바이오 플라스틱 회수를 위한 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 적용 가능성을 확인하였다.

Abstract: Conventional extraction methods for polyhydroxybutyrate (PHB), a sustainable alternative to petroleum-based plastics, cause a decrease in molecular weight and a change in properties. In this work, we developed a method to extract PHB accumulated in microorganisms by physical disruption through filtration using a spiked carbon nanotube (CNT) membrane with functionalized CNT. In addition, filtration of the PHB-containing microbial solution was performed to confirm PHB extraction, which was found to be 4% more efficient than chloroform, the most used extraction method. These results indicate that the spiked CNT membrane has potential in the bioplastics recovery process.

Keywords: polyhydroxybutyrate, carbon nanotube, spiked membrane, cell lysis, extraction

1. 서론

플라스틱의 편의성과 낮은 비용으로 인해 전 세계 플라스틱 소비량은 2억 톤 이상이며 매년 5%씩 증가하고 있다[1]. 환경오염에 대비하여 정부 및 기업들은 석유기반 플라스틱을 대체할 수 있는 바이오 플라스틱에 집중하였다. 바이오 플라스틱의 한 종류인 PHAs (polyhydroxyalkanoates)는 여러 개의 R-hydroxyalkanoates로

구성된 미생물 열가소성 폴리에스테르 계열로서 세포질 내 과립 형태로 저장된다[2]. PHAs 단량체 내 탄소 원자 수에 따라 PHAs는 단쇄 길이(short-chain length, 탄소 원자 3~5개), 중쇄 길이(medium-chain length, 탄소 원자 6~14개), 장쇄 길이 PHAs (long-chain length, 탄소 원자 15개 이상)로 분류된다[3]. PHAs는 생체 적합성이 높고, 생분해와 재활용이 가능하며[4], 우수한 인장 강도와 탄성을 가져[5] 포장재뿐만 아니라 의료용 임플란

[†]Corresponding author(e-mail: ybbaek@inha.ac.kr; <http://orcid.org/0000-0002-7250-9944>)

트나 조직 공학 재료로서 사용이 가능하다[6,7].

전 세계 PHAs 시장 규모는 약 5700억 원이며 2031년 까지 연평균 성장률이 9.2%로 급격한 성장 중에 있다 [8]. 그러나 PHAs는 여전히 석유 기반 플라스틱에 비해 경쟁력이 없는데 그 이유는 미생물 내에 축적되는 PHAs의 추출 및 정제의 어려움으로 많은 비용이 발생 하기 때문이다. 실제로 석유기반 플라스틱의 생산비용 이 1.0 €/kg 미만인 것에 비해 PHAs는 2.2~5.0 €/kg으로 최대 5배 이상 높은 비용이 발생한다는 것을 확인할 수 있다[9]. 또한 PHAs 다운 스트림 공정은 생산비용의 최대 50%를 차지한다[10].

PHAs를 추출하는 방법은 크게 유기용매와 같은 화학적 처리를 통해 세포를 용해하는 방법과 기계적인 파쇄로 세포를 깨뜨려 PHAs를 얻는 방법이 있다[11]. 가장 많이 사용되는 유기용매인 chloroform 및 dichloromethane는 PHAs의 용해도가 가장 높지만 인체에 심각한 영향을 미치고 환경오염을 발생시킨다[12]. 산성이나 sodium hypochlorite 용액을 사용하는 경우에는 PHAs의 분자량이 감소하는 치명적인 단점이 발견되었다[13,14]. 화학적 첨가를 하지 않는 기계적 파쇄 방법인 비드밀, 고압균질기, 초음파 처리의 경우에도 PHAs 추출 시 바이오 매스의 용량과 농도에 제한이 있으며 높은 효율을 위해서는 추가적인 화학적 처리가 필요하다는 문제점이 존재한다[15,16] 효소를 사용하여 세포 및 세포 내 단백질을 용해하는 PHAs 추출도 친환경적인 대안으로 거론되긴 하나 효소 생산은 추출공정의 비용을 증가시키는 단점이 있다[16].

