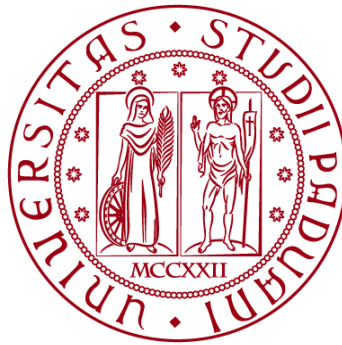


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

# **PRODUZIONE DI PHA DA MATERIALI DI SCARTO**

**Tutor: Prof. Stefano Mammi**  
**Dipartimento di Scienze Chimiche**

**Laureanda: Adele Motta**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

# INDICE

ABSTRACT .....	3
INTRODUZIONE .....	4
BIOPLASTICHE E PHA.....	6
2.1 Tipologie di bioplastica .....	6
2.2 PHA, struttura e proprietà .....	6
2.3 Produzione di PHA .....	7
2.4 Problemi legati alla produzione di PHA .....	9
MATERIALI DI SCARTO COME FONTE DI CARBONIO.....	10
3.1 Rifiuti agro-alimentari .....	10
3.1.1 Esperimento .....	10
3.1.2 Risultati e discussione .....	11
3.2 Rifiuti lattiero-caseari.....	14
3.2.1 Metodi e materiali .....	15
3.2.2 Risultati e discussione .....	17
3.3 Rifiuti dell'industria del biodiesel .....	19
3.3.1 Materiali e metodi .....	20
3.3.2 Risultati e discussione .....	20
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE .....	23
BIBLIOGRAFIA.....	24

## ABSTRACT

La gestione dei rifiuti creati dall'utilizzo della plastica non biodegradabile è un problema attuale che grava sull'ambiente e sulla salute umana. La percentuale di plastica riciclata rimane troppo bassa e i metodi di smaltimento correnti, come le discariche, non sono più sostenibili. Al problema dei rifiuti plastici si aggiunge quello dei rifiuti organici provenienti dalle industrie agro-alimentari e dai rifiuti urbani. La preoccupazione maggiore è rappresentata dagli sprechi di cibo che costituiscono una grande perdita di risorse e soldi.

Una possibile soluzione combinata a questi problemi è l'impiego di bioplastiche, in particolare PHA, prodotte a partire materiali di scarto utilizzati come fonte di carbonio.

I PHA sono bioplastiche bio-based e biodegradabili che vengono accumulate all'interno di microrganismi, sotto forma di granuli, a partire da processi fermentativi. Presentano proprietà intermedie fra il polietilene ed i poliesteri, però, per ora, i prezzi sul mercato non sono abbastanza competitivi per renderli un valido sostituto della plastica. Fra i fattori che rendono i PHA costosi abbiamo proprio i substrati carboniosi necessari per la sua sintesi.

In questa trattazione verranno esposti dei casi di produzione di PHA utilizzando rifiuti provenienti dall'industria agro-alimentare, dall'industria lattiero-casearia e dall'industria del biodiesel.

## INTRODUZIONE

I polimeri sono una parte essenziale dell'economia mondiale, in quanto il loro potenziale può essere sfruttato sia a livello domestico che industriale, come la plastica derivata dal petrolio. Visto che la domanda e la conseguente produzione di plastica aumentano continuamente ogni anno, questo grava enormemente sui combustibili fossili e sul consumo di petrolio (Bhatia *et al.*, 2021). Basti pensare che nel 2021 sono stati prodotti globalmente 390,7 milioni di tonnellate di plastica, di cui il 90,2 % era plastica di origine fossile, l'8,3 % era derivata da plastica riciclata e il restante 1,5 % erano plastiche bio-based (PlasticsEurope, 2022).

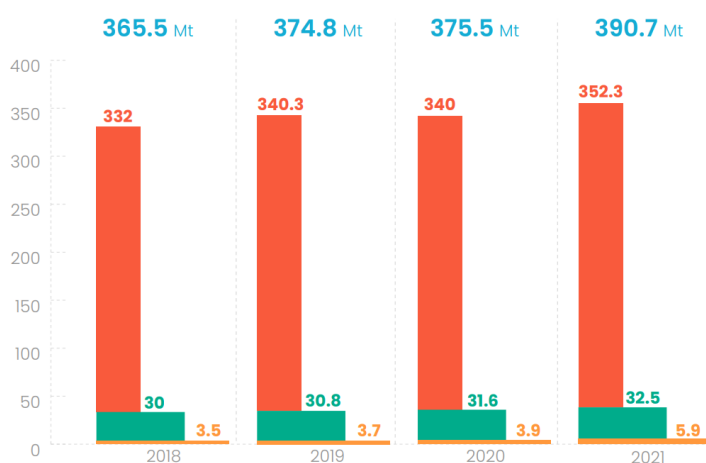


Figura 1: Produzione di plastica negli anni. In arancione fossil-based plastics, in verde post-consumer recycled plastics, in giallo bio-based plastics. Fonte: PlasticsEurope, 2022.

