



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Agronomia Animali Risorse Naturali e Ambiente**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

**Produzione di biopolimeri da residui dell'industria  
agro-alimentare**

Relatore

Chiar.mo Prof. Sergio Casella

Laureanda:

Nadia Coletto

Matricola n. 580681

**ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014**



## Indice

Riassunto	5
Abstract	6
1. Dalla plastica ai biopolimeri	7
1.2 Biopolimeri	8
2 Poli-idrossialcanoati	10
2.1 Possibili applicazioni dei PHA	14
2.1.1 PHA come materiali da imballaggio	14
2.1.2 PHA come dispositivi medici	14
2.1.3 PHA come vettore di farmaci	15
2.1.4 PHA come farmaci	15
2.1.5 PHA come biocarburanti	15
3. Microrganismi e PHA	17
3.1 Microrganismi	18
4. I Substrati di partenza	25
4.1 Substrati puri	25
4.2 Materiale di scarto come substrati	27
5. Il siero di latte come materia prima	29
5.1 Estrazione dei principi nutritivi dal siero	30
5.2 Produzione di PHA in fermentatore	31
5.3 Estrazione di PHA	32
6. Life Cycle Analysis	34
Conclusioni	36
Riferimenti bibliografici	37



## Riassunto

La reale possibilità di superare gli stati di emergenza causati dall'inquinamento ambientale legato alla dispersione di materie plastiche e le problematiche relative al loro smaltimento ha comportato l'adozione di biopolimeri di origine batterica, i PHA.

I poli-idrossialcanoati (PHA) sono polimeri di riserva di carbonio ed energia accumulati nel citoplasma da molte specie batteriche, in particolari condizioni che prevedono un eccesso di disponibilità di carbonio. Possono essere sintetizzate diverse tipologie di PHA che i microrganismi accumulano come corpi di inclusioni insolubili.

Il presente lavoro di tesi ha per argomento la produzione di poli-idrossialcanoati a partire da substrati economicamente convenienti come i residui dell'industria agro-alimentare in particolare il siero di latte.

Questo sottoprodotto dell'industria casearia costituisce la parte liquida del latte che si separa dalla cagliata durante la coagulazione (acida o enzimatica). Il siero viene prodotto in volumi pressoché uguali a quelli del latte trasformato in formaggio e il suo smaltimento, nell'ambiente, provoca gravi problemi di inquinamento. Ciò è dovuto alla grande richiesta biochimica di ossigeno da parte del lattosio (costituente principale), di conseguenza una grande quantità di denaro è richiesta per smaltire il surplus aziendale. Una strategia alternativa, per utilizzare il siero di latte e suoi derivati come risorsa, è il suo impiego come materia prima per lo sviluppo microbico e la conseguente sintesi di polimero.

Il primo poli-idrossialcanoato identificato è stato l'omopolimero poli-3-idrossibutirrato P(3HB) da un lavoro di Lemoigne del 1927; da allora numerosi studi hanno indicato moltissimi gruppi microbici in grado di sintetizzare il polimero, fra cui di particolare interesse *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas putida*. Queste specie sono fra le più utilizzate in campo industriale in quanto associano un'elevata produttività a tempi ridotti di accumulo.

Infine, i poli-idrossialcanoati sono di grande interesse per le potenziali applicazioni che ne possono derivare, come materiali da imballaggio, dispositivi medici e biocarburanti.

## Abstract

The real opportunity to overcome the state of emergency caused by environmental pollution related to the dispersion of plastics and issues relating to their disposal, results in the use of bio-polymers of bacterial origin, the poly-hydroxyalkanoates (PHA).

The PHAs are polymers of carbon and energy of reserve accumulated in the cytoplasm of many bacterial species under particular conditions of excess of carbon availability, while some other factor is limiting (i.e. N, S, etc).

These polymers can be synthesized in different types of PHA that microorganisms accumulate as insoluble inclusion bodies.

The subject of this thesis is the production of poly-hydroxyalkanoates from cost-effective substrates, such as agro-industry residues and particularly whey.

This by-product of the dairy industry is the liquid part of milk that separates from the curd during coagulation (acidic or enzymatic).

The whey is produced in volumes almost equal to those of the milk converted into cheese and its disposal in the environment could result in serious pollution problems.

This is due to the large biochemical oxygen demand of lactose (the main constituent of whey), thus claiming for highly expensive industrial disposal.

An alternative strategy could be to use the whey and its derivatives as a resource, like the use of this raw material for microbial growth and subsequent synthesis of the biopolymer.

The first poly-hydroxyalkanoates identified was the homopolymer poly-3-hydroxybutyrate P(3HB) by Lemoigne (1927); since then a number of studies indicated many microbial groups able to synthesize the polymer, among which of particular interest are *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Mediterranean Haloferax*, *Pseudomonas oleovorans* and *Pseudomonas putida*.

These bacterial species are the most used for industrial application since they associate high productivity to reduced times of accumulation.

Finally, the poly-hydroxyalkanoates are of great interest for potential applications that may arise, such as packaging materials, medical devices and bio-fuels.

*“Senza adeguate contromisure entro il 2050 il Pianeta dovrà fare i conti con 33 miliardi di tonnellate di plastica dalla vita millenaria” (Chelsea Rochman & Mark Anthony)*

## **1.Dalla plastica ai biopolimeri**

Dal petrolio si ricavano sostanze chimiche usate per la realizzazione di materie plastiche ed altri materiali, che finiscono molto spesso in prodotti di uso quotidiano. Dal petrolio raffinato si ricavano, infatti, circa una ventina di prodotti, e da qui bottiglie e oggetti di plastica, polistirolo, tessuti d'abbigliamento, ecc.

Per produrre la plastica si utilizza un processo, detto polimerizzazione, da cui si ottengono i polimeri, quali l'etilene, il propilene, il butadiene e lo stirene, che vengono utilizzati per produrre le materie plastiche.

Nel mondo ne consumiamo circa 100 milioni di tonnellate all'anno, e per la loro produzione occorre circa l'8% del petrolio estratto. Quindi 6.800.000 barili al giorno diventano plastica, ovvero 2.482 milioni di barili all'anno. Il 7% di questi 2,5 miliardi viene riciclato, l'8% viene bruciato, e il resto, 85%, finisce nelle discariche.

Le materie plastiche più diffuse sul mercato dei prodotti di consumo e il loro utilizzo, sono le seguenti:

- PE, polietilene: sacchetti, flaconi per detersivi, giocattoli, pellicole e altri imballi;
- PP, polipropilene: oggetti per l'arredamento, contenitori per alimenti, flaconi per detersivi e detersivi, moquette, mobili da giardino;
- PVC, cloruro di polivinile: vaschette per le uova, film, tubi, parti di infissi, finestre e piastrelle;
- PET, polietilentereftalato: bottiglie per bevande, fibre sintetiche, nastri per cassette;
- PS, polistirene (polistirolo): vaschette per alimenti, posate, piatti, bicchieri.

Proprio a causa di questa varietà è difficile riciclare completamente la plastica.

Il riciclaggio delle materie plastiche risulta fortemente dispendioso per le istituzioni governative e rende la tradizionale discarica l'alternativa più conveniente dal punto di vista economico, ma non certo da quello ambientale.

Sempre più importante diventa quindi l'aspetto dell'inquinamento ambientale, tanto da spingere l'Unione Europea a emanare specifiche normative a riguardo (EN 13432:2002). Lo sviluppo di materiali a partire da fonti rinnovabili va incontro alla risoluzione di tale problema, con il vantaggio che alcuni di questi materiali sono biodegradabili.

Nonostante esistano queste materie alternative la scelta dell'utilizzo della plastica come materiale prevalente di imballaggio è determinata in primo luogo da considerazioni economico-finanziarie, commerciali e di marketing.

## **1.2 Biopolimeri**

Per tutti i motivi precedentemente illustrati, sarebbe più utile per l'uomo e il suo ecosistema produrre plastiche biodegradabili.

La crescita dell'industria dei prodotti ricavati da fonti rinnovabili e naturali è strettamente legata alla creazione di nuovi mercati, alla riduzione dei costi di produzione e al miglioramento delle performances, in modo da risultare competitiva e conveniente nei confronti dei materiali convenzionali derivati da petrolio.

Attualmente, il mercato più vasto e promettente per questa tipologia di prodotti è quello dell'imballaggio alimentare: oggi i materiali utilizzati per il packaging food sono vetro, metallo, carta, cartone e una grande varietà di polimeri plastici. Questi ultimi, tuttavia, presentano la caratteristica negativa di non essere biodegradabili.

La biodegradabilità di un materiale è la sua suscettibilità ad essere convertito ad opera di microrganismi in molecole semplici che possono rientrare nei cicli bio-geochimici.

Le cosiddette bioplastiche sono polimeri caratterizzati da un'elevata biodegradabilità, preparati attraverso processi biologici.

Possono essere divisi in tre categorie basate sulla loro origine e sulla loro produzione:

- Polimeri direttamente estratti da materiale naturale, piante e animali (sono quelli più comunemente disponibili); fanno parte di questa categoria i polisaccaridi e le proteine; tra i polisaccaridi spiccano la cellulosa, l'amido e le miscele di amido; questi carboidrati complessi sono utilizzati per produrre bioplastiche, come il Mater-Bi® della Novamont di Novara che usa mais, o il Solanyl® che usa bucce di patate; tra le proteine è possibile l'utilizzo della caseina e del glutine.
- Polimeri prodotti tramite sintesi chimica, usando monomeri biologici e rinnovabili come l'acido polilattico (PLA: biopoliestere polimerizzato a partire da monomeri di acido lattico) o il poliestere; sono totalmente biodegradabili e biocompatibili, ma le loro proprietà dipendono dalla composizione dei monomeri, che a sua volta dipendono dalla natura della fonte di carbonio utilizzata per la sintesi; un esempio del loro utilizzo è il Natureworks® , della Natureworks LLC prodotto a partire da mais.
- Polimeri prodotti da microrganismi isolati da ambienti naturali o geneticamente modificati; principalmente si tratta di poli-idrossialcanoati (PHA).



Questi polimeri sono già stati utilizzati nel campo dell'imballaggio, ma purtroppo esso è tutt'ora dominato da polimeri derivanti dal petrolio come il polietilene (PE) e il polistirene (PS), nonostante i noti problemi ambientali connessi con l'uso di materiali non rinnovabili.

La tabella che segue mette a confronto le proprietà dei diversi polimeri utilizzati nel food packaging.

Tabella 1.1 Proprietà dei principali polimeri (Petersen et al., 1999)

Polimero	Proprietà		
	Barriera al vapore acqueo	Barriera all'ossigeno	Meccaniche
Cellulosa\Cellophane	Scarse	Buone	Buone
Cellulosa Acetata	Moderate	Buone	Moderate (necessita plastificanti)
Amido	Scarse	Buone	Moderate (necessita plastificanti)
Proteine	Scarse	Buone	Moderate
PHAs	Buone	Buone	Buone
PLA	Moderate	Scarse-Moderate	Buone
LDPE	Buone	Scarse	Moderate-Buone
PS	Buone	Buone	Scarse-Moderate

Oltre all'impiego nel food packaging, questi composti sono utilizzati per altre funzioni: sacchetti, imballaggi, superassorbenti, pneumatici, protesi biomedicali, biocompositi, vasetti per piante, supporti per il lento rilascio di feromoni o fertilizzanti, teli per pacciamatura o solarizzazione.