본 연구에서는 PHAs의 종류 중 하나인 PHB (polyhydroxybutyrate)를 사용하여 화학적 추출방법이 PHB 물성에 영향을 끼치는 것을 확인하였다. 또한 기능화된 탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)를 부착한 돌기형 탄소나노튜브 분리막을 제작한 후 대장균 현탁액의 여과를 수행하여 불활성화를 관찰하였다. 그리고 PHB를 축적한 미생물의 여과를 통해 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 물리적 파쇄가 PHB 추출을 초래하는 것을 확인하였다.

2. 실험 재료 및 실험 방법

2.1. 재료

실험에서 사용한 CNT는 Carbon Nano-material Technology 사의 multi-walled carbon nanotubes (MWCNT,

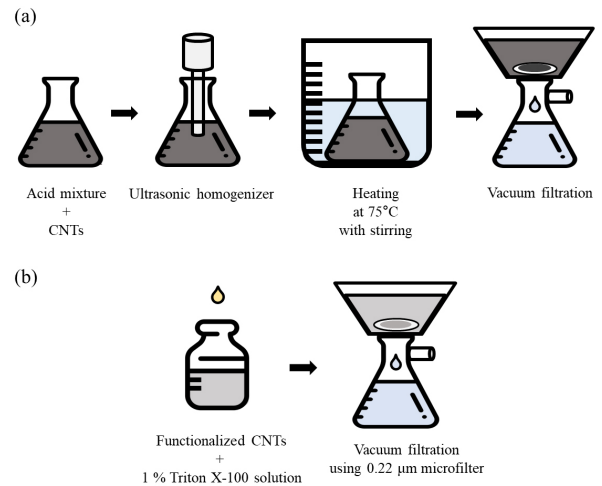


Fig. 1. Preparation of (a) functionalized CNTs and (b) spiked CNT membranes.

CNT MR-99)를 사용하였다. 산 처리 시 사용한 sulfuric acid (H_2SO_4 , 98%), nitric acid (HNO_3 , 60%)은 Daejung Chemicals의 제품이며 PHB powder, TritonTM X-100, chloroform ($CHCl_3$, 99%), phosphate buffer saline (PBS)는 Merck Millipore에서 구매하였다. Aceton (CH_3COCH_3 , 99.5%)은 Duksan Pure Chemical에서 구매하였다. 여과에 사용한 분리막은 0.22 μm Durapore[®] Membrane Filter (polyvinylidene fluoride, PVDF)와 Millipore Express[®] Plus (polyethersulfone, PES)이다.

2.2. 돌기형 탄소나노튜브 분리막 제작

돌기형 탄소나노튜브 분리막을 제작하기 위해서 분산력이 높고 길이가 짧은 CNT가 필요하기 때문에 산 처리를 통해 CNT를 카르복실 그룹으로 기능화하여 분산력을 증가시켰다[17,18]. Fig. 1(a)는 CNT 기능기 도입, Fig. 1(b)는 돌기형 탄소나노튜브 분리막 제작 모식도이다. 기능화된 CNT를 제조하기 위해서 67.5 mL의 sulfuric acid 와 22.5 mL의 nitric acid를 혼합하여 부피비가 3:1이 되도록 한 후 0.2 g의 CNT를 넣어주었다. 이후 20 kHz의 주파수를 갖는 초음파 균질기(ultrasonic homogenizer, STH-750S, 750 W)의 pulse를 5 초간 on/off를 반복하여 20~60 min 처리한 후 75°C에서 가열 및 교반 하였다. 처리 시간을 최적화하기 위해 Table 1과 같이 4개의 조건을 만들어 실험을 진행하였다. 산 처리가 끝난 용액은 상온에서 냉각하여 2 L의 초순수에 희석한 후, 0.2 μm Whatman[®] anodisc aluminium oxide membrane (Anodisc, 47 mm diameter)를 이용하

Table 1. Functionalized CNT Samples Preparation under Different Operating Parameters

	Ultrasonic homogenizer time (min)	Heating time (min)
Sample 1	20	320
Sample 2	30	300
Sample 3	60	240

여 진공 여과하여 기능화된 CNT를 회수하였다. 돌기형 탄소나노튜브 분리막 제작 시 기능화 된 CNT의 분산력을 더욱 증가시키기 위해 Triton x-100 용액을 추가하였다[19]. 30 mg/L의 농도로 CNT를 초순수에 분산시킨 후 전체 부피의 1%의 Triton x-100을 혼합하였다. 원하는 용량의 CNT 용액을 PVDF 또는 PES 분리막 위에 진공 여과하여 돌기형 탄소나노튜브 분리막을 제조하였다. 추가적으로 계면활성제를 완전히 세척하기 위해 초순수 200 mL를 여과시켜 미생물 불활성화 실험에 사용하였다.