Solo una piccola percentuale della plastica viene riciclata, mentre la restante parte viene depositata nelle discariche o viene incenerita. Questi metodi di smaltimento sono associati a costi elevati e alla creazione di sottoprodotti tossici. In discarica la plastica andrà ad inquinare la terra e le falde acquifere attraverso la lisciviazione dei derivati tossici (Bhatia *et al.*, 2021) (Khatami *et al.*, 2021).

Le plastiche derivate dal petrolio hanno una bassa biodegradabilità e i loro processi di riciclaggio sono estremamente lenti e richiedono molto tempo (Khatami *et al.*, 2021). Quindi invecchiano tramite disintegrazione fisica e autossidazione foto catalizzata con conseguente formazione di micro e macro plastica (Bhatia *et al.*, 2021). Queste particelle, disperse nell'ambiente, portano a gravi conseguenze, come inquinamento, contaminazione della catena alimentare, spreco di energia, perdite economiche, pericolo per la biodiversità e aumento dell'impronta di carbonio nell'ambiente (Yadav *et al.*, 2020). Si stima che i detriti di plastica causino ogni anno oltre 13 miliardi di dollari di danni economici all'ecosistema marino. L'introduzione dei biopolimeri, però, ha mostrato qualche speranza di ridurre l'impatto negativo della plastica sull'ambiente (Bhatia *et al.*, 2021).

Un'altra preoccupazione dei giorni nostri sono gli sprechi di risorse, in particolare quelli alimentari. Infatti, l'organizzazione delle Nazioni Unite FAO (Food and

Agriculture Organization) ha riportato che ogni anno, a livello globale, circa 1,3 miliardi di tonnellate di cibo vanno perse o sprecate. Questa quantità di cibo corrisponde a un terzo di tutte le risorse alimentari prodotte per il consumo umano.

Tra le fonti di rifiuto alimentare abbiamo residui domestici, commerciali, industriali ed agricoli; la matrice compositiva dei rifiuti alimentari varia ampiamente in base alla fonte e al tipo. A livello della filiera alimentare viene generato in tutte le fasi: post-produzione, manipolazione/stoccaggi, produzione, vendita all'ingrosso/al dettaglio e consumo. Inoltre, lo spreco di cibo comporta una perdita sostanziale di altre risorse come il terreno coltivabile, l'acqua, l'energia e il lavoro. Ogni anno negli Stati Uniti vengono generati circa 567-726 milioni di tonnellate di rifiuti alimentari (equivalenti al 40 % della produzione alimentare totale). Questa quantità di cibo equivale a 218 miliardi di dollari, che può essere paragonata alla perdita energetica annuale di oltre 456.250 cal pro capite, sufficiente a sostenere un adulto di sesso maschile (apporto calorico giornaliero = 2500) per 180 giorni (Tsang *et al.*, 2019).

Più specificamente le perdite alimentari che si verificano alla fine della catena alimentare corrispondono allo "spreco alimentare" (food waste, FW), che dipende dal comportamento dei consumatori, dalle intenzioni di acquisto e dalla strategia di marketing dei rivenditori. In generale, la maggior parte dei rifiuti alimentari viene smaltita tramite discarica, compostaggio e fermentazione. Quando il FW viene smaltito in discarica produce risultati indesiderati, come le emissioni di gas serra e la contaminazione delle acque sotterranee. Pertanto, la valorizzazione degli scarti alimentari attraverso la produzione di prodotti a valore aggiunto, come le bioplastiche, può essere un utilizzo finale ideale e pratico per una maggiore sostenibilità globale. Negli ultimi anni sono stati compiuti enormi sforzi per convertire il FW in PHA in modo da riuscire a valorizzarlo (Tsang *et al.*, 2019).

