

EDN: DPMYRV

УДК 579, 57.013; 615.462

Isolation and Purification of Polyhydroxyalkanoates. Scaling in Pilot Production

**Evgeniy G. Kiselev^{*a, b}, Aleksey V. Demidenko^{a, b},
Sergey V. Baranovskiy^b and Tatiana G. Volova^{a, b}**

*^aInstitute of Biophysics SB RAS
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^bSiberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 19.06.2023, received in revised form 11.07.2023, accepted 27.07.2023

Abstract. The process of isolating and purifying poly-3-hydroxybutyrate under scaling conditions has been studied. Sodium dodecyl sulfate, sodium hypochlorite and Pemos washing powder were studied as solubilizing agents. The highest yield of 95 % and polymer purity of 99.5 % was achieved using a two-stage extraction method and Pemos powder as a solubilizing agent. As a result, it was possible to reduce the costs at the solubilization stage to 31 rubles/kg of poly-3-hydroxybutyrate. Based on the research results, a technology for the isolation and purification of polyhydroxyalkanoates was proposed.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, poly-3-hydroxybutyrate, solubilization, extraction, bacterial biomass, extraction technology.

Acknowledgements. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 23–64–10007.

Citation: Kiselev E. G., Demidenko A. V., Baranovskiy S. V., Volova T. G. Isolation and purification of polyhydroxyalkanoates. Scaling in pilot production. J. Sib. Fed. Univ. Chem., 2023, 16(3), 438–446. EDN: DPMYRV



Выделение и очистка полигидроксиалканоатов. Масштабирование в условиях пилотного производства

Е. Г. Киселев^{а, б}, А. В. Демиденко^{а, б},
С. В. Барановский^б, Т. Г. Волова^{а, б}

^аИнститут биофизики СО РАН
Российская Федерация, Красноярск
^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Исследован процесс выделения и очистки поли-3-гидроксибутирата в условиях масштабирования. В качестве солюбилизирующих агентов изучены додецилсульфат натрия, гипохлорит натрия и стиральный порошок «Пемос». Наибольший выход 95 %, и чистота полимера 99,5 % достигнут при использовании двухстадийного метода экстракции и порошка «Пемос» в качестве солюбилизирующего агента. В результате чего удалось снизить затраты на стадии солюбилизации до 31 руб/кг поли-3-гидроксибутирата. По результатам исследований внесены изменения в аппаратную и технологическую схему процесса.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, поли-3-гидроксибутират, солюбилизация, экстракция, биомасса бактерий, технология экстракции.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23–64–10007.

Цитирование: Киселев Е. Г., Демиденко А. В., Барановский С. В., Волова Т. Г. Выделение и очистка полигидроксиалканоатов. Масштабирование в условиях пилотного производства. Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия, 2023, 16(3). С. 438–446. EDN: DPMYRV

Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – семейство полиэфирных биополимеров, которые накапливаются в виде гранул у различных видов грамотрицательных и грамположительных бактерий [1]. Эти биополимеры представляют интерес в качестве экологически безопасной замены традиционным синтетическим полимерам. Основной проблемой, возникающей при биосинтезе и выделении ПГА, является его экономическая неконкурентоспособность по сравнению с нефтехимическими полимерами [2].

Одной из самых затратных стадий получения ПГА является их выделение из клеток и последующая очистка. По данным различных исследований, на эту стадию может приходиться до 50 % от всех затрат на производство ПГА [3, 4].

В настоящее время разработано большое количество разнообразных методов для извлечения ПГА. Наиболее часто используемые методы включают предварительную обработку биомассы (механическую и химическую), экстракцию с помощью различных растворителей, фермента-

тивную экстракцию, сверхкритическую флюидную экстракцию и дальнейшую очистку растворителем, например хлороформом [5, 6].

Основные исследования в данной области направлены на повышение полноты извлечения ПГА из клеток, повышение степени чистоты выделяемого ПГА без изменения его физико-химических характеристик, таких как молекулярно-массовое распределение, термические свойства, с одной стороны, и экологичностью используемых растворителей и методов, с другой стороны. Зеленые технологии замыкают петлю процессов утилизации растворителей для создания циркулярных безотходных процессов, вызывая переход от линейной экономики к циркулярной [7].