2.3. 미생물 불활성화 실험

미생물 불활성화 실험에 대장균(*E. coli* C3000)을 사용하였고 Difco™ LB agar와 LB broth를 이용하여 고체배지와 액체배지를 제작하였다. 37°C에서 18 h 동안 고체배지에서 성장한 대장균 콜로니를 액체배지에 접종한 후 37°C에서 24 h 동안 배양하였다. 3000 rpm에서 15 min 동안 원심분리를 한 후 상등액을 제거하고 PBS로 세척하는 과정을 3회 반복하여 $> 10^8$ CFU/mL 농도의 대장균 현탁액 30 mL를 제조하였다.

기능화 된 CNT가 자체적인 항균성을 갖는지 확인하기 위해 10 mL의 대장균 현탁액(10^8 CFU/mL in PBS)에 기능화 된 CNT 0.01 g을 넣어 농도가 1 g/L 되도록 하였다. 대조군으로는 CNT를 혼합하지 않은 10 mL의 대장균 현탁액(10^8 CFU/mL in PBS)을 사용하였다. 500 rpm 조건에서 교반을 수행하고 0, 0.5, 1, 3, 5, 24, 48 h 후 샘플을 채취하여 희석한 다음에 평판도말법을 통해 활성화된 대장균의 개체수를 정량분석하였다.

돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통해 대장균이 불활성화되는지 확인하기 위해 0.001 mg, 0.005 mg, 0.02 mg, 0.1 mg의 CNT를 PVDF 분리막에 부착한 돌기형 탄소나노튜브 분리막을 제작하여 진탕여과 장치를 이용하여 0.2 bar, 800 rpm 조건에서 여과 실험을

수행하였다. 원수는 200 mL의 대장균 현탁액(10^4 CFU/mL in PBS)을 사용하였으며 반복여과를 통해 미생물 불활성화 결과를 평판도말법을 통해 확인하였다.

2.4. 분석

화학적 처리로 인해 PHB의 물성에 변화가 발생하는지 확인하기 위해 fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR, VERTEX 80v, Bruker) 분석을 수행하였다. 유리 바이알에 0.1 g씩 소분한 PHB powder에 5 mL의 chloroform과 acetone을 각각 첨가한 후 진탕배양기에서 200 rpm 조건으로 24 h 동안 반응시켰다. chloroform과 acetone을 상온에서 24 h 동안 증발시킨 다음 FT-IR을 수행하였다.

기능화 된 CNT와 제작한 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 표면을 관찰하기 위해 scanning electron microscope (SEM, S-4200, Hitachi)을 15.0 kV 전압, 배율 범위는 $\times 9,000$ 에서 $\times 90,000$ 로 수행하였다.

돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통해 대장균의 불활성화가 발생하는지 확인하기 위해 confocal laser scanning microscopy (CLSM, LSM 510-META, Carl Zeiss)을 수행하였다. 10^7 CFU/mL 농도의 대장균 현탁액 100 mL를 여과한 분리막을 1×1 cm 로 자른 다음 슬라이드 글라스에 올려놓고 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit를 사용하여 염색시킨 후 CLSM을 관찰하였다.

Chloroform 추출과 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통해 얻은 용액으로 nanoparticle tracking analysis (NTA, ZetaView®)를 수행하여 PHB가 추출되었는지 확인하였다. chloroform 추출 시 PHB를 축적한 미생물 현탁액(10^8 CFU/mL in PBS) 10 mL를 9000 rpm에서 15 min 동안 원심 분리하고 상등액을 제거하였다. 그 다음 10 mL의 chloroform을 넣고 30°C, 100 rpm 조건에서 48 h 동안 진탕배양을 수행하였다. 이후 15000 rpm으로 원심분리하여 추출된 PHB를 가리얏히고 상등액을 제거하여 남아있는 유기용매는 증발시켰다. 마지막으로 1 mL의 PBS를 넣어 NTA를 측정하였다. 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통한 추출의 경우, PHB를 축적한 미생물 현탁액(10^4 CFU/mL in PBS) 200 mL를 18번 동안 반복 여과 수행하였다. 투과액은 3000 rpm에서 원심 분리하여 세포 및 세포 파편을 제거하여 NTA를 측정하였다.