Il contenuto di acqua degli sprechi alimentari varia generalmente dal 75 all'85 % in peso. La porzione di massa di sostanze organiche è del 60-70 % in peso. La Tabella 1 qui sotto riassume le proprietà del FW adatte alla produzione di bioplastiche e bioenergia. (Tsang *et al.*, 2019).

Order	Type of food waste	Potential materials	Characteristics
1	Used cooking oil	Palm oil, rapeseed oil, soybean, sunflower seed	High content of lipid (fat) can be converted into biodiesel (fatty acid methyl esters: FAMES)
2	Animal by-products	Blood, fats, residues from intestines	High nitrogen content or high levels of BOD and COD
3	Organic crop residues	Straw, stover, peels, fruit pomace	These fractions consist of important sources of sugars, lipids, carbohydrates, and mineral acids Provided water, soluble sugar, and cellulose Succinic acid production
4	Mixed domestic waste	Cheese whey, waste bread, nuts and nut shell	High content of protein, starch, fat and fatty acids

Tabella 1: Proprietà dei potenziali rifiuti alimentari applicati alla produzione di PHA. Fonte: (Tsang *et al.*, 2019)

# BIOPLASTICHE E PHA

Le bioplastiche sono una grande famiglia di materiali diversi con proprietà e applicazioni differenti. Un materiale bioplastico è definito tale se è bio-based, biodegradabile o presenta entrambe le caratteristiche.

Il termine "bio-based" indica che il materiale o il prodotto è derivato o parzialmente derivato dalla biomassa. Per biodegradazione intendiamo un processo biochimico in cui i microrganismi presenti in un ambiente specifico convertono i materiali iniziali in acqua, anidride carbonica e biomassa (European Bioplastics, 2022).

## 2.1 Tipologie di bioplastica

Fino ad oggi il mondo della ricerca ha sviluppato quattro vie scientifiche per produrre bioplastiche:

- Alterazione parziale dei polimeri presenti in natura (amido, cellulosa e pullulano)
- Produzione di monomeri attraverso tecniche di chimica convenzionale da materie prime ottenute con processi de novo o di fermentazione, dove la polimerizzazione avviene successivamente (PLA, polietilene)
- Produzione attraverso processi di coltura e adattamento di colonie microbiche isolate dall'ambiente naturale o sviluppate tramite ingegneria genetica (PHA, PHB)
- Produzione di materie plastiche a partire da polimeri parzialmente biodegradabili come il polibutilene tereftalato (PBT) (Yadav *et al.*, 2020).

Le bioplastiche sono tuttavia studiate e suddivise in tre gruppi principali:

- Le plastiche convenzionali generate da risorse fossili modificate in modo tale da risultare biodegradabili, come il PBAT,
- Le plastiche non biodegradabili e almeno parzialmente bio-based, tra cui il polietilene (PE) e le plastiche bio-based che hanno prestazioni tecniche ad esso simili come il politrimetilene tereftalato,
- Le plastiche che presentano la duplice caratteristica di essere bio-based e biodegradabili, ad esempio il PLA e PHA (Yadav *et al.*, 2020).

## 2.2 PHA, struttura e proprietà

I microrganismi possono accumulare PHA nel citoplasma, sotto forma di granuli di 0,2 e 0,5  $\mu\text{m}$ , fino al 97 % del peso secco delle cellule (CDW) e utilizzarlo come deposito di energia. Le condizioni necessarie per stimolare l'accumulo di PHA nel citoplasma batterico sono l'eccesso di fonti di carbonio, la limitazione di altri nutrienti cruciali, come azoto o fosforo, e talvolta le variazioni di pH. I PHA hanno somiglianze con i polimeri petrolchimici, però a differenza loro hanno un'elevata biodegradabilità e biocompatibilità. Il tempo necessario per la loro biodegradazione in condizioni standard è di circa 2 mesi (Khatami *et al.*, 2021).

La classificazione dei PHA si basa sul numero di atomi di carbonio presenti nei blocchi monomerici che li costituiscono. I PHA a catena corta (scl-PHA) hanno dai 3 ai 5 atomi di carbonio, mentre i PHA a catena media (mcl-PHA) vanno dai 6 ai 14

atomi di carbonio. Gli scl-PHA sono relativamente fragili e rigidi a causa della loro struttura cristallina (tipicamente 55-80 % di cristallinità), mentre gli mcl-PHA sono materiali gommosi ed elastici (Khatami *et al.*, 2021).