Di estremo interesse ambientale sono le sperimentazioni per produrre biopolimeri da materiali di scarto, come ad esempio quelli derivanti dall'industria agroalimentare (conserviera, casearia e della lavorazione del pomodoro), ma anche da alghe, stoppie di mais o da raccolta differenziata della frazione organica dei rifiuti urbani.

Inoltre, i biopolimeri possono essere depositati in discarica, data la loro rapida biodegradabilità. Se fossero l'alternativa alla plastica si ridurrebbero gli oneri di gestione dei rifiuti e i costi logistici di deposito.

In riferimento alla precedente tabella si può notare che, tra tutti i polimeri, le caratteristiche favorevoli in tutti e tre i campi sono presenti per i poli-idrossialcanoati (PHA).

## 2. Poli-idrossialcanoati

I poli-idrossialcanoati (PHA) sono polimeri di riserva di carbonio ed energia accumulati da varie specie di batteri in condizioni di crescita sfavorevole e in presenza di fonte di carbonio in eccesso. Le catene polimeriche dei PHA possono essere costituite da un numero di monomeri di 3-idrossialcanoato (3HA) compreso tra  $10^2$  e  $10^5$  (Koller et al., 2011).

I poli-idrossialcanoati sono sintetizzati e accumulati da circa 300 differenti specie microbiche (Lee et al., 1988), ricomprese in più di 90 generi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, quali ad esempio *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium*.

Quando le cellule batteriche sono temporaneamente prive di uno o più elementi nutritivi, come azoto (N), zolfo (S), fosforo (P), magnesio (Mg) oppure ossigeno (O), il loro metabolismo non funziona normalmente ed entrano in uno stato di stress. In tale circostanza la cellula può accumulare delle riserve nutritive: fosforo in forma di polifosfato (poli P) e carbonio nelle forme di poli-idrossialcanoato oppure di glicogeno.

Il PHA viene stoccato sotto forma di granuli, la cui dimensione e numero per cellula varia nelle diverse specie batteriche. Essi appaiono al microscopio elettronico come inclusioni rifrangenti, con diametro che può variare da 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$ . Questi granuli sono formati da oltre il 97% di PHA, 1-2% di proteine e 0,5% di lipidi (Koller et al., 2009).

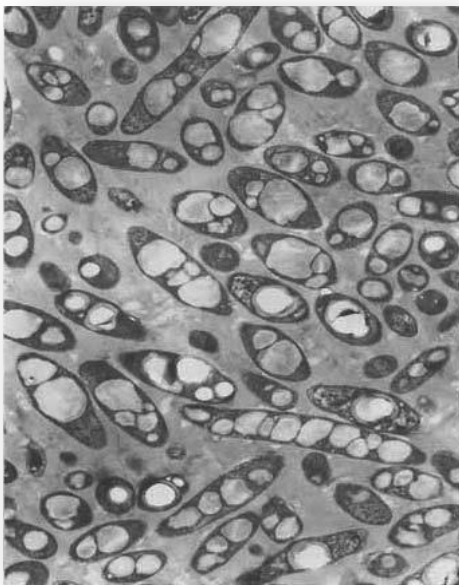


Figura 2.1 Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di *E.coli* cariche di granuli di P(3HB). (Lee, 1995)

I batteri, in mancanza di fonte di carbonio extracellulare, mobilitano e utilizzano queste riserve come substrati carboniosi ed energetici. I PHA sono composti chiave nella regolazione dei processi metabolici intracellulari, come ad esempio nella motilità cellulare e nella distribuzione delle riserve di carbonio nelle diverse vie metaboliche. Più recentemente al polimero sono state attribuite ulteriori importanti funzioni, quali la protezione delle cellule contro stress ambientali, come shock osmotico, irraggiamento UV, disidratazione, stress termico o ossidativo. Questi polimeri sono anche coinvolti nel processo della sporulazione e di riproduzione, nel controllo dell'escrezione degli esopolisaccaridi e in alcune specie diazotrofiche, nel flusso di energia durante la fissazione di azoto (Koller et al., 2011).

I PHA possono essere suddivisi in due gruppi, in funzione del numero di atomi di carbonio che costituisce l'unità monomerica: i PHA<sub>scl</sub> (short chain length) sono costituiti da 3-5 atomi di C, mentre i PHA<sub>mcl</sub> (medium chain length) da 6-15 atomi di C. Solo pochi batteri sono in grado di sintetizzare entrambe le tipologie di PHA.

I PHA<sub>scl</sub> hanno un alto grado di cristallinità, mentre PHA<sub>mcl</sub> sono elastomeri a bassa cristallinità e presentano una bassa temperatura di fusione.

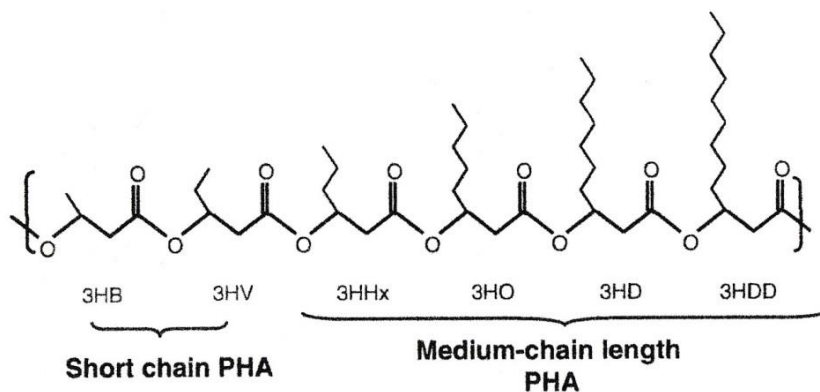
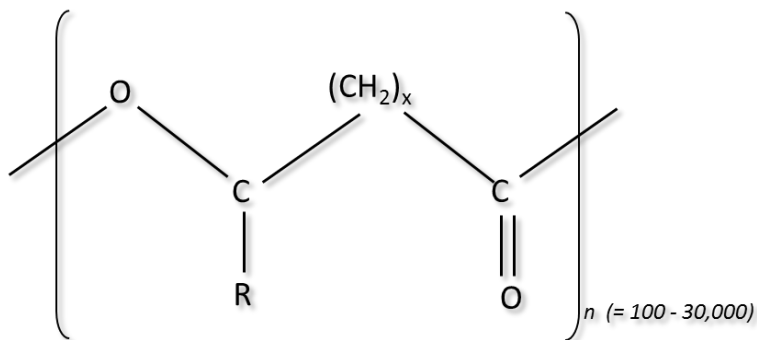


Figura 2.2 Strutture di PHA a media e lunga catena (Chen, 2010)

La famiglia dei poli-idrossialcanoati è variegata, formata da omopolimeri di varie dimensioni e copolimeri, di diversa composizione monomerica.



x=1	R=idrogeno R=metile R=etile R=propile R=pentile R=nonile	poli-3-idrossipropinato poli-3-idrossibutirrato poli-3-idrossivalerato poli-3-idrossiesanoato poli-3-idrossiottanoato poli-3-idrossidodecanoato
x=2	R=idrogeno R=metile	poli-4-idrossibutirrato poli-4-idrossivalerato
x=3	R=idrogeno R=metile	poli-5-idrossivalerato poli-5-idrossiesanoato
x=4	R=esile	poli-6-idrossidodecanoato

Figura 2.3 Formula generale dei PHA con alcuni esempi

La sintesi dei monomeri di PHA può seguire diverse vie metaboliche che transitano attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), la  $\beta$ -ossidazione e la biosintesi degli acidi grassi (Aldor et al., 2003).

Oeding e Schlegel (1973) hanno dimostrato che l'acetil-CoA rappresenta il composto chiave, perché entra comunemente nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), ma può anche servire come substrato per la biosintesi di PHA. Quando il rapporto NAD(P)H/NAD(P) aumenta in condizione di limitazione azotata, gli enzimi citrato sintasi e isocitrato deidrogenasi presenti nel TCA, sono inibiti; pertanto il flusso di acetil-CoA verso il TCA risulta ridotto divenendo così disponibile per la  $\beta$ -ketothiolase e la PHA-sintetasi che lo convertono in poli-idrossialcanoato. D'altra parte, quando l'azoto è sufficiente, l'acetil-CoA entra nel ciclo TCA, la  $\beta$ -ketothiolase è inibita da un'alta concentrazione di CoA e di conseguenza la sintesi di PHA è inibita (Lee et al., 1988).

La composizione e produzione di PHA dipende da vari fattori quali il tipo di ceppo microbico, la composizione del mezzo colturale e i parametri di processo durante la biosintesi.

Tra tutti i PHA conosciuti il Poli(3-idrossibutirrato) (PHB) è il più studiato. Si tratta di un omopolimero, composto quindi soltanto da monomeri di 3-idrossibutirrato (3HB). Questo materiale presenta un elevato grado di cristallinità ma una limitata lavorabilità. La bassa differenza tra la temperatura di decomposizione (circa 270° C) e il punto di fusione elevato (circa 180°C) fornisce

una finestra limitata per la possibilità di lavorazione, per esempio nella tecnologia di estrusione Melt oppure nella produzione di pellicole polimeriche. Questo inconveniente può essere superato interrompendo la matrice di PHB e incorporando ulteriori monomeri, come 3-idrossivalerato (3HV) o 4-idrossibutirrato (4HB) oppure 5-idrossivalerato (5HV). Ciò si traduce in copolimeri con proprietà simili a quelle dei materiali più avanzati, aprendo la porta a un'ampia gamma di applicazioni. Le proprietà del materiale, infatti, dipendono fortemente dalla composizione monomerica dei polimeri ed essa può essere modificata durante la biosintesi. Per ottenere le componenti monomeriche desiderate si somministrano ai batteri specifici precursori. Ad esempio, nella produzione dei monomeri 3HV vengono forniti acidi grassi, come acido propanoico o acido pentanoico (Koller et al., 2011).

Questo polimero, P(HB)/HV è stato scoperto e sviluppato dall'ICI negli anni ottanta, e della sua produzione se n'è in seguito occupata Zeneca e più tardi Monsanto che nel 2001 ha venduto il processo produttivo alla Metabolix.

Le principali caratteristiche dei poli-idrossialcanoati si possono riassumere in sette punti:

- termoplasticità: possono essere lavorati con varie tipologie di attrezzature sfruttando i cambiamenti di proprietà fisico-meccaniche in relazione alla temperatura;
- biodegradabilità: caratteristica tipica dei composti polimerici di origine biologica che generalmente vengono sintetizzati per poi, all'occorrenza, essere di nuovo degradati dall'azione di specifici enzimi microbici; tale caratteristica li rende particolarmente interessanti anche dal punto di vista ambientale poiché, grazie alla loro biodegradabilità non contribuiscono all'aumento di volume delle discariche, a differenza delle plastiche convenzionali (Koller et al., 2009);
- biocompatibilità: possibili applicazioni in campo medico per la preparazione di protesi o dispositivi chirurgici (Koller et al., 2009);
- bilanciamento del carbonio: la combustione degli idrocarburi (petrolio) crea un'enorme quantità di anidride carbonica che, diffondendosi nell'atmosfera, il ciclo del carbonio non riesce a riassorbire. Invece impiegando i PHA e la loro naturale degradazione da parte della microflora presente nel terreno, il ciclo verrebbe chiuso; inoltre i biopolimeri provengono da fonti rinnovabili e non dipendono dalla disponibilità di materie prime fossili;
- fragilità ed elasticità: sono entrambe proprietà importanti dei materiali; la tendenza a rompersi facilmente e la facilità di deformarsi sotto l'azione di una forza applicata e di riacquistare la sua forma originale al venir meno dell'azione imposta, sono proprietà di grande interesse applicativo;
- progettabilità molecolare: grazie alle tecniche del DNA ricombinante è possibile far produrre i poli-idrossialcanoati anche a batteri che non presentano gli enzimi chiave ( $\beta$ -ketothiolase e PHA-

sintetasi), ma che magari sono naturalmente in grado di utilizzare come fonte di carbonio materiali a basso costo;

- scarsa permeabilità ai gas: in generale la permeabilità all'ossigeno e la permeabilità nei confronti degli altri gas sono strettamente legate; i materiali tradizionali presentano un rapporto fisso tra la permeabilità all'ossigeno e quella all'anidride carbonica; questa relazione si osserva anche nei biopolimeri, anche se alcuni di essi tendono a essere più permeabili all'anidride carbonica rispetto ai materiali tradizionali (Perdoncin, 2007).