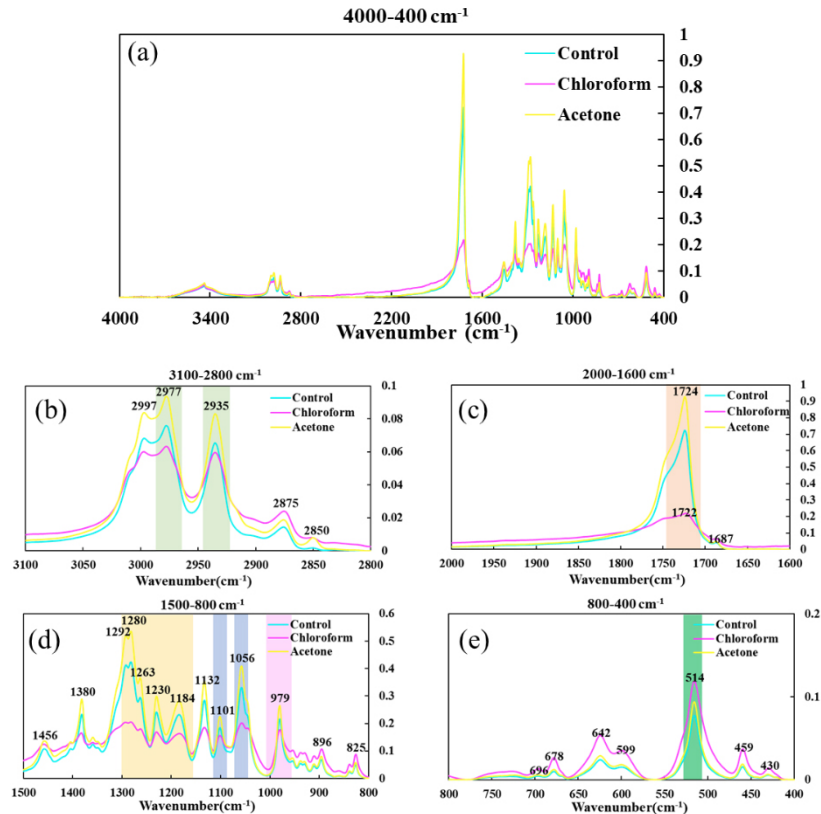


Fig. 2. FT-IR spectrum of the polymer samples using different polyhydroxybutyrate (PHB) extraction methods. (a) the entire wavenumber range ($4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$), and (b) $3100\sim 2800\text{ cm}^{-1}$, (c) $2000\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, (d) $1500\sim 800\text{ cm}^{-1}$, and (e) $800\sim 400\text{ cm}^{-1}$.

3. 결과 및 고찰

3.1. FT-IR 분석

Fig. 2는 화학적 처리를 하지 않은 PHB powder와 chloroform과 acetone 처리를 한 PHB powder의 FT-IR spectrum이다. Fig. 2(b-e)를 보면 PHB의 특정 기능기 (예: C=O group at $1724\sim 1740\text{ cm}^{-1}$, C-O-C group at $1150\sim 1300\text{ cm}^{-1}$, CH₃ bond at 2977 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , C-O bond at 1100 cm^{-1} , 1058 cm^{-1} [20])를 통해 PHB를 확인하였다. 특히 $1740\sim 1722\text{ cm}^{-1}$ 은 PHB의 가장 특징적인 피크를 갖는 파장대로서 결정질과 비결정질을 나타낸다[21]. 대조군과 비교하여 chloroform 처리를 한 PHB 피크가 확연히 다른 양상을 보이는데 (Fig. 2(c)), 이는 chloroform 처리가 PHB 물성에 변형을 일으켰다는 것을 나타낸다.