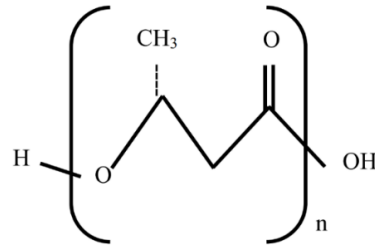


Figura 2: Struttura del poli-3-idrossibutirrato (P3HB), il tipo più comune di PHA. Fonte: (Tsang *et al.*, 2019)

## 2.3 Produzione di PHA

### Colture microbiche

Fra le diverse modalità di produzione di PHA abbiamo la crescita in colture pure. I microrganismi produttori comprendono un'ampia gamma di batteri gram-positivi e gram-negativi. Esistono 2 classificazioni dei batteri in relazione alla sintesi di PHA. Il primo gruppo richiede condizioni di stress come la limitazione o l'esaurimento di un nutriente essenziale (azoto, fosforo) mentre la fonte di carbonio è presente in abbondanza. A questo gruppo appartengono *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas oleovorans*. Il secondo gruppo invece non richiede la mancanza di nutrienti e i PHA possono essere accumulati durante la fase di crescita. Alcuni esempi sono *Escherichia coli* ricombinante e *Alcaligenes latus*, un ceppo mutante di *Azotobacter vinelandii* (Khatami *et al.*, 2021).

Le colture microbiche miste (MMC) sono comunità di microrganismi diversi che possono crescere insieme sullo stesso terreno di coltura (Tsang *et al.*, 2019). Nei processi di produzione di PHA, sono considerate superiori alle colture pure perché permettono di consumare un'ampia gamma di fonti di carbonio, necessitano di minori parametri di controllo del processo, minori costi operativi e di manutenzione dovuti alla mancanza di sterilità. Lo svantaggio è rappresentato dalle proprietà incoerenti dei biopolimeri ottenuti: a causa della diversità dei microrganismi presenti, ogni specie produce monomeri (e quindi PHA) diversi.

La comunità microbica è esposta a regimi alternati "feast", dove scarseggia la fonte di carbonio, e "famine" dove invece è abbondante. Durante la fase "famine" l'espressione degli enzimi associati alla crescita si riduce, poi quando le sostanze organiche diventano nuovamente accessibili i ceppi batterici capaci di immagazzinare PHA si trovano in una posizione superiore e diventano dominanti. In seguito avviene l'accumulo di PHA fino alla saturazione, ottenuto esponendo la biomassa a una fase "feast" prolungata, dove è presente il carbonio, mentre altri nutrienti (azoto, fosforo) vengono limitati. L'obiettivo della limitazione dei nutrienti è quello di spostare le vie metaboliche dalla crescita cellulare alla produzione di PHA (Khatami *et al.*, 2021).

## Vie metaboliche

I PHA vengono prodotti attraverso reazioni enzimatiche che convertono l'acetyl-CoA in polimeri di PHA, grazie all'azione delle PHA sintasi presenti nel citosol. La via biosintetica consiste di tre reazioni enzimatiche catalizzate da tre diversi enzimi (PhaA, PhaB, PhaC). I PHA possono essere sintetizzati anche attraverso la biosintesi de novo degli acidi grassi e le vie di  $\beta$ -ossidazione a partire da zuccheri e acidi grassi. Nella biosintesi de novo degli acidi grassi gli intermedi vengono dirottati verso la biosintesi di PHA catalizzata dalla PhaG. Se la fonte di carbonio viene ossidata attraverso la via di  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, la PhaJ catalizza la sintesi dell'(R)-3-idrossiacil-CoA, precursore diretto della biosintesi di PHA (Yadav *et al.*, 2020).

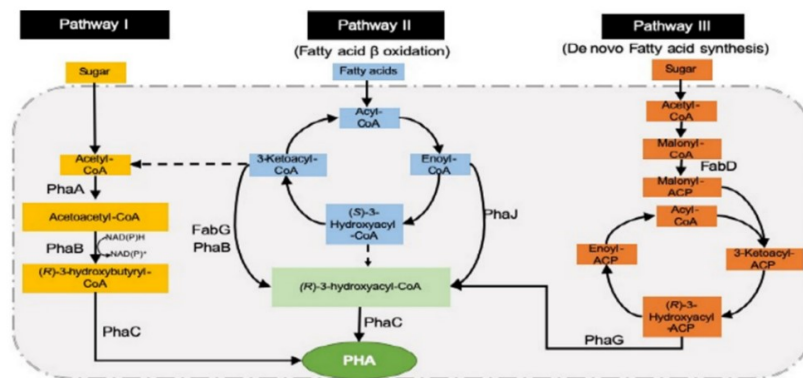


Figura 3: Le 3 principali vie metaboliche per la biosintesi dei PHA. Fonte: (Khatami *et al.*, 2021)

## Fermentazione

Esistono diversi processi fermentativi che possono essere distinti in discontinui e continui.