## **2.1 Possibili applicazioni dei PHA**

Le caratteristiche e la diversità monomeriche del polimero, hanno permesso lo sviluppo di varie applicazioni, tra cui plastiche biodegradabili ed ecocompatibili per l'imballaggio, fibre, protesi mediche, vettori per il rilascio controllato dei farmaci (Tasaki et al. 1999).

### **2.1.1 PHA come materiali da imballaggio**

I PHA sono stati inizialmente utilizzati negli articoli di uso quotidiano, come bottiglie di shampoo e materiali da imballaggio (Weiner 1997; Germania). Poi sono stati impiegati anche come borse per la spesa, contenitori di cosmetici e di alimenti, articoli monouso (come rasoi, utensili, pannolini, prodotti per l'igiene femminile) nonché indumenti medici chirurgici, tappezzeria, moquette e vaschette utilizzate negli articoli termoformati per le aziende Proctor&Gamble, BioMers, Metabolix e altre diverse società (Clarival e Halleux 2005; Mikova e Chodak 2006).

### **2.1.2 PHA come dispositivi medici**

Nel corso degli ultimi vent'anni, il PHA e i suoi derivati sono stati utilizzati per sviluppare dispositivi medici, tra cui suture, elementi di fissaggio di sutura, dispositivi di riparazione del menisco, piastre ossee e sistemi di placcatura ossea, maglie chirurgiche (Dai et al., 2009), dispositivi di riparazione della cartilagine articolare (Wang et al., 2008), dispositivi di riparazione dei tendini, valvole venose, legamenti e innesti tendinei, impianti oculari di cellule (Chen et al., 2006).

### **2.1.3 PHA come vettore di farmaci**

Alla fine degli anni ottanta, il PHA attirò l'attenzione dei ricercatori come potenziale vettore di farmaci (Gould et al., 1987), in particolare per il trasporto e la somministrazione del farmaco direttamente alla "zona" interessata. Tuttavia, il rilascio del farmaco è di difficile controllo a causa della facilità con la quale il polimero si degrada nel nostro organismo (Pouton & Akhtar, 1996).

Alcuni studi, condotti su PHB e PLA, hanno messo in luce la diversa velocità di rilascio dell'agente antitumorale Lumustina (Bissery et al., 1985) che può essere modificata incorporando nel PHB esteri etilici oppure acetato di n-butile (Kubota et al., 1988).

Più recentemente è stato dimostrato che dall'unione di PHA con una specifica proteina (PHAp), è possibile stabilire legami anche con farmaci idrofobici (Yao et al., 2008).

### **2.1.4 PHA come farmaci**

Negli animali e negli esseri umani avviene la produzione di derivati del monomero 3HB, principalmente come sali di sodio dell'acido 3-idrossibutirrico e come 3-idrossibutirrato-metil-estere (3HBME). È stato osservato che quest'ultimo può migliorare la comunicazione intercellulare tra neuroni, aumentando così l'apprendimento e la memoria (Zou et al., 2009). Inoltre, i prodotti di degradazione del 3HB diminuiscono l'apoptosi naturale delle cellule neurali (Chen, 2010).

### **2.1.5 PHA come biocarburanti**

L'esterificazione di PHAmcl al 3-idrossialcanoato-metil-estere (3HAME) che presenta una composizione molto simile agli esteri derivanti dalla trans-esterificazione di oli vegetali o sego, i quali costituiscono il "biodiesel" (Koller et al., 2012). Inoltre, il 3HAME presenta un calore di combustione simile alla benzina, anche se la conversione a "biocarburanti" necessita di una miscela con i comuni combustibili. Recentemente, Zhang et al. (2009) hanno dimostrato la possibilità di miscelare nei carburanti (diesel o gasoline) il 10% di 3-idrossibutirrato-metil-estere (3HBME) e 3-idrossialcanoato-metil-estere (3HAME), incidendo sul loro potenziale di combustione.



Figura 2.4 Alcuni usi attuali o proposti dei PHA (Chen, 2010)



### 3. Microrganismi e PHA

Per la sintesi dei poli-idrossialcanoati i vari tipi di batteri utilizzano diversi percorsi metabolici.

Per esempio, *Ralstonia* produce PHA a catena laterale corta (*scl*), mentre *Pseudomonas* produce PHA a catena laterale media (*mcl*). I primi utilizzano l'acetil-CoA, l'esanoil-CoA, il crotonil-CoA (dal processo di degradazione degli acidi grassi) e il metilmalonil-CoA. I secondi invece producono PHA a partire dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi (Aldor et al., 2003). La PHA sintetasi è l'enzima chiave nella biosintesi e determina le tipologie del polimero prodotto dalle varie specie batteriche.

Questo enzima appartiene al gruppo delle idrolasi ed è altamente specifico nei confronti del substrato.

I geni che codificano per l'enzima sono stati ampiamente clonati da varie specie batteriche, quali ad esempio *Alcaligenes eutrophus*, *Lamprocystis reseopersicina*, *Methylobacterium extorquens*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp.DSM1650, *Rhodococcus ruber*, *Rhodospirillum rubrum*, *Thiocystis violacea*.

La selezione di un microrganismo per la produzione industriale di PHA è basata su diversi fattori, tra i quali i più rilevanti sono la capacità di una specie di utilizzare una fonte di carbonio economica, il suo tasso di crescita e la quantità di polimero che riesce ad accumulare (Lee, 1995). Sono inoltre preferiti ceppi batterici geneticamente stabili e possibilmente competitivi nei confronti di potenziali contaminanti (Koller et al., 2012).

Quando si progettano le condizioni di coltura per ottenere un'ottimizzazione delle rese, è importante tenere in considerazione le diverse esigenze di crescita dei ceppi batterici impiegati.

Nella sintesi di poli-idrossialcanoati si riscontrano due problemi, la mancanza di ceppi produttori di PHA in grado di utilizzare i surplus delle filiere agro-alimentari e la presenza intracellulare di depolimerasi, enzimi che la cellula attiva nel momento in cui le condizioni lo inducono a ricorrere alle sostanze di riserva precedentemente accumulate.

### 3.1 I microrganismi

I microrganismi in grado di sintetizzare i poli-idrossialcanoati sono molteplici e si possono riassumere nella tabella sottostante.

Tabella 3.2 Generi batterici che includono specie note produttrici di PHA (Koller et al., 2009)

<i>Acidovorax</i>	<i>Escherichia</i> (ricombinante)	<i>Paucispirillum</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Escherichia</i> (Wild Type)	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Protomonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Gloeotheca</i>	<i>Physarum</i>
<i>Allochromatium</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Anabaema</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Aphanotheca</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Axobacter</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Haloterrigena</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Rubrivivax</i>
<i>Azohydromonas</i>	<i>Hypomicrobium</i>	<i>Saccharophagus</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Klebsiella</i> (ricombinante)	<i>Shinorhizobium</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Legionella</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Stella</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiococcus</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Microvoleus</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Wautersia</i> (oggi <i>Cupriavidus</i> )
<i>Cyanobacterium</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Defluviococcus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nostoc</i>	
<i>Delftia</i>	<i>Oceanospirillum</i>	
<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Oscillatoria</i>	
<i>Erwinia</i>	<i>Paracoccus</i>	

Una tra le specie più note e studiate è il batterio *Cupriavidus necator* (originariamente nominato *Alcaligenes eutrophus*, poi ribattezzato *Wautersia eutropha* e successivamente *Ralstonia eutropha*). Riesce ad accumulare P(3HB) fino all'80% del peso secco cellulare. La biosintesi del polimero, avviene in limitazione di N, P o O (Lee e Choi, 1998).

Utilizzando ceppi di questa specie, Lefebvre et al. (1997) hanno dimostrato che i composti precursori per sintetizzare il monomero 3HV sono gli acidi grassi, come acido propionico o acido pentanoico. Lo ione propionato viene convertito in propionile-CoA, che subisce un ulteriore decarbossilazione, formando l'acetil-CoA. Due unità di Ac-CoA si condensano creando 3HB. Ulteriori studi (Lefebvre et al., 1997) indicano che per minimizzare l'utilizzo di costosi precursori (acido propionico o acido pentanoico) può influire la disponibilità d'ossigeno.

L'Imperial Chemical Industries (ICI, ora Zeneca Bio Products, UK) ha impiegato *A.eutrophus* (*C.necator*) per la sintesi di P(3HB) e di P(3HB-co-3HV) partendo da glucosio e dall'acido propionico (Lee, 1995).

L'accumulo di P(3HB-co-3HV) può avvenire anche con l'uso di aminoacidi, quali valina, leucina e isoleucina, se avviene in limitazione dello ione ammonio e ovviamente in eccedenza di carbonio (Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2002).

Questa specie batterica può produrre alte concentrazioni di P(3HB) utilizzando anche etanolo come fonte di carbonio, ma esiste un problema di sicurezza nell'impiego di materiale infiammabile oltre che di convenienza economica (Lee, 1995).

Ne consegue che a causa dei costi ingenti relativi alla fonte di carbonio se vengono utilizzati composti puri l'applicazione a livello industriale non è mai completamente decollata. Per cercare di abbattere i costi, è stato quindi preso in considerazione materiale di scarto delle industrie alimentari che, almeno in alcuni interessanti casi, contiene zuccheri che altrimenti andrebbero smaltiti in modo costoso. Uno tra gli esempi più interessanti è rappresentato dal siero di latte, surplus che deriva dalle attività di conversione operata dai caseifici.

Nel caso del siero di latte il costituente principale è il lattosio. Sfortunatamente *C.necator* non possiede gli enzimi capaci di degradare questo disaccaride nei suoi due componenti monosaccaridici glucosio e galattosio. Quindi, al tal fine di poter disporre di una tale fonte di carbonio così abbondante e a costo estremamente ridotto la ricerca si è orientata in due possibili direzioni. La prima strategia prevedeva la ricerca di ceppi microbici in grado di metabolizzare il lattosio e successivamente produrre PHA; la seconda prendeva in considerazione l'ipotesi di modificare geneticamente un ceppo batterico in modo mirato. Ad esempio, batteri capaci di utilizzare il lattosio potevano essere resi PHA-produttori clonandovi i principali geni coinvolti nella biosintesi (*phaA*, *phaB*, *phaC*) oppure in alternativa, rendere ceppi già noti produttori di PHA in

grado di impiegare il lattosio come substrato clonandovi i geni che codificano per l'enzima chiave  $\beta$ -galattosidasi (es. *lacZ*, *lacY*).