Лучшие результаты по полноте извлечения ПГА и его чистоте демонстрируют комбинированные методы, которые сочетают в себе предварительную обработку биомассы бактерий растворами щелочей, гипохлорита, поверхностно-активными веществами (ПАВ), ферментами, с последующим извлечением ПГА органическими растворителями [8].

Ранее нами был предложен метод двухстадийной экстракции ПГА, который на первом этапе подразумевает обработку биомассы раствором додецилсульфата натрия (ДДС-Na), с последующей экстракцией ПГА дихлорметаном. В лабораторных условиях метод неплохо себя зарекомендовал, удалось извлечь до 98 % высокоочищенного ПГА из клеток [9]. Однако при масштабировании метода в условиях опытного производства наблюдалось снижение выхода ПГА из клеток до 70–75 %, также увеличилось количество примесей в готовом продукте, что повлекло за собой увеличение расхода дихлорметана и этилового спирта на дополнительную очистку готового продукта.

В данной работе рассмотрены вопросы повышения эффективности извлечения и очистки биомассы в условиях масштабирования на пилотном производстве ПГА в Сибирском федеральном университете.

Материалы и методы

Наработка бактериальной биомассы

Биомассу бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, содержащую поли-3-гидроксibuтират (ПЗГБ), получали на ферментационной пилотной установке (Bioengineering AG, Швейцария) Сибирского федерального университета по разработанной ранее методике, используя глюкозу и глицерин в качестве основных источников углерода [10, 11].

Выделение и очистка ПЗГБ

На первой стадии в качестве солибилизирующих агентов использовали: додецилсульфат натрия (ДДС-Na) (Th. Geyer GmbH&Co.KG, Германия); стиральный порошок «Пемос авторитет» («Пемос») (ООО ХенкельРус, Россия), содержащий 5–15 % анионных поверхностно-активных веществ (ПАВ), не более 5 % амфотерных ПАВ, поликарбоксилаты, мыло, оптический отбеливатель, отдушка; раствор гипохлоританатрия 15 % (АО Саянскхимпласт, Россия).

Навеску $1,0 \pm 0,2$ кг предварительно размолотой биомассы бактерий заливали 10 л раствора ДДС-Na с концентрацией от 5 до 20 % и нагревали до 80°C при перемешивании в течение 3 часов. Далее биомассу отделяли центрифугированием BR-105 (ООО Biogus, Россия) при 10000 об/мин и промывали дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод.

Навеску $1,0 \pm 0,2$ кг предварительно размолотой биомассы бактерий заливали 10 л воды и добавляли 100–150 г порошка «Пемос» нагревали до $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ при перемешивании в течение 3 часов. Отделение биомассы от раствора проводили так же, как и при обработке ДДС-Na.

Навеску $1,0 \pm 0,2$ кг предварительно размолотой биомассы бактерий заливали 10 л раствора гипохлорита натрия различной концентрации (5 и 10 %). Выдерживали при комнатной температуре, постоянно перемешивая. Далее биомассу отделяли центрифугированием и промывали дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод.

Полученные концентраты ПЗГБ высушивали в сублимационной сушке (LP10R ILSHIN C, Корея) и размалывали на ультрацентрибежной мельнице ZM 200 (Retsch, Германия) при следующих параметрах: скорость размола – 8000 об/мин., размером отверстий сита – 2 мм.

ПЗГБ из размолотых концентратов экстрагировали дихлорметаном (АО Экос-1, Россия) двукратно, в реакторе с мешалкой (ООО Biorus, Россия). Соотношение концентрат растворитель 1:10, в течение 24 часов, при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Полученные экстракты фильтровали и объединяли. Осаждение ПЗГБ проводили этиловым спиртом из расчета на одну часть экстракта 5 частей спирта. Полученный полимер отфильтровывали и высушивали. Растворители регенерировали на ректификационной установке.

Полнота извлечения определялась как процент от исходного содержания полимера в биомассе. Начальное и конечное содержание полимера в биомассе определялось с использованием хроматографа с хромато-масс-детектором Agilent 6890/5975C (Agilent Technologies США) [10].

Чистоту ПЗГБ определяли с использованием хроматографа с хромато-масс-детектором Agilent 6890/5975C [11].