3.2. 돌기형 탄소나노튜브 분리막 표면

Fig. 3은 제작한 돌기형 탄소나노튜브 분리막 표면의

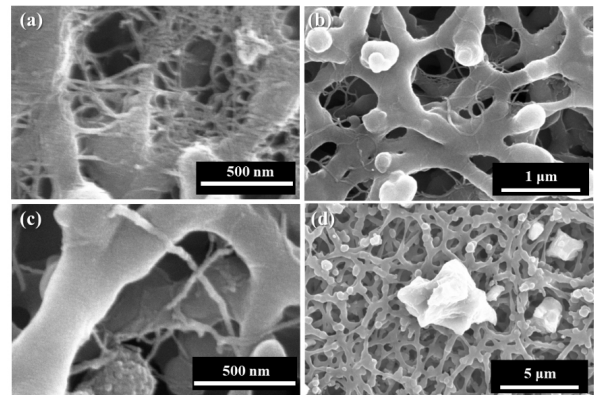


Fig. 3. SEM images of functionalized CNT samples on the membranes as a function of ultrasonic homogenizer time (a) untreated, (b) 20 min, (c) 30 min, and (d) 60 min.

SEM 이미지이다. Fig. 3(a)는 산처리를 하지 않은 CNT로서 낮은 분산력과 긴 길이로 인해 PES 분리막 표면에 응집되어 있는 것을 볼 수 있다. Fig. 3(b)는 초음파 균질기로 20 min 처리 및 가열 320 min 수행한 CNT이

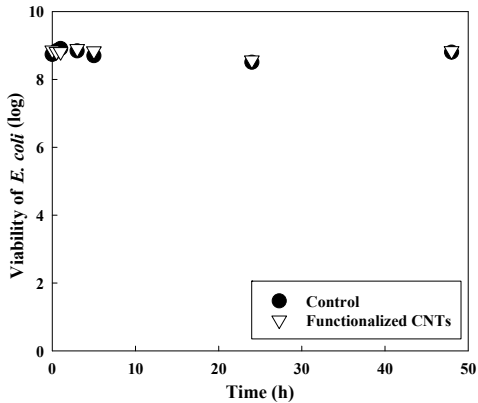


Fig. 4. Viability of *E. coli* after stirring experiments with functionalized CNTs.

며 Fig. 3(c)는 초음파 균질기로 30 min 처리 및 가열 300 min 수행한 CNT이다. Fig. 3(a)와 비교했을 때 Fig. 3(b), (c)는 CNT 가닥들끼리 응집되는 현상이 감소한 것을 확인하였다. 그러나 초음파 균질기로 60 min 처리 및 가열 240 min 수행한 CNT (Fig. 3(d))의 경우, CNT 구조가 무너져 튜브 형태가 아닌 비정질 탄소와 같은 변형이 발생한 것을 관찰하였다. 따라서 대장균 불활성화 실험 시 사용하는 돌기형 탄소나노튜브 분리막은 초음파 균질기를 30 min 처리한 CNT를 사용하여 실험을 수행하였다. 참고로 기능화된 CNT는 용액의 분산도는 큰 차이를 보이지 않았다.

3.3. 대장균 불활성화 실험

Fig. 4는 대장균 현탁액과 기능화된 CNT를 함께 교반한 실험 결과이다. 대조군의 대장균의 농도는 0 h에서 8.7 log, 48 h가 지난 후엔 8.8 log로 확인되었다. 기능화 된 CNT를 넣은 대장균 농도는 0 h에서 8.9 log, 48 h가 지난 후엔 8.8 log가 관찰되었는데 이는 기능화된 CNT가 대장균을 불활성화 시키지 못한 것을 의미한다.

Fig. 5는 0.001~0.1 mg을 부착한 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과 시간에 따른 대장균 log reduction ($\log_{10}N_0/N$) 결과이다. N_0 는 원수의 대장균(CFU)의 수이고 N 은 여과 후 샘플링한 용액의 대장균(CFU)의 수이다. 약 180 min의 여과 후 0.001 mg, 0.005 mg, 0.02 mg, 0.1 mg 돌기형 탄소나노튜브 분리막에서는 각각 0.83, 0.91, 1.2, 0.96 log reduction이 관찰되었는데 이를 통해 0.02 mg을 부착한 돌기형 탄소나노튜브 분리

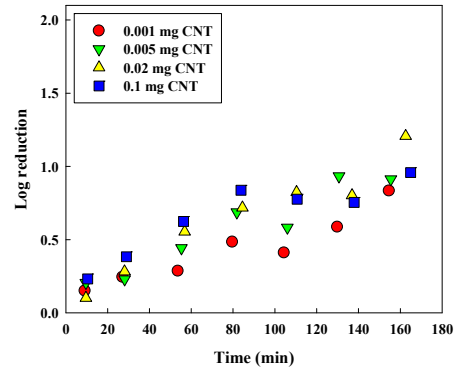


Fig. 5. Log reduction of *E. coli* after filtration with spiked CNT membranes using various CNT mass.