Tra i sistemi discontinui abbiamo:

- I sistemi batch sono colture a sistema chiuso contenenti una quantità iniziale limitata di nutrienti, sono semplici nel funzionamento ma di bassa produttività per la produzione di PHA (Stanbury, Whitaker and Hall, 2017).
- Le colture fed-batch sono inizialmente stabilite in modalità batch, poi vengono alimentate in modo continuo o sequenziale. Quando la concentrazione del substrato scende al di sotto del valore critico, questo viene aggiunto senza rimuovere il liquido di coltura. Per produrre PHA vengono anche utilizzate le colture fed-batch in ripetizione, fed-batch con riciclo delle cellule per la conservazione della biomassa e continuous fed-batch (Koller, 2018) (Stanbury, Whitaker and Hall, 2017).

I processi di produzione continua sono caratterizzati dal funzionamento in condizioni di "stato stazionario", in cui i parametri di processo come le concentrazioni di substrato e prodotto, ma anche fattori come il pH, la  $pO_2$ , il volume di lavoro, l'apporto di nutrienti, ecc. sono mantenuti costanti. Il substrato viene continuamente rifornito e l'aumento di volume viene compensato da un continuo prelievo di brodo di fermentazione. Esiste la configurazione a uno stadio



(poco produttiva per la sintesi di PHA), a due stadi e multi stadio (più adatti alla produzione di PHA)(Koller, 2018).

### **Downstream processes**

Dopo la produzione di PHA e la separazione della biomassa dal brodo, utilizzando tecniche come la sedimentazione, la centrifugazione e la flocculazione, bisogna estrarre il PHA dalla biomassa cellulare recuperata (Bhatia *et al.*, 2021). Per la scelta di una tecnica di recupero adeguata si devono considerare diversi parametri come: la composizione e il tipo di biopolimeri, il produttore di PHA, l'uso finale e le condizioni di purezza del prodotto, le spese e le considerazioni ambientali (Khatami *et al.*, 2021).

I metodi di recupero si possono classificare in due gruppi:

- Metodi di digestione in cui la biomassa viene sciolta per separare i granuli di PHA
- Estrazione diretta del PHA dalla biomassa utilizzando solventi adeguati.

La digestione può essere effettuata mediante trattamento chimico o enzimatico. L'NPCM viene disciolto, la parete cellulare viene disgregata mentre i granuli di PHA vengono conservati indenni e recuperati. Per la digestione chimica sono stati impiegati agenti ossidanti, come l'idrossido di sodio e l'ipoclorito di sodio, o acidi come l'acido solforico. La concentrazione della sostanza chimica utilizzata gioca un ruolo fondamentale, in quanto può non solo dissolvere l'NPCM ma anche degradare i PHA, portando a un basso recupero del polimero, a una diminuzione della purezza, del peso molecolare e della resistenza meccanica dei polimeri. Inoltre i prodotti chimici impiegati comportano un impatto ambientale negativo (Khatami *et al.*, 2021).

L'estrazione diretta con solvente è il metodo più diffuso e viene utilizzata quando si desidera un'elevata purezza dei polimeri. Comprende l'immersione della biomassa contenente PHA in un solvente o in una miscela di solventi per dissolvere i granuli, seguita dall'aggiunta di un agente precipitante per recuperare i polimeri in forma cristallina. Cloroformio e diclorometano, sono tipicamente utilizzati nella fase di dissoluzione. Quando si estraggono gli mcl-PHA, l'acetone è il solvente preferibile. Per la fase di precipitazione si utilizzano metanolo ed etanolo (Khatami *et al.*, 2021).

### **2.4 Problemi legati alla produzione di PHA**

La produzione commerciale di PHA è stata realizzata solo su scala limitata. Le principali materie prime utilizzate tuttora sono costose e non sempre sostenibili. I costi di produzione e il prezzo di mercato sono considerati i due principali fattori che potrebbero spostare la produzione di plastica dai prodotti petrolchimici a quelli bio-based. La fonte di carbonio e l'estrazione dei biopolimeri rappresentano rispettivamente il 40-48 % e il 30 % dei costi totali di produzione. Il prezzo di mercato dei polimeri PHA è di circa 5 euro al kg, quasi 6 volte superiore a quello dei prodotti a base di petrolio (0,8-1,5 euro al kg) (Khatami *et al.*, 2021).