Questa ultima strategia è stata preferita, considerando da un lato l'estrema difficoltà nel reperire dall'ambiente ceppi già strutturati geneticamente e fisiologicamente per svolgere entrambe le azioni richieste, e dall'altro lato la complessità dei geni che codificano la sintesi del polimero. Pertanto, la scelta è ricaduta su *C.necator* per la sua comprovata capacità d'accumulare alti quantitativi di poli-idrossialcanoato e mostratosi un ottimo "recipient" di geni alloctoni. L'operone *lac* proveniente da *E.coli* è stato quindi clonato in *C.necator* ottenendo così un ceppo ricombinante in grado di utilizzare il lattosio del siero come fonte di carbonio. La figura che segue (Povolo et al., 2010) mostra, infatti, che solo il ceppo ricombinante è in grado di crescere utilizzando il lattosio o il permeato di siero, mentre il ceppo parentale può solo utilizzare gli zuccheri semplici che si liberano nel siero a seguito di idrolisi enzimatica operata con enzimi commerciali.

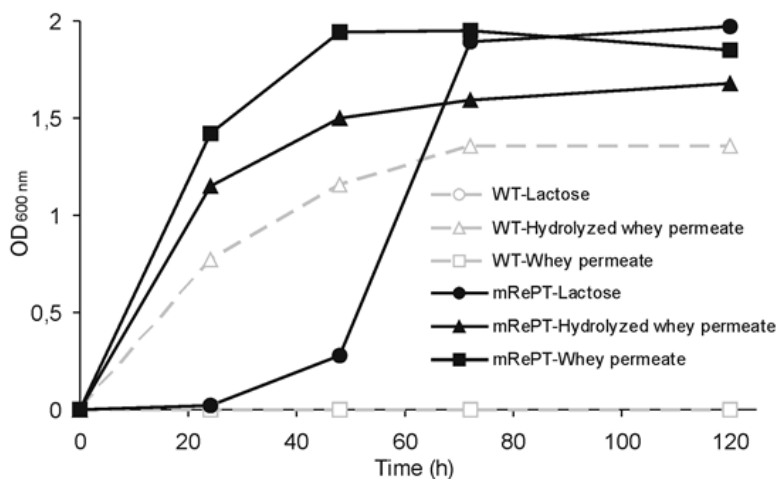


Figura 3.5 Confronto tra la capacità di crescere su lattosio, permeato di siero di latte e siero idrolizzato, da parte del ceppo parentale *C.necator* WT e il suo derivato *C.necator* mRePT contenente operone *lac* (Povolo et al., 2010).

Inoltre, una carenza nella produzione di PHA può essere individuata nel catabolismo dello stesso polimero per opera di depolimerasi endogene. Le depolimerasi sono codificate da geni, *phaZ1*, *phaZ2* e *phaZ3*, i quali vengono espressi, qualora il microrganismo necessiti di energia o sostanze nutritive per la crescita e la fonte di carbonio esogena risulta essere carente (Steinbüchel e Hein, 2001). Di conseguenza, un altro obiettivo recente perseguito è stato quello di inattivare i geni delle depolimerasi in modo, che una volta prodotto, il biopolimero venga conservato nelle cellule in coltura fino a momento dell'estrazione (downstream).

Il trasferimento di questi geni avviene di solito facendo uso di plasmidi appositamente progettati e costruiti in laboratorio, e che possono essere con successo trasferiti, accettati e mantenuti nella

cellula ricevente che potrà quindi esprimerli, raggiungendo così l'obiettivo prefissato. Al fine di migliorare la stabilità dei costrutti all'interno della cellula ricevente i geni possono essere poi trasferiti direttamente al cromosoma batterico.

Nell'immagine seguente, i due ceppi ricombinanti *C.necator mRePT* (*lacZ* inserito in *phaZ1*) e *C.necator mRePT-gfp3* (*lacZ* inserito in *phaZ1* e *gfp* in *phaZ3*) degradano il PHA come fonte di carbonio, se posti in situazione di carenza zuccherina, in quantità significativamente ridotta rispetto al ceppo selvatico parentale *C.necator* WT (Povolo et al., 2010).

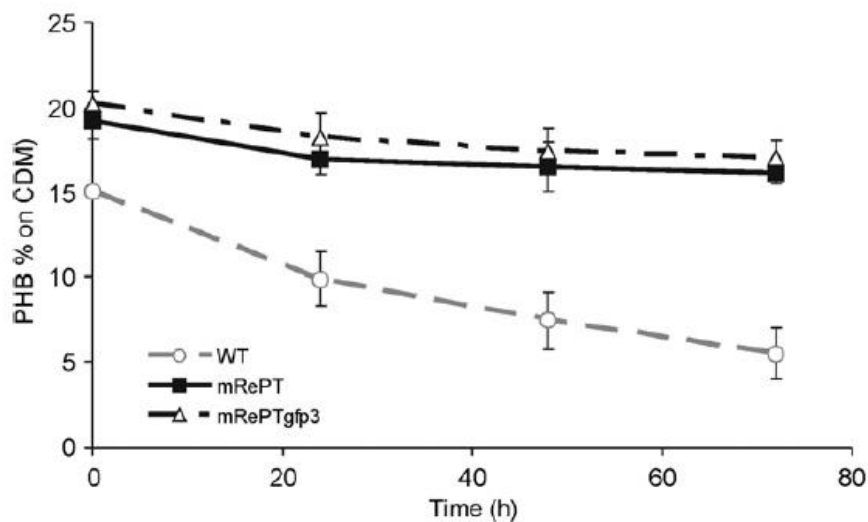


Figura 3.6 Degradazione di poli-idrossialcanoati (%PHB sulla sostanza secca cellulare) nel terreno colturale DSMZ 81 non contenente alcuna fonte di carbonio. Sono messi al confronto, *C.necator* WT (parentale) e i due ricombinanti mRePT e mRePtgfp3 (Povolo et al., 2010).

Come illustrato dalle figure sopra riportate, al fine di ottenere dati attendibili sia sulla crescita dei ceppi, sia sulla produzione di PHA sono state allestite tre diverse condizioni di crescita, con:

1. Lattosio diluito con acqua (l'acqua presenta un pH di 7 e ha subito una sterilizzazione a 110 °C per 10 min).
2. Siero di latte permeato e poi idrolizzato, che presenta in misura equi molare i monosaccaridi costituenti glucosio e galattosio (Povolo et al., 2010).
3. Siero di latte permeato, ottenuto mediante ultrafiltrazione del siero di latte da un'industria casearia italiana (Latterie Vicentine Scarl, Italia).

Inoltre, l'efficienza di utilizzazione degli zuccheri è stata seguita direttamente monitorando la scomparsa dal mezzo colturale di lattosio e dei singoli monosaccaridi glucosio e galattosio, su permeato di siero idrolizzato che tal quale. I risultati di tale sperimentazione sono riportati nella figura 3.7 che segue.

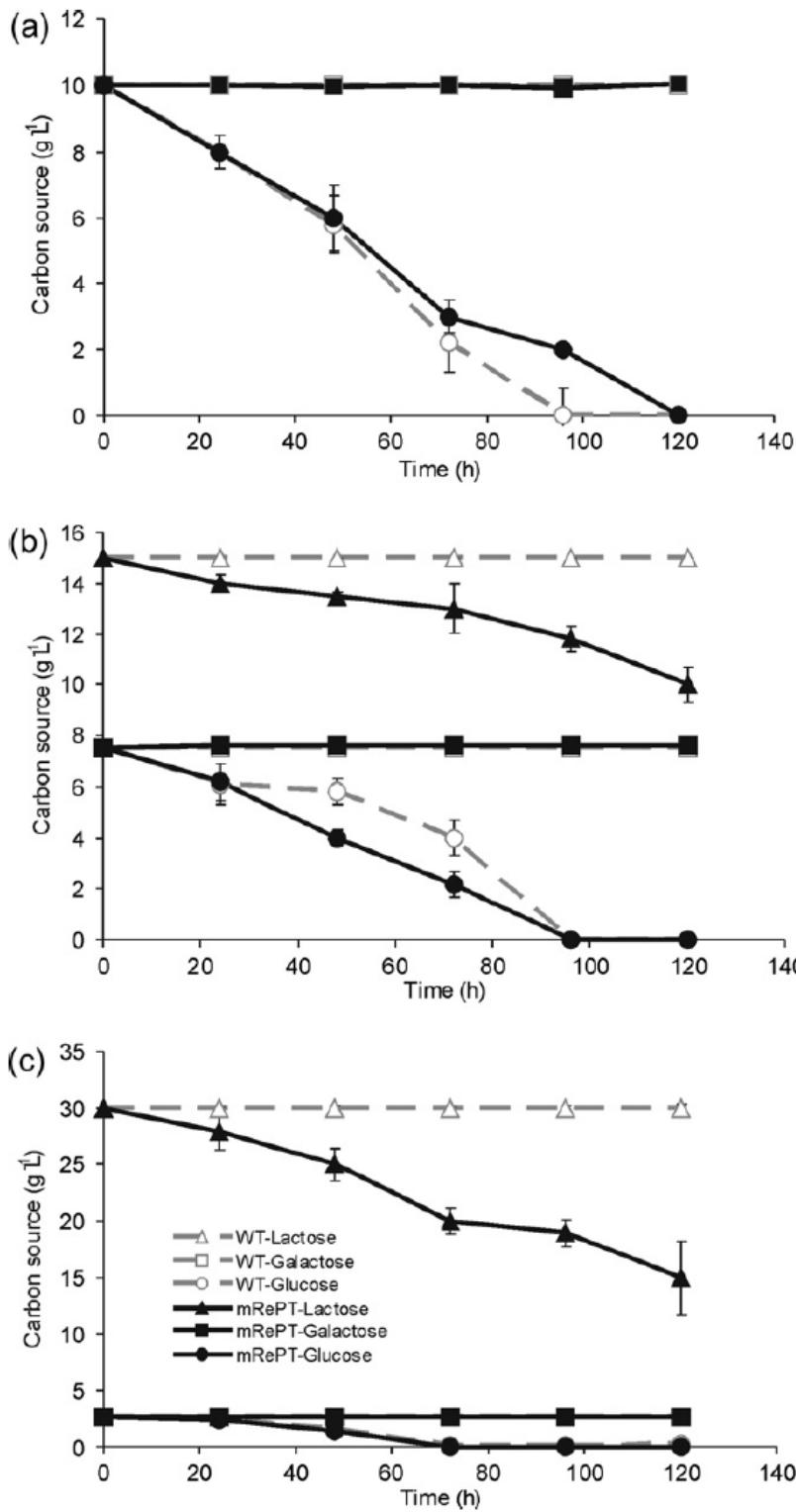


Figura 3.7 Le diverse performances dei ceppi di *C.necator* (*C.necator* WT e *C.necator* mRePT), in termini di consumo delle varie sorgenti di carbonio presenti nei tre mezzi di cultura glucosio e galattosio, siero di latte idrolizzato e siero di latte tal quale (Povolo et al., 2010).

Questa serie di grafici mostra chiaramente che il ceppo ricombinante di *C.necator*, al contrario del parentale, può metabolizzare efficacemente il lattosio, rendendo così possibile l'utilizzo degli scarti dei caseifici.

Povolo e Casella (2003) hanno riportato la produzione di PHA da lattosio anche da parte di *Paracoccus denitrificans* DSM 413, *Sinorhizobium meliloti* 41 e *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM1034. Questi ultimi due sono in grado di produrre il polimero direttamente dal permeato di siero di latte, ma i livelli produttivi risultano piuttosto limitati.