Молекулярно-массовые характеристики: средневесовую молекулярную массу (M_w), среднечисловую молекулярную массу и полидисперсность (ПД) определяли с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) [10].

Результаты

Влияние размера частиц биомассы на выход ПГА

При лиофильном высушивании биомассы происходит уплотнение, и клетки за счет физических взаимодействий образуют агломераты, что значительно сокращает удельную поверхность и снижает площадь контакта с растворителем или детергентом при солюбилизации. Результаты размола бактериальной биомассы на ультрацентрибежной мельнице представлены на рис. 1.

В результате размола энергия удара превышает энергию взаимодействия частиц, что приводит к разрушению агломератов. В исходной биомассе 87 % приходится на частицы размером от 0,16 до 0,63 мм, после размола 91 % частиц имеет размер 0,071 до 0,2 мм, также происходит уменьшение её дисперсности.

При последующей экстракции измельченной биомассы дихлорметаном выход ПЗГБ составил 69 %, что на 10 % больше, чем выход ПЗГБ из исходной биомассы, что объясняется увеличением удельной поверхности, а также возможным повреждающим воздействием на клеточные мембраны.

Необходимость размола лиофилизированной биомассы при масштабировании процесса извлечения ПГА отмечается в работе Генриха и соавторов [12].

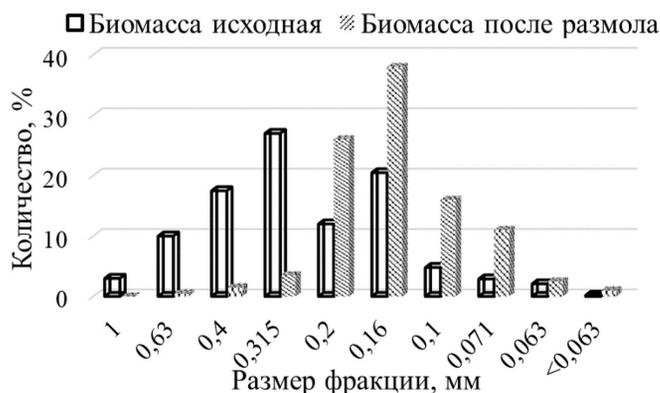


Рис. 1. Фракционный состав бактериальной биомассы до и после размола

Fig. 1. Fractional composition of bacterial biomass before and after milling

Влияние качества биомассы на выход и чистоту ПГА

Здесь под качеством биомассы понимается содержание ПГА. Чем выше содержание ПГА, тем выше качество биомассы и ниже расходы на процесс извлечения и очистки биополимеров. Наиболее высокая концентрация ПЗГБ достигается при использовании глюкозы и фруктозы в качестве источника углерода (85–90 %) [10]. Более низкое накопление ПЗГБ может наблюдаться при использовании альтернативных субстратов, таких как неочищенный глицерин (70–75 %), гидролизаты растительного сырья (60–65 %) [11, 13]. Результаты двухстадийной экстракции биомассы с различным содержанием ПГА в условиях масштабирования представлены в табл. 1.

Выход ПЗГБ составил от 71 до 80 %, чистота от 95 до 98 %. Как видно из табл. 1 содержание полимера в биомассе оказывает большое влияние на процесс извлечения. Присутствие липополисахаридов и белков с фосфолипидами на внешней мембране грамотрицательных бак-

Таблица 1. Результаты двухстадийной экстракции ПЗГБ с различной концентрацией ДДС-Na на стадии солюбилизации

Table 1. Results of two-stage extraction of P3NB with different concentrations of SDS-Na at the solubilization stage

Наименование	Концентрация ДДС-Na, %	Выход ПЗГБ, % от а.с.б.	Чистота ПЗГБ, %	Затраты ДДС-Na в руб/кг ПЗГБ
Биомасса с содержанием ПЗГБ 86 % (глюкоза)	5	81,1±5,8	96,8±1,9	272,5
Биомасса с содержанием ПЗГБ 72 % (глицерин)	5	71,3±2,9	94,1±2,8	434,8
Биомасса с содержанием ПЗГБ 72 % (глицерин)	10	74,1±3,7	94,5±2,8	829,9
Биомасса с содержанием ПЗГБ 72 % (глицерин)	15	78,5±2,4	93,8±3,7	1194,7
Биомасса с содержанием ПЗГБ 72 % (глицерин)	20	71,7±2,9	98,2±1,7	1725,0