## MATERIALI DI SCARTO COME FONTE DI CARBONIO

La fonte di carbonio costituisce quasi la metà dei costi di produzione di PHA, perché il suo accumulo è un processo aerobico. Pertanto, una quantità significativa del carbonio fornito viene utilizzata nella respirazione intracellulare, formazione di CO<sub>2</sub> e di metaboliti, mentre meno della metà viene consumata per la crescita cellulare e l'accumulo di PHA. Sono quindi necessari substrati accessibili e sostenibili, come sottoprodotti di scarto provenienti da differenti industrie. Di seguito verranno citati alcuni casi di studio (Khatami *et al.*, 2021).

### 3.1 Rifiuti agro-alimentari

Nel lavoro di Kovalcik *et al.* la vinaccia è stata usata come fonte di carbonio per la biosintesi di poli(3-idrossibutirrato) (PHB). La vinaccia è un sottoprodotto della produzione di vino e in Europa è presente in enormi quantità. Nel 2018 la produzione mondiale di vino è stata di circa 292 milioni di ettolitri. Si stima che circa il 25 % del peso dell'uva utilizzata nella produzione di vino, mosti e succhi sia costituito dalle vinacce (bucce, raspi e semi). La produzione di vino genera circa 11,1 milioni di tonnellate di vinaccia all'anno in tutto il mondo (Kovalcik *et al.*, 2020).

#### 3.1.1 Esperimento

##### Materiali di scarto

La vinaccia è stata raccolta dalla cantina Vavricek (Brezi u Mikulova, Cechia) durante l'autunno 2018; sono comprese due varietà bianche, il Veltliner verde e il Sauvignon Blanc. L'olio di caffè è stato isolato da fondi di caffè esausti dal laboratorio di ricerca. L'olio di colza fritto di scarto è stato raccolto nella mensa della Facoltà di Chimica dell'Università di Tecnologia di Brno.

Dalla vinaccia e dai semi d'uva macinati sono stati estratti i fenoli. I lipidi (olio d'uva) sono stati isolati dai semi d'uva macinati. I pigmenti dell'olio d'uva sono stati assorbiti su bentonite attivata con acidi. L'estratto di zucchero d'uva è stato preparato dalla vinaccia senza semi macinata attraverso idrolisi enzimatica. La lignina e la cellulosa sono state isolate dal materiale solido di riposo ricevuto dopo l'estrazione dell'olio e l'idrolisi enzimatica (Kovalcik *et al.*, 2020).

##### Produzione di PHA

Sono stati utilizzati i ceppi *Halomonas halophila* CCM 3662, *Halomonas organivorans* CCM 7142 e *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Le colture batteriche sono state coltivate su Complex Nutrient Medium e mantenute come colture crioconservate a - 80 °C in presenza del 17 (w/v) % di glicerolo. Le colture sono state effettuate in beute da 250 mL con deflettori contenenti 100 mL di terreno a base di sali minerali (MS). Tutti i terreni MS sono stati aggiustati con acqua distillata fino a 1 L. Gli zuccheri e l'estratto di zucchero d'uva, i terreni MS e la soluzione di microelementi sono stati sterilizzati in autoclave separatamente

(115 °C, 20 min), raffreddati e combinati asepticamente a temperatura ambiente. Prima dell'inoculo, il pH è stato regolato a 7 con NaOH. La coltivazione in batch in beute da 250 mL è stata impostata a 135 rpm e 30 °C (*C. necator*) o 37 °C (*H. halophila*, *H. organivorans*). Dopo 72 ore di coltivazione, le cellule sono state raccolte attraverso centrifugazione. Successivamente, è stata studiata la coltivazione nel fermentatore (2 L, Biostat B plus, Sartorius Stedim, Biotech, Germania). Le condizioni di coltivazione erano le seguenti: 1,35 L di terreno MS, 40 g L<sup>-1</sup> di zucchero d'uva liofilizzato, 150 mL di inoculo di *C. necator* coltivato per 24 ore in beute, alla temperatura di 30 °C, pH 7, 30 % DO (ossigeno disciolto), aerazione a 1,0 L min<sup>-1</sup>, tempo di coltura di 29,5 h. Durante la coltura sono stati prelevati 10 mL di campioni per la determinazione della biomassa e della concentrazione di PHB (Kovalcik *et al.*, 2020).