*Haloferax mediterranei* risulta anch'esso candidato promettente per una produzione in scala industriale da siero di latte (Koller et al., 2012). Il batterio presenta un'elevata robustezza e stabilità ed il rischio di contaminazione microbica durante la coltivazione è molto limitato. Inoltre il ceppo produce P(3HB-co-8%-3HV) addizionando al substrato di crescita 3HV, abbattendo così i costi elevati dell'impiego di precursori, acido propanoico o acido pentanoico.

Con la somministrazione di opportuni precursori (rispettivamente, acido pentanoico e  $\gamma$ -butirrolattone) è possibile ottenere, dal permeato di siero idrolizzato il co-polimero P-(3HB-co-21,8%-3HV-co-5.1%-4HB) (Koller et al., 2012).

La buona conversione degli zuccheri contenuti nel siero a 3-idrossivalerato (unità di 3HV), le eccellenti caratteristiche del polimero (bassa temperatura di fusione, elevate masse molecolari intracellulari) e un trattamento a valle economico (Munoz et al., 1994), rendono il ceppo particolarmente interessante. Il prezzo di produzione stimato è risultato di € 2,82 per kg di PHA (Koller et al., 2012).

Un'altra possibile produzione di poli-idrossialcanoati deriva dalla conversione del lattosio in acido lattico e successiva sintesi del polimero. La prima fase del processo è anaerobica, si utilizzano lattobacilli che trasformano il lattosio in acido lattico (più di 0,9 g di acido lattico per grammo di fonte di carbonio), mentre la seconda fase prevede la coltivazione di *Alcaligenes latus* o *Azotobacter vinelandii* in aerobiosi con metabolizzazione dell'acido lattico in acetil-CoA e sintesi di PHA.

*Alcaligenes latus* cresce velocemente e può accumulare PHA anche durante questa fase. Inoltre riesce a utilizzare anche il saccarosio come fonte di carbonio e grazie a questa sua particolare capacità può essere coltivato impiegando come substrati di crescita gli scarti degli zuccherifici, melasse di barbabietola o di canna (Lee, 1995). È infine in grado d'utilizzare anche il siero di latte, sottoprodotto delle industrie casearie (Koller et al., 2012)

Altre interessanti esperienze degli anni novanta riportano da Yellore e Desai (1998) riguardano ceppi di *Methylobacterium* isolati in India da uno stagno. Tale organismo è cresciuto in un substrato contenente lattosio puro con la produzione di PHB di 3,1 g/L, corrispondente ad un contenuto

polimerico del 59% del CDM (cell dry mass). Con l'impiego di siero di latte assieme ad una fonte d'azoto, la produzione di PHB è risultata di 2,6 g/L, corrispondente ad un contenuto di biopolimero pari al 44% della CDM. Successivamente ove Nath et al. (2008) hanno coltivato il microrganismo in fermentatore in modalità *batch* raggiungendo le concentrazioni finali di PHB di 2,07 g/L (67% di CDM).

Alcune specie del genere *Pseudomonas* riescono a sintetizzare PHA se il substrato di crescita presenta alcani, alcheni, acidi grassi e carboidrati (Solaiman et al., 2001).

La loro capacità di metabolizzare i lipidi implica che il metabolismo dell'acido grasso (sintesi e  $\beta$ -ossidazione) sia collegato con la biosintesi di PHA (Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2002). Gli intermedi della  $\beta$ -ossidazione e della sintesi dell'acido grasso forniscono 3HA, contribuendo per circa il 90% alla costituzione del PHA accumulato (Huijberts et al., 1994). L'enzima chiave è una transferasi, presente in *P.putida* (Rehm et al., 1998), *P.aeruginosa*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *P.oleovorans* (Lee e Choi, 1998) e altre specie di *Pseudomonas* (Hoffmann et al., 2000).

Per esempio, *P.oleovorans* accumula 3-idrossioctanoato (3HO) e 3-idrossiesanoato (3HHx) se coltivato in un substrato ricco di ottano, alcol n-ottilico o acido ottanoico (Lee e Choi, 1998).

In condizioni di crescita in continuo, *P.oleovorans* produce P(3HHx-co-3HO) (11,6 g/L e 0,58 g di PHA/ L·h). Inoltre, in condizioni di *fed-batch*, la concentrazione cellulare di P(3HHx-co-3HO) poteva essere aumentata a 12,1 g/L (Lee, 1995).

Aldor e Keasling (2003) hanno trasferito a cellule di *E.coli* la capacità di accumulare PHB mediante uso di vettori plasmidici contenenti geni provenienti da *Pseudomonas* sp.61-3.

*P.cepacia* (oggi rinominato *Burkholderia cepacia*) è capace di accumulare PHB fino al 56% del peso secco della cellula, con produttività di circa 5 g/L, a partire da lattosio (Koller et al., 2012), ma il suo potenziale d'impiego è a tutt'oggi evitato a causa dei vari ceppi di questa specie riconosciuti prima come fitopagani, e in seguito anche come patogeni umani coinvolti nei casi di fibrosi cistica.

Recentemente Romanelli et al. (2014) hanno descritto la produzione di PHB direttamente dall'olio di mais, dal lardo e dal sego impiegando *Delftia acidovorans* DSM39, peraltro in grado di produrre un'interessante co-polimero che contiene 4HB.

Sempre recentemente è stato seriamente preso in considerazione il più noto tra i batteri utilizzati spesso in laboratorio come "recipient" per nuovi geni o come tramite per clonare geni in altre specie (Lian-Ngit et al., 2012).



## 4. I Substrati di partenza

I PHA non sono ancora competitivi con i prodotti plastici di origine petrolchimica, se si prendono in considerazione i costi di produzione e le proprietà dei materiali. Una quota importante della spesa di produzione è legata ai substrati di carbonio, utilizzati per alimentare i microorganismi produttori del polimero. Per ridurla, si potrebbe far uso dei materiali di surplus derivati da attività industriali di varia natura, rendendo così il processo di produzione di PHA economicamente competitivo. Oltre alle spese del substrato, i costi devono essere ottimizzati anche nella lavorazione a valle (downstream), per il recupero e la raffinazione dei granuli di poli-idrossialcanoati, dopo aver effettuato la raccolta dalle cellule. Come prodotti intracellulari, i PHA devono essere separati dal resto della massa, costituita principalmente da proteine, lipidi, acidi nucleici e polisaccaridi. Il recupero avviene con l'uso di solventi, spesso pericolosi e difficili da smaltire, rendendo il processo di produzione delle bioplastiche non completamente ecologico. Infine, l'aumento di produttività può avvalersi dell'aiuto dell'ingegneria genetica al fine di realizzare microorganismi che producano elevate quantità di biopolimero anche in ambienti poco favorevoli (Koller et al., 2012).

### 4.1 Substrati puri

Maurice Lemoigne, nel lontanissimo 1926, descrisse per la prima volta la molecola di PHA, costituente del microrganismo *Bacillus megaterium*.

Solo molti anni dopo si capì di poter sfruttare questo prodotto di riserva per produrre materiale bioplastico. I primi studi avvennero con l'utilizzo di substrati puri ma fu subito chiaro che ciò comportava costi elevati.

Una strategia per lo sviluppo di materiali innovativi è la manipolazione della fonte di carbonio fornita alla cellula, controllando così la biosintesi del polimero. Quest'ultima varia, infatti, in relazione alla tipologia delle sostanze nutritive disponibili, comprese alcune molecole precursore, ottenendo così un potente strumento per modulare la composizione finale del polimero prodotto (Aldor et al., 2003).

Esistono moltissimi precursori puri, ma i principali sono acidi grassi, alcoli, acido levulinico, aminoacidi (Steinbüchel et al., 2003).

#### Acidi grassi

La lunghezza della catena di carbonio dell'acido grasso, utilizzato come substrato, è correlata all'estensione molecolare degli acidi idrossi alcanoici (Gross et al., 1989). Gli acidi grassi alifatici,

come acido valerianico, acido eptanoico, acido nonanoico, ecc., vengono metabolizzati durante la crescita batterica e poi accumulati come PHA (Steinbüchel et al., 2003).

Per esempio, *R. eutropha* sintetizza il polimero impiegando l'acido  $\gamma$ -clorobutirrico (Choi et al., 1999), acido ottanoico, acido decanoico, acido dodecanoico oppure acido laurico (Antonio et al., 2000).

L'acido propionico e l'acido pentanoico sono i precursori più usati per la biosintesi di 3HV e di poli(3HB-co-3HV) (Koller et al., 2009), ma presentano degli inconvenienti: sono piuttosto costosi e possono presentare un certo grado di tossicità (Steinbüchel et al., 2003).

### Alcoli

La formazione di P(3HB-co-3HV) avviene alimentando la coltura batterica con etanolo o propanolo oppure 1-pentanololo.

Più noto e comune è il caso di *R. eutropha* (*C. necator*) che impiega  $\gamma$ -butirrolattone per la biosintesi di 4HB.

### Acido levulinico

L'acido levulinico è un precursore solo per batteri che possiedono l'enzima levulinico-sintasi e viene impiegato per la biosintesi dei polimeri contenenti acido 4-idrossivalerico (4HV) (Steinbüchel et al., 2003).

### Aminoacidi

Il catabolismo di aminoacidi è un importante fonte di precursori per i poli-idrossialcanoati. La fonte aminoacidica è costituita da valina, isoleucina, treonina e metionina. Valentin et al. (2000) hanno dimostrato che acido glutammico e acido  $\gamma$ -aminobutirrico sono convertiti in 4HB. Tuttavia, il loro utilizzo non è realizzabile per l'elevato costo e la tossicità (Steinbüchel et al., 2003).

Le strategie di coltivazione batterica con substrati specifici prevedono inoltre l'aggiunta di inibitori o di additivi di crescita, nonché di materiali polimerici.

Gli inibitori impediscono ai concorrenti metabolici o ai percorsi indesiderati di ostacolare la biosintesi di poli-idrossialcanoati allungando inoltre la catena carboniosa.

Un esempio è dato dall'utilizzo di acrilato in *R. eutropha* che inibisce la  $\beta$ -ossidazione (Aldor et al., 2003).

Gli additivi di crescita hanno la proprietà di accorciare il tempo di produzione del PHA, sono piuttosto economici e sono già stati saggiati con successo in laboratorio. Un esempio è il *side streaming* (Koller et al., 2005).

I materiali polimerici aggiunti possono inserirsi nella composizione del polimero migliorando le sue caratteristiche. I più impiegati sono poli- vinil-alcool (PVA), il poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL), alcuni

composti inorganici (argille, minerali come la sepiolite e la montmorillonite oppure carbonato di calcio) e organici, alcuni nanocomposti e derivati da fibra naturale (Koller et al., 2012). In particolare i nanocomposti presentano la capacità di migliorare la permeabilità ai gas e di influire sulle caratteristiche termiche e meccaniche; i composti di fibra naturale migliorano le proprietà meccaniche e la biodegradabilità del prodotto finale (Koller et al., 2012).

La possibilità di influire sulla composizione del biopolimero finale può ancora una volta derivare dall'uso appropriato di tecniche del DNA ricombinante. Occorre naturalmente identificare prima di tutto il/i gene/i che codificano per le funzioni che si vogliono migliorare o inibire, per poi passare alle tecniche di clonaggio e verifica su substrati puri, in prima istanza, e su substrati realmente disponibili, come test finale.

Un recente approccio (Valentin et al., 1999) riguarda l'impiego di piante per la produzione di poli-idrossialcanoati creando piante transgeniche, contenenti geni provenienti da *R. eutropha*.