терий являются фактором, который способствует устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к детергентам. При снижении концентрации полимера в биомассе наблюдается снижение его выхода и приводит к увеличению липидных загрязнений. Повышение концентрации ДДС-На до 15 % на стадии солюбилизации позволило увеличить выход до $78,5 \pm 2,4$ %, однако дальнейшее увеличение концентрации ДДС-На до 20 %, хоть и повысило чистоту готового продукта до $98,2 \pm 1,7$ %, но негативно сказалось на выходе ПЗГБ. Снижение выхода полимера при увеличении концентрации ДДС-На связано с его частичной солюбилизацией. Также увеличение концентрации детергента нивелирует экономический эффект от его применения. Поэтому на следующем этапе была предпринята попытка для поиска альтернативного недорогого детергента для стадии солюбилизации.

Выбор агента для стадии солюбилизации

Для повышения эффективности процесса солюбилизации и снижения стоимости в качестве солюбилизирующего агента была использована коммерческая композиция, выпускающаяся в промышленности под маркой «Пемос», в рекомендованной производителем концентрации 1 % и 1,5 %. А также для разрушения клеточных мембран и удаления липидных и белковых примесей водный раствор гипохлорита натрия в концентрациях 5, 10 % в пересчете на активный хлор. Для экспериментов использовали биомассу с содержанием ПЗГБ 72 % (глицерин).

Замена ДДС-На на коммерческую композицию «Пемос» оказала положительное влияние на полноту извлечения ПЗГБ, выход полимера увеличился в среднем на 10–15 %, также произошло повышение чистоты готового продукта. Использование гипохлорита натрия привело к увеличению выхода ПЗГБ, однако негативно сказалось на молекулярной массе, снижение составило от 20 до 50 %. Также произошло увеличение полидисперсности, а это нежелательно для дальнейшей переработки полимера в изделия.

На основании проведенных исследований предложена технология выделения и очистки ПГА в условиях пилотного производства. На рис. 2 представлена аппаратная схема процесса.

Сконцентрированная биомасса (500 г/л) после ферментации подается в аппарат с мешалкой 1. В этот аппарат заливается вода в соотношении из расчета на одну часть абсолютно сухой

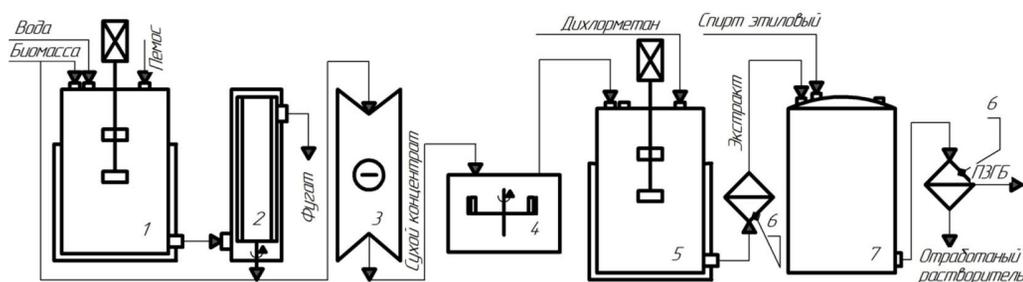


Рис. 2. Аппаратурная схема процесса двухстадийной экстракции ПГА (1 – аппарат с мешалкой; 2 – центрифуга проточная; 3 – сублимационная сушилка; 4 – ультрацентрифужная мельница; 5 – экстрактор; 6 – фильтры; 7 – осадитель)

Fig. 2. Hardware diagram of the two-stage PHA extraction process (1 – apparatus with a stirrer; 2 – flow centrifuge; 3 – freeze dryer; 4 – ultracentrifugal mill; 5 – extractor; 6 – filters; 7 – precipitator)

Таблица 2. Результаты двухстадийной экстракции ПЗГБ с использованием порошка «Пемос» и гипохлорита натрия

Table 2. Results of two-stage extraction of PЗНВ using Pemos powder and sodium hypochlorite