### **3.1.2 Risultati e discussione**

#### **Proprietà dei sottoprodotti isolati dalla vinaccia**

Sia la vinaccia che i semi contengono un'elevata quantità di lignina, una quantità relativamente alta di zuccheri e una bassa quantità di lipidi, proteine e fenoli. La composizione dell'estratto di zucchero d'uva differiva dalla vinaccia secca originale a causa della quantità di composti estratti durante il processo di idrolisi enzimatica. Le principali differenze si riscontrano nel contenuto di zuccheri dovuto all'idrolisi del materiale celluloso. L'estrazione dell'olio dai semi d'uva ha prodotto 4,2 g di olio per 100 g di semi. Le rese in olio dipendono dalla varietà e dalla maturità dell'uva, oltre che dal metodo di estrazione dell'olio. (Kovalcik *et al.*, 2020).

#### **Applicazione dell'olio di semi d'uva come substrato di carbonio degli acidi grassi per la produzione di PHB**

Il fatto che l'olio estratto dai semi d'uva sia un sottoprodotto di scarto e non interferisca con la catena alimentare umana ne fanno una scelta vantaggiosa per la produzione di PHB. L'utilizzo dell'olio di semi d'uva come substrato è stato confrontato con altri oli di scarto effettuando una coltivazione in beute per 72 h. I risultati degli esperimenti di coltivazione di *C. necator* H16 in terreni di coltura con olio di scarto di frittura, olio estratto da fondi di caffè esausti e olio di semi d'uva sono elencati nella Tabella 2. I risultati indicano che la crescita della coltura batterica è parzialmente stimolata dalla presenza di acidi grassi liberi nei terreni di coltura, poiché la CDW (Cell Dry Weight) aumenta con il valore acido dell'olio, il che è in accordo con la letteratura poiché è stato riportato che gli acidi grassi liberi agiscono come emulsionanti e, quindi, aumentano la disponibilità di substrato lipidico per la coltura batterica. Le rese di PHB sono state molto simili per tutti gli oli testati (nell'intervallo tra 6,1 g L<sup>-1</sup> e 6,5 g L<sup>-1</sup>), il che dimostra che l'olio di semi d'uva è, in termini di idoneità alla produzione di PHA, paragonabile agli oli di scarto, identificati come substrati molto promettenti per la produzione industriale di PHA (Kovalcik *et al.*, 2020).

Carbon source	CDW(g l <sup>-1</sup> )	PHB content(wt %)	PHB(g l <sup>-1</sup> )	PHB volumetric productivity (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Acid value
Purified grape seeds oil	8.3 ± 0.1	76.8 ± 5.8	6.4 ± 1.9	0.117	1.5
Spent coffee grounds oil	10.0 ± 0.4	65.3 ± 1.0	6.5 ± 0.7	0.081	14.3
Waste fried sunflower oil	8.6 ± 0.2	70.4 ± 2.4	6.1 ± 0.1	0.075	3.2
CDW - cell dry weight.					

Tabella 2: Coltivazione di *C. necator* H16 in terreni di coltura per 72 h con oli esausti. Fonte: (Kovalcik et al., 2020)

## Produzione di PHB da estratto di zucchero d'uva

In un altro esperimento, l'estratto di zucchero d'uva è stato testato come fonte di carbonio per *C. necator*, *H. halophila* e *H. organivorans*. L'estratto di zucchero d'uva liofilizzato conteneva il 33,2 % di fruttosio, il 28,4 % di glucosio e il 38,4 % di altre sostanze, tra cui composti pectici, acidi organici e fenoli. *H. halophila* e *H. organivorans* possono utilizzare saccarosio, fruttosio e glucosio come fonte di carbonio. *Cupriavidus necator* H16 è in grado di metabolizzare il fruttosio, la sua capacità di utilizzare il glucosio è limitata, meno produttiva e richiede un adattamento a questo zucchero. Nella Tabella 3 è messa a confronto, nei diversi ceppi batterici, la produzione di PHB con l'estratto di zucchero d'uva con la produzione di PHB con gli zuccheri (20 g L<sup>-1</sup>). Quando è stato utilizzato l'estratto di zucchero d'uva, i titoli finali di PHB erano inferiori di circa il 46-65 % rispetto all'utilizzo di zuccheri puri. Una produzione così bassa del polimero da parte di *C. necator* era attesa perché questo batterio era in grado di utilizzare prevalentemente il fruttosio (il glucosio viene utilizzato con un'efficienza inferiore) e la sua concentrazione non era sufficientemente alta. Entrambi i ceppi di *Halomonas* hanno ottenuto titoli di PHB bassi, che hanno rivelato capacità superiori di produzione di PHB su substrati puri. È probabile che gli inibitori microbici specifici presenti nell'estratto di vinaccia, come i composti fenolici, limitino parzialmente la crescita e la produzione di PHB in entrambi i ceppi batterici.