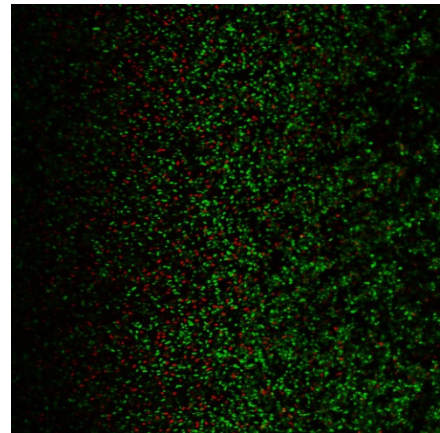


Fig. 6. CLSM image of a spiked CNT membrane surface after filtration with *E.coli* solution.

막이 1.2 log로 가장 높은 불활성화를 일으키는 것으로 확인되었다. CNT가 세포를 불활성화 시키는 원인으로 접촉을 통한 화학적 사멸(세포막의 전자전달계의 장애, 세포 외피 침투, 세포 성분의 산화, 활성 산소종과 같은 2차 생성물 발생)[22-24]과 물리적인 세포막 파쇄[25]로 인한 사멸로 구분될 수 있다. 교반 실험을 통해 본 연구에서 사용한 CNT로 인한 화학적 사멸은 없었으므로 여과실험에서 발생한 1.2 log 수준의 불활성화된 미생물들은 분리막의 돌기형 구조 CNT로 인해 발생한 물리적 파쇄인 것으로 사료된다. 이는 기존 문헌에서 보고된 바와 같이, 수직 정렬된 CNT 막의 여과를 통해 막 표면에서 미생물의 부착 저해와 사멸이 발생한 결과와 일치한다[26]. 그러나 CNT 질량에 따른 미생물 사멸정도가 큰 차이를 보이지 않아 관련하여 CNT 종류, 공극 크기 등의 최적화에 관한 추가연구가 필요하다.

Fig. 6는 여과 후 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 표

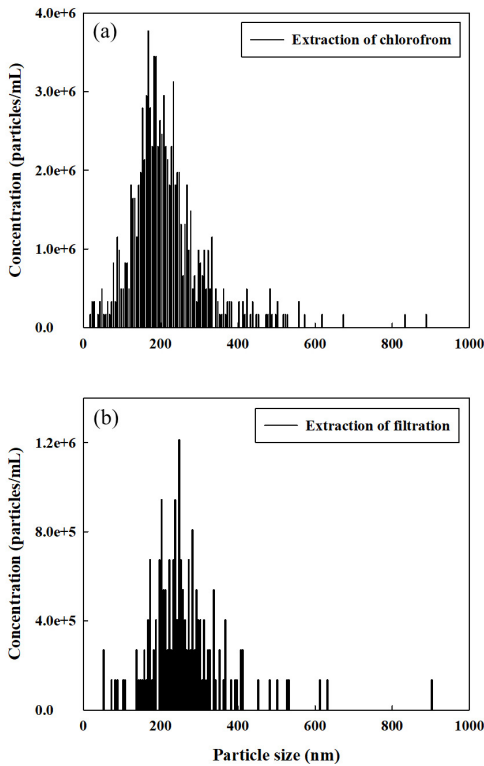


Fig. 7. Nanoparticle tracking analysis (NTA) size distribution of different extraction. (a) extraction of chloroform and (b) extraction of filtration using the spiked CNT membrane.