Наименование агента и концентрация	Выход ПЗГБ, % от а.с.б.	Чистота ПЗГБ, %	Затраты в руб/кг ПЗГБ	M_n кДа	ПД
Раствор «Пемос» 1 %	89,3±3,2	98,4±1,3	32,3	430	3,5
Раствор «Пемос» 1,5 %	94,8±3,3	99,7±0,3	31,3	415	3,6
Раствор гипохлорита натрия 5 %	85,1±4,7	96,2±1,7	54,1	301	4,8
Раствор гипохлорита натрия 10 %	88,3±4,1	98,1±1,7	106,8	223	5,3

биомассы 10 частей воды, и засыпается порошок «Пемос» в количестве, чтобы получился 1,5 % раствор. Обработку ведут при 80 °С в течение 3 часов при постоянном перемешивании. Далее полученный концентрат декантируется на центрифуге 2 и возвращается в аппарат 1, где происходит его промывка водой, далее вода отделяется центрифугированием. Операция повторяется до полного обесцвечивания промывной воды. Влажный концентрат полимера высушивается в сублимационной сушилке 3 и в таком виде может храниться длительное время. Для получения высокоочищенного полимера полученный концентрат подвергается размолу в ультрацентрифужной мельнице 4 и загружается в экстрактор 5. Экстракцию проводят дихлорметаном, количество дихлорметана рассчитывают таким образом, чтобы концентрация полимера в экстракте не превышала 4 %, экстракцию проводят двукратно равными порциями дихлорметана. Экстракты фильтруют и объединяют в осадителе 7. В осадитель добавляют этиловый спирт для осаждения полимера. Полимер отфильтровывают и сушат в сушильном шкафу при 50 °С, смесь растворителей направляется на установку регенерации, где разделяется на дихлорметан и этиловый спирт, которые возвращаются в процесс.

Обсуждение

В настоящее время вопросы извлечения ПГА из биомассы бактерий весьма актуальны, имеется большое количество работ по этой тематике, в которых предложены различные подходы, от поиска растворителей до использования сверхкритической флюидной экстракции. Однако не все эти подходы оправданы с точки зрения стоимости и безопасности, а также отработаны в лабораторных масштабах с навесками от 1 до 100 г. Небольшое количество работ, связанных с масштабированием процессов экстракции, указывают на снижение эффективности лабораторных методов [14].

Наилучшим растворителем для ПГА является хлороформ, затем следует дихлорметан. И ввиду того, что дихлорметан менее токсичен, то его и выбрали в качестве основного растворителя. Детергенты весьма перспективны для процессов очистки ПГА и наилучшим детергентом признан ДДС-Na [15]. Полученный концентрат может содержать до 95 % ПГА и может использоваться в таком виде для технических целей, однако для применения в медицине необходим высокоочищенный полимер. Второй проблемой является использование высоких концентраций детергентов, что значительно удорожает процесс и приводит к потерям ПГА за счет его частичной солюбилизации [16]. Учитывая тот факт, что процесс солюбилизации направлен

на удаление липидных и белковых составляющих бактериальной клетки, целесообразно использовать не один детергент, а композицию. Такие композиции разработаны в промышленности и применяются в виде порошков для стирки, что и натолкнуло нас на мысль использовать стиральный порошок «Пемос».

Размеры частиц в процессах экстракции имеют большое значение, поэтому предварительная механическая обработка биомассы является необходимым этапом, как и последующая сушка [17], однако оба этих процесса весьма энергозатратны. Поэтому мы предлагаем процесс солюбилизации проводить сразу после процесса ферментации, так как детергенты должны взаимодействовать с отдельными клетками [18], а с агломератами взаимодействие весьма ограничено. Таким образом, солюбилизацию целесообразней сделать финальной стадией ферментации, а не первой стадией выделения.

Заключение

Исследован процесс извлечения и очистки ПГА в условиях масштабирования. Установлено, что в условиях масштабирования большое значение имеет размер частиц биомассы, предварительный размол приводит к увеличению выхода полимера в среднем на 10 %. Чтобы сократить расходы на измельчение, предложено процедуру солюбилизации проводить сразу после ферментации, чтобы избежать агломерации клеток при высушивании. В качестве солюбилизирующего агента предложено использовать коммерческий порошок «Пемос», в результате чего удалось повысить выход полимера до 95 %, а чистоту готового более 99,5 % и значительно снизить расходы на стадии солюбилизации до 31 руб/кг ПЗГБ. По результатам представленных исследований предложена технология выделения и очистки ПГА, разработана аппаратная схема процесса.