#### **4.2 Materiale di scarto come substrati**

Una interessante strategia alternativa mirata a minimizzare i costi di produzione del polimero riguarda l'impiego di rifiuti organici o materiali di varia natura derivanti da attività agro/alimentari e industriali. Il concetto assume ulteriore significato se si considera che spesso lo smaltimento di tali residui comporta costi di per sé elevati o contribuisce ai noti problemi di contaminazione ambientale.

Le potenziali strutture dedicate alla produzione di biopolimeri potrebbero integrare le filiere industriali già esistenti in modo da ridurre ulteriormente i costi legati al trasporto del materiale.

Rispondono particolarmente bene a tali requisiti i derivati delle industrie di macellazione o di trasformazione alimentare, come i numerosi idrolizzati proteici, carne e ossa oppure oli vegetali. Questi ultimi contengono trigliceridi (acidi grassi), metabolizzabili in PHA (Asby et al., 1998) oppure dopo idrolizzazione o trans-esterificazione trasformati in biodiesel e glicerina (Koller et al., 2009).

Anche le eccedenze dei prodotti dell'agricoltura come lignocellulosa, canna da zucchero, farina di frumento, bucce di frutta, fibre di frutta, segatura e paglia di grano, sono ritenuti materiali degni di attenzione (Koller et al., 2012).

Un esempio di realtà produttiva che sfrutta le varie tipologie di surplus, si può trovare in Brasile. L'azienda PHBISA produce PHA dai derivati della canna da zucchero. Il saccarosio ottenuto viene convertito in bioetanolo e biopolimero. L'energia necessaria per la loro produzione è generata dalla combustione dello scarto, chiamato bagassa. Invece la frazione dell'olio di flemma (principalmente

iso-pentanol) derivato dalla distillazione del bioetanolo, viene applicato come solvente d'estrazione per l'isolamento del PHA dalla biomassa microbica (Koller et al., 2009).

Un ulteriore utilizzo dei batteri produttori di poli-idrossialcanoati è il processo di rimozione biologica del fosforo dalle acque reflue. È un sistema per proteggere i corpi idrici dall'eutrofizzazione e rispetto ai processi di rimozione chimica, ha un minor costo d'investimento e ridotta produzione di fanghi di risulta. Il fosforo riveste un ruolo importante nei meccanismi di trasferimento dell'energia cellulare: con l'energia prodotta dalle reazioni di ossidoriduzione si ha la conversione dell'adenosina difosfato (ADP) in adenosina trifosfato (ATP); al contrario quando la cellula necessita di energia, si ha la conversione dell'ATP in ADP e rilascio di fosforo. La rimozione biologica, inizia con i batteri che accumulano, in forma di polifosfato (Poli-P), il fosforo in eccesso presente nelle acque reflue. Poi in fase anaerobica, assimilano i derivati delle fermentazioni in PHB rilasciando fosforo, precedentemente accumulato in Poli-P. Invece nella fase aerobica, ricavano energia attraverso l'ossidazione dei prodotti di stoccaggio intracellulari (PHB) e ricostituiscono le catene di polifosfati all'interno della cellula stessa (Lee et al., 1999).

Un'ulteriore e interessante materiale di surplus è il siero di latte, sottoprodotto della trasformazione del latte in formaggio, che grazie al suo alto contenuto in lattosio rappresenta un ottimo substrato di sviluppo per batteri accumulatori di poli-idrossialcanoati.

## 5. Il siero di latte come materia prima

Il siero di latte è la parte liquida del latte che si separa dalla cagliata durante la coagulazione acida o enzimatica ed è un importante sottoprodotto dell'industria casearia. Esso rappresenta l'80±90% del volume di latte trasformato e contiene tra l'80 e il 90% di carboidrati, più del 10% di proteine e 1-2% di grassi.

Stime OCSE (Organisation for Economic Co-operation and Development) e FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) per il 2008, riferiscono di una produzione di siero dell'ordine di  $1,60 \cdot 10^8$  tonnellate con un incremento annuo dell'1-2%. Nel 2008, i valori stimati erano di  $4 \cdot 10^7$  tonnellate per gli Stati Uniti e  $5 \cdot 10^7$  tonnellate per l'Unione europea (Koller et al., 2012).

La maggior parte del siero veniva in passato scartato come rifiuto negli ambienti circostanti (fiumi, laghi, mari e terreni agricoli), causando drammatici problemi d'inquinamento.

Essendo il lattosio la principale componente del siero, esso risulta anche il principale responsabile degli elevati valori di BOD (Biochemical Oxygen Demand) (BOD: 40.000-60.000 ppm) e COD (Chemical Oxygen Demand) (COD: 50,000-80,000 ppm) che si vengono a registrare una volta convogliato nei bacini acquiferi. D'altra parte, il suo rilascio sul suolo, modifica le strutture fisiche e chimiche con conseguente diminuzione della resa delle colture (Koller et al., 2012), potendo comunque raggiungere rapidamente le falde freatiche.

L'unica alternativa sostenibile risiede nel considerare il siero e i suoi derivati come una risorsa preziosa con l'obiettivo di un suo utilizzo nell'industria alimentare umana o animale. In Italia, quest'ultima applicazioni non è sempre consentita; un esempio è il regolamento disciplinare per i prodotti suini DOP (Denominazione di Origine Protetta) che non ammette il suo impiego in suinocoltura (Koller et al., 2012).

Il mercato dei prodotti derivati dal siero per l'alimentazione umana, ovvero dolci, supplementi nutrizionali nelle formulazioni di body building (per aumentare la massa muscolare), bevande, additivi alimentari (gelati e prodotti a base di carne), alimenti per l'infanzia, risultando abbastanza fiorente, non è certamente in grado di assorbire quegli enormi quantitativi di siero quotidianamente prodotto dai caseifici. Peraltro, recentemente sono stati resi noti dati relativi alle quote di popolazione intollerante al lattosio e si stima che il 75% degli adulti nel mondo presentano ipolattasia (Koller et al., 2012).

## 5.1 Estrazione dei principi nutritivi dal siero

Il primo importante passo in vista dell'utilizzazione del siero di latte, consiste nella separazione della frazione proteica da quella zuccherina. Nella figura 5.8. è riportato schematicamente il processo di separazione così come avviene presso alcuni stabilimenti europei. Nel caso specifico l'illustrazione si riferisce al processo adottato su larga scala da "Latterie Vicentine SCA, Bressanvido, Vicenza".

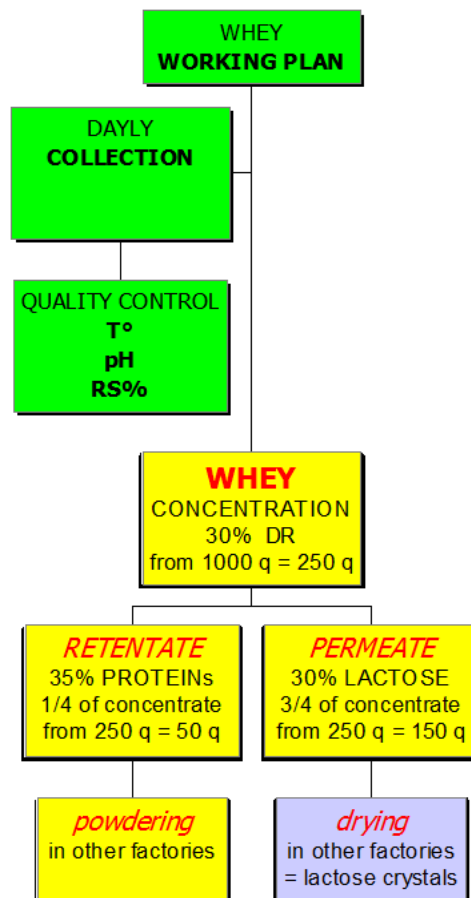


Figura 5.8 Rappresentazione schematica del processo di separazione del permeato (contenente il lattosio) dal retentato (contenente la frazione proteica).

Il latte di partenza è intero e dapprima c'è rimozione, con mezzi meccanici, della sua parte grassa; quindi il siero scremato dolce è sottoposto a una fase di concentrazione, eliminando l'80% del contenuto d'acqua. Il concentrato viene separato, mediante ultrafiltrazione, in siero retentato (frazione proteica con residui di lattosio) e siero permeato (frazione carboidratica).

Il siero retentato è costituito da lattoferrina, lattoferricina,  $\alpha$ -lattoalbumina,  $\beta$ -lattoglobulina. Vengono impiegate come integratori alimentari o di mangimi, per applicazioni farmaceutiche oppure utilizzate come fonte d'azoto.

Invece il siero permeato contiene circa l'80% del lattosio.

La possibilità di impiegare il permeato come fonte di carbonio per la crescita microbica dipende quindi dalla capacità del ceppo che sarà utilizzato per metabolizzare questo abbondante disaccaride, costituito da glucosio e galattosio tenuti assieme da uno specifico legame che richiede un altrettanto specifico enzima, la  $\beta$ -galattosidasi.

Inoltre, come spiegato nel Capitolo 3, occorrerà verificare che la specie microbica selezionata sia anche in grado di utilizzare entrambi gli zuccheri semplici che si liberano. A tutt'oggi sono principalmente utilizzate idrolisi enzimatiche facendo uso di enzimi commerciali, ma questo step incide ancora molto sul prezzo finale del prodotto. La possibile alternativa, come spiegato in una precedente parte della presente tesi (Capitolo 3), ricade nella ricerca di microrganismi adeguatamente equipaggiati di adatti corredi enzimatici, in ultima analisi, nel modificare geneticamente i migliori produttori di PHA conferendo loro tali caratteristiche.

Esiste anche la possibilità di convertire il lattosio in acido lattico per poi arrivare a PHA, oppure lo stesso acido lattico può essere trasformato in acido polilattico (PLA) (Kim et al., 1995).

## 5.2 Produzione di PHA in fermentatore

Generalmente la produzione di PHA prevede vari passaggi, fra cui la fermentazione (intesa come fase di crescita seguita da un accumulo), la separazione della biomassa dal brodo di coltura, l'essiccazione della biomassa, l'estrazione del biopolimero, l'essiccazione del medesimo e l'imballaggio finale.

La produzione industriale può prevedere un processo in continuo oppure in *batch*. La scelta dipende dal ceppo microbico, dalla sua cinetica di crescita e dalla fase del metabolismo in cui accumula il polimero.

Per esempio, in *Alcaligenes latus* e *Pseudomonas putida*, ove la produzione di poli-idrossialcanoati segue le fasi di crescita, viene impiegato un fermentatore in continuo (CSTR: reattore a serbatoio agitato in continuo) (Hartmann et al., 2001). In questo bioreattore è possibile controllare, contemporaneamente e indipendentemente, vari parametri di processo, tensione, pH, ossigeno disciolto (OD) e concentrazione di CO<sub>2</sub>, comportando così una maggior velocità di crescita e densità di popolazione (Koyama et al., 1995).

Invece, il processo mediato da *Cupriavidus necator* predilige due reattori: dapprima la produzione di biomassa avviene in CSTR e poi in un reattore *batch* nel quale le condizioni di incubazione vengono sbilanciate a favore della fonte di carbonio. Tale combinazione garantisce maggiore produttività in termini di biopolimero (Braunegg et al., 1995).

### 5.3 Estrazione di PHA

Il recupero dei granuli contenuti nelle cellule batteriche, prevede come primo step la lisi cellulare, seguita dalla separazione del biopolimero dal resto delle componenti cellulari.