면 CLSM 사진이다. 살아있는 대장균은 초록색으로, 사멸한 대장균은 빨간색으로 보인다. Image J 프로그램을 이용하여 이미지 전체 영역에 대비하여 초록색과 빨간색 영역을 계산한 결과, 초록색은 14.6%, 빨간색은 4.8%로 확인되어 전체 대장균의 약 25%가 분리막 표면의 CNT로 인하여 물리적으로 파쇄 되었음을 확인할 수 있었다.

3.4. NTA 결과

Chloroform과 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통해 미생물 내 PHB 추출을 수행하였다. 이후 NTA를 사용하여 입자들의 농도와 크기 분포도를 확인하였다. Fig. 7(a)는 chloroform 추출, Fig. 7(b)는 여과 추출 후의 NTA 결과이다. 다른 추출방법임에도 100~300 nm 크기의 입자가 가장 높은 농도로 존재하는데, 미생물 내 PHB의 크기가 수백 nm임을 감안하면[27], 생성된 PHB 크기가 100~300 nm 정도 수준임을 알 수 있다. Chloroform 추출 시 전체 입자의 농도는 4.2×10^9 par-

ticles/mL이고 100~300 nm에 해당하는 입자의 농도는 3.1×10^9 particles/mL로 전체 입자에 대비하여 74%인 것을 확인할 수 있다. 여과 추출의 전체 입자의 농도는 9.4×10^{10} particles/mL, 100~300 nm에서의 입자 농도는 7.4×10^{10} particles/mL이며 이는 전체 입자 대비 79% 인 것으로 나타났다. 이를 통해 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통한 PHB 추출이 통상적으로 사용되는 chloroform과 비슷한 수준의 추출 성능을 갖는다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

미생물 내 축적되는 바이오 플라스틱인 PHB는 주로 유기용매를 이용하여 추출하는데 이는 환경오염을 일으킬 뿐만 아니라 분자량 및 물성에 변형이 일어나는 문제점을 가진다. 본 연구에서는 기능화 된 CNT를 부착한 돌기형 탄소나노튜브 분리막을 제작하여 여과를 통한 물리적 파쇄로 미생물 내 PHB를 추출하였다. PHB에 acetone 및 chloroform 처리 후 물성에 변화가 있는지 확인하기 위해 FT-IR을 수행하였더니 PHB의 결정성에 변형이 발생한 것을 관찰하였다. 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통해 물리적 파쇄가 일어나는지 확인하기 위해 미생물 불활성화 실험을 한 결과, 1.2 log 수준의 미생물이 물리적 파쇄에 의해 사멸되었음을 확인하였다. 그리고 chloroform과 돌기형 탄소나노튜브 분리막의 여과를 통한 PHB 추출을 비교하기 위해 NTA를 수행한 결과, 돌기형 탄소나노튜브 분리막에 의한 추출 성능이 유기용매를 이용한 추출 성능과 비슷하였다. 이러한 결과를 통해 돌기형 탄소나노튜브 분리막을 이용하여 세포 내 존재하는 PHB와 같은 바이오플라스틱을 효과적으로 추출할 수 있다는 가능성을 확인하였다.

감 사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2022R1A4A3 029607).