Список литературы / References

- [1] Reddy C.S.K., Ghai R., Kalia V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology* 2003. 87(2), 137–146.
- [2] Haque A., Priya A., Hathi Z.J., Qin Zi-Hao, Mettu S., Lin C. S.K. Advancements and current challenges in the sustainable downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2022. 36. 100631.
- [3] Khanna S., Srivastava A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem* 2005. 40(2), 607–619.
- [4] Koller M., Bona R., Chiellini E. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure. *Biotechnol Lett* 2013. 35, 1023–1028.
- [5] Pagliano G., Galletti P., Samorì Ch., Zaghini A., Torri C. Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: a review. *Frontiers Bioeng Biotechnol* 2021. 9.
- [6] Policastro G., Panico A., Fabbricino M. Improving biological production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2021. 20, 479–513.
- [7] Macagnan K. L., Alves M.I., Moreira A. da S. Approaches for Enhancing Extraction of Bacterial Polyhydroxyalkanoates for Industrial Applications. In: *Kalia, V. (eds) Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Springer, Singapore 2019. 389–408.

[8] Kourmentza C., Plácido J., Venetsaneas N., Burniol-Figols A., Varrone C., Gavala, H.N., Reis M.A.M. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* 2017. 4, 55.

[9] Киселев Е.Г., Демиденк А.В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология* 2014. 7(2), 148–160. [Kiselev E.G., Demidenk A.V. Sravnitel'noye issledovaniye metodov ekstraksii poligidroksialkanoatov iz biomassy bakteriy *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologiya* 2014. 7(2), 148–160 (In Russ.)]

[10] Volova T., Kiselev E., Zhila N., Shishatskaya E. Synthesis of Polyhydroxyalkanoates by Hydrogen-Oxidizing Bacteria in a Pilot Production Process. *Biomacromolecules* 2019. 20(9), 3261–3270.

[11] Volova T., Demidenko A., Kiselev E., Zhila N., Shishatskaya E. Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019. 103, 225–237.

[12] Heinrich D., Madkour M.H., Al-Ghamdi M.A., Shabbaj I.I., Steinbüchel A. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*. 2012 19; 2(1), 59.

[13] Volova T.G., Kiselev E.G., Demidenko A.V., Zhila N.O., Nemtsev I.V., Lukyanenko A.V. Production and Properties of Microbial Polyhydroxyalkanoates Synthesized from Hydrolysates of Jerusalem Artichoke Tubers and Vegetative Biomass. *Polymers* 2022, 14(1), 132.

[14] Pagliano G., Galletti P., Samori C., Zaghini A., Torri C. Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 624021.

[15] Gutt B., Kehl K., Ren Q., Boesel L.F. Using ANOVA Models To Compare and Optimize Extraction Protocols of P3HBHV from *Cupriavidus necator*. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2016. 55(39), 10355–10365.

[16] Yang YH., Brigham C., Willis L., Rha C.K., Sinskey A. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnol Lett* 2011. 33, 937–942.

[17] Демиденко А.В., Виноградова О.Н., Киселев Е.Г. Влияние режима высушивания бактериальной биомассы на полноту экстракции и физико-химические свойства продукта (полимера). *Журнал Сибирского федерального университета. Биология* 2016, Т. 9(2), С. 180–189 [Demidenko A.V., Vinogradova O.N., Kiselev E.G. Vliyaniye rezhima vysushivaniya bakterial'noy biomassy na polnotu ekstraksii i fiziko-khimicheskiye svoystva produkta (polimera). *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologiya* 2016, 9(2), 180–189. (In Russ.)]

[18] Sharma P., Vaiwala R., Parthasarathi S., Patil N., Verma N., Waskar M., Raut J., Basu J., Ayappa G. Interactions of surfactants with the bacterial cell wall and inner membrane: Revealing the link between aggregation and antimicrobial activity. *Langmuir* 2022. 38(50), 15714–15728.