L'estrazione e la raffinazione del prodotto necessitano di solventi pericolosi per uomo e ambiente. Per mantenere il processo ecologicamente compatibile, sono in studio sistemi di lisi chimica e/o biologica alternativi.

Attualmente i dettagli metodologici adottati vengono calibrati in relazione al ceppo microbico utilizzato e alla purezza del prodotto richiesto.

L'Estrazione diretta di PHA dalle biomasse avviene a temperatura ambiente (Choi e Lee, 1999). L'operazione impiega solventi alogenati come cloroformio, diclorometano o 1,2-dicloroetano, e aggiungendo un anti-solvente (etanolo, metanolo o acetone) la solubilità del polimero viene ridotta causando la precipitazione dei granuli (Koller et al., 2009). Recentemente, Braunegg et al. (2002) hanno descritto un sistema a tre componenti costituito da acqua-cloroformio-etanolo, che si presentano in due fasi. La fase più bassa (95%  $\text{CHCl}_3$ , residui di etanolo e acqua) è utilizzata per l'estrazione di PHA, mentre la fase superiore contiene solo quantità trascurabili di solventi alogenati.

Un metodo di lisi enzimatica è stato sviluppato da Imperial Chemical Industries (ICI, London, UK) per recuperare PHB da *C.necator* utilizzando delle proteasi. Il processo prevede il trattamento termico e lisi enzimatica della biomassa cellulare seguito da lavaggio con tensioattivo anionico per sciogliere le sostanze residuali dal polimero (Holmes e Lim, 1990). I costi degli enzimi sono elevati ma è possibile ottenere una maggiore purezza del prodotto.

In altri esempi riportati, *Pseudomonas putida* viene distrutto dalla combinazione di shock termico e azione dell'enzima alcalasi cui segue un trattamento con il solvente SDS (laurilsolfato di sodio) ed EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) (Yasothea et al., 2006). In alternativa, con Triton X-100 (tensioattivo) e ipoclorito di sodio.

L'estrazione utilizzando un mezzo ipotonico è stata riportata per *Haloferax mediterranei* (batterio osmofilo). Avviene con l'immersione in acqua distillata (mezzo ipotonico) e causa la fragilità della parete cellulare, la cellula si rigonfia e la parete si danneggia liberando i vari componenti nel mezzo di sospensione. I granuli di PHA a causa delle loro notevoli dimensioni e densità sono recuperabili, dopo centrifugazione, sedimentazione o filtrazione. Un ulteriore lavaggio con opportuni detergenti (esempio: SDS) porta a un maggior grado di purezza del polimero (Ghatnekar et al., 2002).



La rimanente massa cellulare costituita da proteine, lipidi, acidi nucleici e polisaccaridi, può essere re-impiegata come fonte di carbonio e azoto per successive colture microbiche, può essere conferito in impianti di produzione di biogas o utilizzato come "fertilizzante verde" in agricoltura (Koller et al., 2012).

Segue poi un ulteriore lavaggio, flocculazione ed essiccazione: il polimero viene recuperato sotto forma di polvere bianca la quale viene fusa, estrusa e convertita in scaglie secondo la tecnologia tradizionale dei polimeri di sintesi petrolchimica.

## 6. Life Cycle Analysis

L'analisi del ciclo di vita (LCA: Life Cycle Analysis) è un metodo per quantificare la sostenibilità di un prodotto o di un processo. Comprende i componenti delle materie prime, il trasporto, la fabbricazione del prodotto, l'utilizzo finale e lo smaltimento (Gonzalez et al., 2010). Il consumo di energia e l'inquinamento delle acque a causa dell'uso di sostanze chimiche, vengono valutati e confrontati con prodotti alternativi già noti e disponibili. L'impatto sull'ambiente è quantificato in ogni step del processo (Patel et al., 2005). Com'è indicato nella norma UNI EN ISO 14040 (1998), la metodologia LCA viene divisa in quattro fasi: definizione degli obiettivi e del campo di applicazione, analisi d'inventario, valutazione degli impatti, interpretazione.

1) Definizione degli obiettivi e del campo di applicazione: è la fase preliminare, in cui sono definiti gli obiettivi e il campo di applicazione dello studio, i confini del sistema studiato, chi esegue e a chi è indirizzato lo studio.

2) Analisi d'inventario (LCI): consiste nella raccolta di dati e nelle procedure di calcolo, per quantificare i flussi in entrata (es. acqua, energia, materiale grezzo) e in uscita (in aria, acqua e suolo) del sistema produttivo, in accordo all'obiettivo e al campo di applicazione.

3) Valutazione degli impatti (LCIA): ha lo scopo di valutare la portata dei potenziali impatti ambientali.

4) Interpretazione: è un procedimento per la verifica e valutazione dei risultati nelle fasi d'inventario e di valutazione degli impatti, al fine di soddisfare i requisiti descritti nell'obiettivo e nel campo di applicazione, nonché di trarre conclusioni e raccomandazioni.

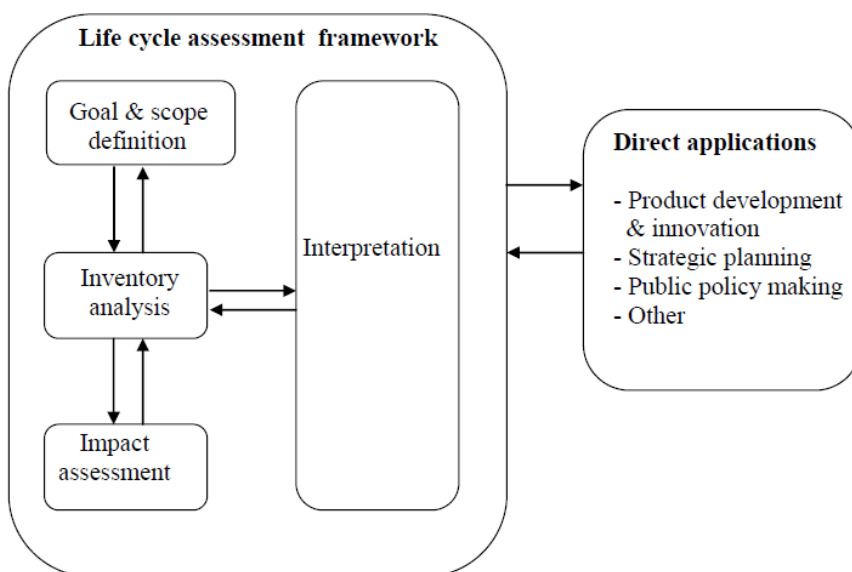


Figura 6.9 Schema generale di LCA

L'obiettivo del LCA nel caso dei prodotti microbici a base di PHA è la previsione dei benefici ambientali che potrebbero essere raggiunti sostituendo le materie plastiche con tali biopolimeri.

Sono necessari due indicatori, NREU (Non-Renewable Energy Use) e GWP100 (Global Warming Potential 100 years), per comprendere come le proprietà del prodotto finale influiscono sull'ambiente.

Le categorie d'impatto prese in considerazione dal LCA sono: eutrofizzazione (EP), acidificazione (AP), strato di ozono (ODP), ecotossicità (ETP), tossicità sull'uomo (HTP). Questi parametri sono messi a confronto tra i vari materiali che compongono il prodotto di origine petrolchimica e il biopolimero.

L'indagine di tutte le proprietà dei materiali in uso nel processo è inoltre utile a raccogliere informazioni, mirate al miglioramento delle caratteristiche del prodotto e all'ottimizzazione dell'intero processo produttivo.

Il processo di produzione viene rappresentato con un diagramma di flusso, ove vengono descritte tutte le operazioni unitarie. Per i prodotti di scarto ottenuti viene adottato un metodo di gestione, la NREU; per il trasporto e il trattamento dei rifiuti invece è ipotizzata la GWP100 prevedendo che tutto il carbonio nei polimeri petrolchimici venga convertito in biossido di carbonio durante il processo di combustione. Inoltre il recupero di energia, durante l'incenerimento, viene introdotto come credito nel calcolo del LCA.

Nello schema di LCA è prevista la voce negativa dell'utilizzo di composti tossici nelle coltivazioni in campo, per esempio i pesticidi, che rilascerebbero nell'ambiente una notevole quantità di fosfati e nitrati, aumentando così il punteggio finale degli indicatori EP, HTP ed ETP (Koller et al., 2012).

Per i prodotti biodegradabili è importante garantire che la decomposizione non avvenga durante il loro periodo utile.

Infine, l'interpretazione del ciclo di vita considera tutti i contributi in termini di energia per ogni fase di produzione del PHA.

## Conclusioni

Il poli-idrossialcanoato è considerato uno dei biopolimeri più promettenti in previsione della riduzione della dipendenza dai combustibili fossili tradizionali e nel ridimensionamento dell'impatto ambientale.

È quindi indispensabile un massiccio lavoro di sensibilizzazione e informazione della clientela ad opera delle aziende che intendono avvalersi del biopolimero, ovvero quelle imprese che fanno della sostenibilità ambientale una *mission* aziendale.

Attualmente la performance del polimero è in costante fase di studio e di miglioramento.

Per raggiungere questo obiettivo, è importante proseguire nelle direzioni che sono state intraprese attraverso ulteriori e ancor più approfonditi studi sui meccanismi microbici di regolazione delle vie biosintetiche e degradative dei PHA, nonché sulla capacità dei microrganismi di far uso dei residui dell'industria agro-alimentare di cui si dispone.

La scelta dei materiali di scarto come eccedenza, quali ad esempio il siero di latte dall'industria casearia, può essere considerata come la via più promettente per rendere l'intero processo produttivo economicamente competitivo nei confronti dei concorrenti petrolchimici PP e PE. La concorrenza, a livello di prezzi, con il mercato delle plastiche risulta infatti molto difficile essendo un settore già ampiamente collaudato ed affermato.

Le conoscenze e gli strumenti per giungere a riduzioni dei costi di produzione concorrenziali sono già disponibili, anche se molto resta da fare per mettere insieme i pezzi del puzzle e per proporre all'industria processi che siano adeguatamente compatibili con l'ecosistema.

## Bibliografia

- Aldor I.S., Keasling J.D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of Polyhydroxyalkanoates. *Current opinion in Biotechnology*, 14:475-483.
- Antonio R.V., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. (2000) Analysis of in vitro substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 182: 111–117.
- Ashby R.D., Foglia T.A. (1998) Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 431–437.
- Bissery M.C., Valeriote F., Thies C. (1985) Therapeutic efficacy of CCNU-loaded microspheres prepared from poly(D,L)lactide (PLA) or poly-b-hydroxybutyrate (PHB) against Lewis lung (LL) carcinoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* , 26:355–355.
- Braunegg G., Lefebvre G., Renner G., Zeiser A., Haage G., Loidl-Lanthaler K. (1995). Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization, *Can. J. Microbiol.*, 41: 239–248.
- Braunegg G., Bona R., Schellauf F., Wallner E. (2002) Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Sustainable biopolyester production, *Polimery*, 47: 13–18.
- Brophy M.R., Deasy P.B. (1986) In vitro and in vivo studies on biodegradable polyester microparticles containing sulfamethizole. *Int J Pharm*, 29:223–231.
- Byrom D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol*; 5:246±50.
- Chen G.Q., (2010). *Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, Microbiology Monographs, Vol. 14, DOI 10.1007/978-3-642-03287\_5\_2.*
- Cheng S., Wu Q., Zhao Y., Zou B., Chen G.Q. (2006) Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) microparticles stimulate murine fibroblast L929 cell proliferation. *Polym Degrad Stab*, 91:3191–3196.
- Choi M.H., Yoon S.C., Lenz R.W. (1999) Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) with subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1570–1577.
- Choi J., Lee S.Y. (1999), Factors affecting the economics of poly-hydroxyalkanoate production by bacterial fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 13–21.
- Clarival A.M., Halleux J. (2005) Classification of biodegradable polymers. In: Smith R (ed) *Biodegradable polymers for industrial applications*. CRC, Boca Raton, 3–56.
- Dai Z.W., Zou X.H., Chen G.Q. (2009) Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion. *Biomaterials*, 30:3075–3083.