Reference

1. V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, and M. Dalla

- Rosa, “Biodegradable polymers for food packaging: a review”, *Trends Food Sci. Technol.*, **19**, 634 (2008).
2. M. Koller, “A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters”, *Fermentation*, **4**, 30 (2018).
 3. A. J. Anderson and E. A. Dawes, “Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates”, *Microbiol Rev.*, **54**, 450 (1990).
 4. C. Kourmentza, J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H. N. Gavala, and M. A. Reis, “Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production”, *Bioengineering*, **4**, 55 (2017).
 5. P. A. Holmes, “Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic,” *Phys. Technol.*, **16**, 32 (1985).
 6. U. Bhardwaj, P. Dhar, A. Kumar, and V. Katiyar, “Polyhydroxyalkanoates (PHA)-cellulose based nanobiocomposites for food packaging applications”, *ACS Symposium Series*, **1162**, 275 (2014).
 7. G. Q. Chen and Q. Wu, “The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials”, *Biomaterials*, **26**, 6565 (2005).
 8. A. F. M. De Mello, L. P. de Souza Vandenberghe, C. M. B. Machado, M. S. Brehmer, P. Z. de Oliveira, P. Binod, R. Sindhu, and C. R. Soccol, “Polyhydroxyalkanoates production in biorefineries: A review on current status, challenges and opportunities”, *Bioresour. Technol.*, **393**, 130078 (2023).
 9. A. Gholami, M. Mohkam, S. Rasoul-Amini, and G. Younes, “Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: Opportunities and challenges”, *Minerva Biotechnol.*, **28**, 59 (2016).
 10. S. Heimersson, F. Morgan-Sagastume, G. M. Peters, A. Werker, and M. Svanström, “Methodological issues in life cycle assessment of mixed-culture polyhydroxyalkanoate production utilising waste as feedstock”, *N. Biotechnol.*, **31**, 4 (2014).
 11. M. H. Madkour, D. Heinrich, M. A. Alghamdi, I. Shabbaj, and A. Steinbüchel, “PHA recovery from biomass”, *Biomacromolecules*, **14**, 2963 (2013).
 12. N. Yabueng and S. Chanprateep Napathorn, “Toward non-toxic and simple recovery process of poly(3-hydroxybutyrate) using the green solvent 1,3-dioxolane”, *Process Biochemistry*, **69**, 197 (2018).
 13. D. Heinrich, M. H. Madkour, M. A. Al-Ghamdi, I. Shabbaj, and A. Steinbüchel, “Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite”, *AMB Express*, **2**, 1 (2012).
 14. J. Yu and L. X. L. Chen, “Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass”, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 547 (2006).
 15. I. Melih Tamer, M. Moo-Young, and Y. Chisti, “Disruption of *alcaligeneslatus* for recovery of poly(-hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **37**, 1807 (1998).
 16. S. T. L. Harrison, “Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products”, *Biotechnol. Adv.*, **9**, 217 (1991).
 17. J. Li and Y. Zhang, “Cutting of multi walled carbon nanotubes”, *Appl. Surf. Sci.*, **252**, 2944 (2006).
 18. A. G. Osorio, I. C. L. Silveira, V. L. Bueno, and C. P. Bergmann, “H₂SO₄/HNO₃/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media”, *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 2485 (2008).
 19. R. Rastogi, R. Kaushal, S. K. Tripathi, A. L. Sharma, I. Kaur, and L. M. Bharadwaj, “Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants”, *J. Colloid Interface Sci.*, **328**, 421 (2008).
 20. T. R. Shamala, M. S. Divyashree, R. Davis, K. S. Latha Kumari, S. V. N. Vijayendra, and B. Raj, “Production and characterization of bacterial polyhydroxyal-kanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy”, *Indian J. Microbiol.*, **49**, 251 (2009).
 21. A. M. Rodrigues, R. D. G. Franca, M. Dionísio,

- C. Sevrin, C. Grandfils, M. A. Reis, and N. D. Lourenço, "Polyhydroxyalkanoates from a mixed microbial culture: Extraction optimization and polymer characterization", *Polymers*, **14**, 2155 (2022).
22. S. Kang, M. Pinault, L. D. Pfefferle, and M. Elimelech, "Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 8670 (2003).
23. S. J. Klaine, P. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, and J. R. Lead, "Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects", *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**, 1825 (2008).
24. L. Guo, D. G. Morris, X. Liu, C. Vaslet, R. H. Hurt, and A. B. Kane, "Iron bioavailability and redox activity in diverse carbon nanotube samples", *Chem. Mater.*, **19**, 3472 (2007).
25. S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M. W. Chang, R. Xu, Y. Yang, and Y. Chen, "Sharper and faster 'Nano darts' kill more bacteria: A study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube", *ACS Nano*, **3**, 3891 (2009).
26. Y. Baek, C. Kim, D. K. Seo, T. Kim, J. S. Lee, Y. H. Kim, K. H. Ahn, S. S. Bae, S. C. Lee, J. Lim, K. Lee, and J. Yoon, "High performance and antifouling vertically aligned carbon nanotube membrane for water purification", *J. Memb. Sci.*, **460**, 171 (2014).
27. M. Ladic, R. Gudneppanavar, K. Whiddon, D. Sauvageau, L. Y. Stein, and M. Konopka, "In vivo quantification of polyhydroxybutyrate (PHB) in the alphaproteobacterial methanotroph, *Methylocystis* sp. Rockwell", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **106**, 811 (2022).