- Ghatnekar M.S., Pa J.S., Ganesh M., (2002) Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp. V49, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77: 444–448.
- Gilmore D.F., Antoun S., Lenz R.W., Fuller R.C. (1993) Degradation of poly(b-hydroxyalkanoates) and polyolefin blends in a municipal wastewater treatment facility. *J. Environ. Polym. Degrad.*, 1:269±74.
- Gonzalez C.J., & Woodley J.M. (2010). Bioprocesses: Modelling needs for process evaluation and sustainability assessment, *Computers and Chemical Engineering.*, 34: 1009-1017.
- Gould P.L., Holland S.J., Tighe B.J. (1987). Polymers for biodegradable medical devices. 4-Hydroxybutyrate valerate copolymers as no disintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms. *Int J Pharm*, 38:231–237.
- Griebel R., Smith Z., Merrick J.M. (1968). Metabolism of poly-b-hydroxybutyrate I. Purification, composition, and properties of native poly-b-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*;7:3676±81.
- Gross R.A., De Mello C., Lenz R.W., Brandl H., Fuller R.C. (1989). Biosynthesis and characterization of poly(hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*, *Macromolecules*, 22: 1106–1115.
- Hartmann R., Hany R., Geiger T., Egli T., Witholt B., Zinn M. (2004). Tailored biosynthesis of olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPo1 with improved thermal properties, *Macromolecules*, 37: 6780–6785.
- Hartmann R., Hany R., Pletscher E., Ritter A., Witholt B., Zinn M. (2001) Tailor-made olefinic medium-chain-length poly- [(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: Batch versus chemostat production, *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 737–746.
- Hoffmann N., Steinbüchel A., Rehm B.H.A (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* phaG gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acids consisting of medium-chain-length constituents from no-related carbon sources, *FEMS Microbiol. Lett.*, 184: 253–260.
- Holmes P.A., Lim G.B. (1990). Separation process. US patent, 4910145.
- Huijberts G.N.M., De Rijk T.C., De Waard P., Eggink G. (1994).<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis, *J. Bacteriol.*, 176: 1661–1666.
- Jendrossek D., Knoke I., Jabibian R.B., Steinbüchel A., Schlegel H.G. (1993). Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *J Environ Polym Degrad*, 1:53±63.
- Jendrossek D., Schirmer A., Schlegel H.G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 451–463.
- Jia Y., Kappock T.J., Frick T., Sinskey A.J., Stubbe J. (2000). Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase, *Biochemistry*, 39: 3927–3936.

- Kim M., Cho K.S., Ryu H.W., Lee E.G., Chang Y.K. (2003). Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecylsulphate, *Biotechnol. Lett.*, 25: 55–59.
- Kim, H.O., Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S., Ryu, H.W. (1995). Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132:694-704.
- Klinke S., Ren Q., Witholt B., Kessler B. (1999). Production of medium-chain-length poly(3 hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65.
- Koller M., Salerno A., Muhr A., Reiterer A., Chiellini E., Casella S., Horvat P., Braunegg G., (2012). Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters.
- Koller M., Salerno A., Dias M., Reiterer A., Braunegg G. (2009). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Biotechnological Polymer Synthesis, Food Technol. Biotechnol.*, 48 (3): 255-269.
- Koller, M., Hesse, P.J., Bona, R., Kutschera, C., Atlic, A. & Braunegg, G. (2007). Various Archae and Eubacterial Strains as Potential Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey Lactose, *Macromolecular bioscience*, 7: 218 – 2266.
- Koyama N. e Doi Y. (1995). Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Lett.*, 17: 281–284; 540–548.
- Kubota M., Nakano M., Juni K. (1988) Mechanism of enhancement of the release rate of aclarubicin from poly-beta-hydroxybutyric acid microspheres by fatty acid esters. *Chem Pharm Bull*, 36: 333–337.
- Lafferty R.M., Heinzle E. (1978). Cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(b-hydroxybutyric acid. US patent, 4101533.
- Lee S.Y. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 1-14.
- Lefebvre G., Rocher M., Braunegg G. (1997). Effects of low dissolved-oxygen concentrations on poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 827–833.
- Lian-Ngit Yee, Tabassum Mumtaz, Mitra Mohammadi, Lai-Yee Phang, Yoshito Ando, Abdul Rahim Raha, Kumar Sudesh, Hidayah Ariffin, Mohd Ali Hassan and Mohd Rafein Zakaria. (2012) Polyhydroxyalkanoate Synthesis by Recombinant *Escherichia coli* JM109 Expressing PHA Biosynthesis Genes from *Comamonas* sp. EB172. *Microbial & Biochemical Technology*. DOI dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000079
- Merrick J.M., Doudoro M. (1964). Depolymerisation of poly-b-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol*, 88:60±71.
- Metzner K., Sela M., Schaffer J. (1997). Agents for extracting poly- hydroxyalkane acids. WO patent, 9708931.

Mikova G., Chodak I. (2006). Properties and modification of poly(3-hydroxybutanoate). *Chem Listy*, 100:1075–1083.

Nakayama K., Saito T., Fukui T., Shirakuva Y., Tomita K. (1985). Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. *Biochim Biophys Acta*, 827: 63±72.

Nath A., Dixit M., Bandiya A., Chavda S. & Desai A.J. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch cultures of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, 99(13): 5749-5755.

Oeding V., Schlegel H.G. (1973) beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-b-hydroxybutyrate metabolism. *Biochem J.*, 134:239±48.

Pantazaki A.A., Papanephytous C.P., Pritsa A.G., Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis D.A., (2009). Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochem.*, 44: 847–853.

Patel M.K., Bastioli C., Marini L. & Wurdinger G.E. (2005). Life-cycle Assessment of Bio-based Polymers and Natural Fiber Composites Environmental Assessment of Bio-based Polymers and Natural Fibres, *Biopolymers online*, 21-24.

Povolo S., Romanelli M.G., Basaglia M., Ivanova Ilieva V., Corti A., Morelli A., Chiellini E., Casella S. (2013). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM1034 from structurally unrelated carbon sources. *New Biotech.*, 30: 629-634.

Povolo S., Romanelli M.G., Di Nunno D., Basaglia M., Casella S. (2012). Production of polyhydroxyalkanoates from fatty wastes. *J. Polym. Environ.*, 20: 944-949.

Povolo S., Toffano P., Basaglia M., Casella S. (2010a). Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Biosource Tecnology*, 101: 7902-7907.

Povolo S., Toffano P., Basaglia M., Casella S. (2010b). Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresour. Technol.*, 101: 7902-7907.

Povolo, S. & Casella, S. (2003). Bacterial production of PHA from Lactose and cheese whey permeate, *Macromolecular symposia*, 197:1-9.

Ramsay B., Ramsay J., Berger E., Chavarie C., Braunegg G. (1992). Separation of poly-beta-hydroxyalkanoic acid from microbial biomass. US patent, 5110980.

Ramsay B.A., Lomaliza K., Chavarie C., Dubé B., Bataille P., Ramsay J.A. (1990). Production of poly-(b hydroxybutyric-co-b-hydroxyvaleric) acids, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2093–2098.

Rehm B.H.A., Krüger N., Steinbüchel A. (1998). A new metabolic link between fatty acid de-novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis the phaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein coenzyme A transferase, *J. Biol. Chem.*, 273: 24044–24051.



- Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth K., Hartmann, R., Felber, H., Zinn M (2005). Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids, *Biomacromolecules*, 6: 2290–2298.
- Romanelli M.G., Povolò S., Favaro L., Fontana F., Basaglia M., Casella S. (2014). Engineering *Delftia acidovorans* DSM39 to produce polyhydroxyalkanoates from slaughterhouse waste. Special issue: Biodegradable biopolymers.
- Sang Y. L., Jong-il Choi (1999). Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management*, 19: 133±139.
- Schirmer A., Jendrossek D., Schlegel H.G. (1993). Degradation of poly(3- hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria. Purification and properties of a P(3HO) depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK13 biovar V. *Appl Environ Microbiol*; 59: 1220±7.
- Shin P.K., Kim M.H., Kim J.M. (1997). Biodegradability of degradable plastics exposed to anaerobic digested sludge and simulated land fill conditions. *J Environ Polym Degrad*, 5: 33±9.
- Solaiman D.K.Y., Ashby R.D, Foglia T.A. (2001). Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56: 664-669.
- Steinbüchel A., Lütke-Eversloh T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16: 81–96.
- Valentin H.E., Reiser S., Gruys K.J. (2000). Poly(3-hydroxybutyrate- co-4-hydroxybutyrate) formation from gamma-aminobutyrate and glutamate, *Biotechnol. Bioeng.*, 67: 291–299.
- Valentin HE, Broyles DL, Casagrande LA, Colburn SM, Creely WL, DeLaquil PA, Felton HM, Gonzalez KA, Houmiel KL, Lutke K, Mahadeo DA, Mitsky TA, Padgett SR, Reiser SE, Slater S, Stark DM, Stock RT, Stone DA, Taylor NB, Thorne GM, Tran M, Gruys KJ. (1999). PHA production, from bacteria to plants. *Int J Biol Macromol.* 25(1-3):303-6.
- Valentin H.E., Zwingmann G., Schönebaum A., Steinbüchel A. (1995). Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Eur. J. Biochem.*, 227: 43–609.
- Wang Y., Bian Y.Z., Wu Q., Chen G.Q. (2008). Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*, 29: 2858–2868.
- Xiao X.Q., Zhao Y., Chen G.Q. (2007). The effect of 3-hydroxybutyrate and its derivatives on the growth of glial cells. *Biomaterials*, 28: 3608–3616.
- Yamane T., Chen X.-F., Ueda S. (1996). Growth-associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a Methylophilic bacterium, *Paracoccus denitrificans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 380–384.

Yao Y.C., Zhan X.Y., Zou X.H., Wang Z.H., Xiong Y.C., Zhang J., Chen J., Chen G.Q. (2008). A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*, 29: 4823–4830.

Yasothe K., Aroua M.K., Ramachandran K.B. (2006). I.K.P. Tan. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration, *Biochem. Eng. J.*, 30: 260–268.

Young F.K., James R., Sheldon K. & May W. (1994). Microbial Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid from d-Xylose and Lactose by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11): 4195-4198.

Zafar S. & Owais M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*, *Biochemical Engineering Journal*, 27(3): 295-298.

Zhang X.J., Luo R.C., Wang Z., Deng Y., Chen G.Q. (2009). Applications of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuel. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/bm801424e.

Zlokarnik M. (1967). Suitability of stirrers for homogenization and mixing of liquid mixtures, *Chem. Ing. Technol.*, 39: 539–548 (in German).

Zou X.H., Li H.M., Wang S., Leski M., Yao Y.C., Yang X.D., Huang Q.J., Chen G.Q. (2009). The effect of 3-hydroxybutyrate methyl ester on learning and memory in mice. *Biomaterials*, 30: 1532–154.