Bacteria	Carbon source	CDW(g l <sup>-1</sup> )	PHB (wt %)	PHB (g l <sup>-1</sup> )	PHB volumetric productivity(g l <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )
<i>H. halophila</i> <i>H. organivorans</i>	GlucoseGrape sugar extract	5.1 3.1	72.5 ± 0.957.0 ± 1.0	3.7 ± 0.61.8 ± 0.6	0.051 0.025
	Glucose	6.0	66.0 ± 9.2	3.9 ± 8.2	0.054
<i>C. necator</i>	Grape sugar extract	3.9	55.4 ± 1.4	2.1 ± 0.4	0.029
	Fructose	8.9	61.6 ± 1.2	5.5 ± 0.5	0.076
	Grape sugar extract	4.1	47.2 ± 2.1	1.9 ± 1.5	0.026

The cells were cultivated in Erlenmeyer flasks; the total carbon source concentration was 20 g l<sup>-1</sup> at 30 °C, 180 rpm, 72 h of cultivation.

Tabella 3: Confronto della produzione di PHB utilizzando 20 g L<sup>-1</sup> di estratto di zucchero d'uva, glucosio o fruttosio da parte di diversi ceppi batterici. Fonte: (Kovalcik et al., 2020).

Successivamente, nelle 72 ore di coltura ad intervalli di 24 ore, è stata studiata l'influenza di una maggiore concentrazione di estratto di zucchero d'uva nel terreno di coltura. La quantità di PHB nel terreno con 20 g L<sup>-1</sup> di estratto di zucchero d'uva è diminuita dopo il terzo giorno di coltivazione, quindi le cellule batteriche, probabilmente, hanno utilizzato il PHB accumulato come fonte di carbonio quando il fruttosio era esaurito. Al contrario, nel terreno con 20 g L<sup>-1</sup> di fruttosio puro, la concentrazione di PHB è aumentata nel tempo. Poiché la quantità di fonte di carbonio era insufficiente per *C. necator* con 20 g L<sup>-1</sup> di

zucchero d'uva, nell'esperimento successivo è stata aumentata a 50 g L<sup>-1</sup>. È stato raggiunto un titolo di PHB più alto (Fig. 4), però paragonabile a quelli ottenuti con 20 g L<sup>-1</sup> di fruttosio puro.

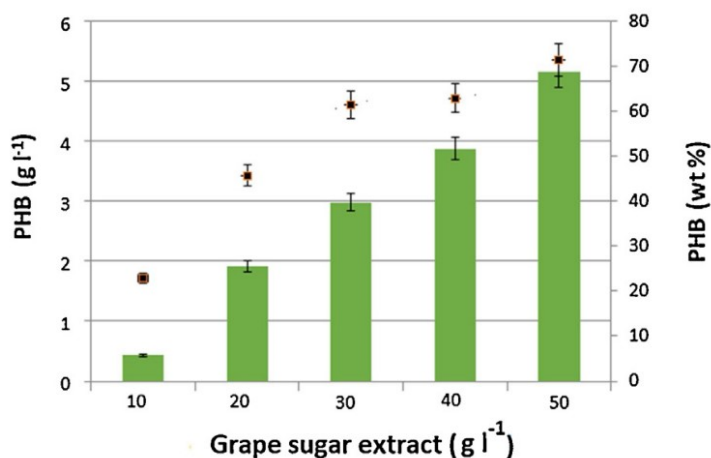


Figura 4: Accumulo di PHB da parte di *C. necator* in terreni con 10- 50 g L<sup>-1</sup> di estratto di zucchero d'uva.  
Fonte: (Kovalcik et al., 2020)

La produzione di PHB dall'estratto di zucchero d'uva è stata testata anche nel bioreattore da laboratorio da 2 L utilizzando la modalità di crescita batch. Per la coltura di *C. necator* nel reattore, abbiamo utilizzato l'estratto di zucchero d'uva alla concentrazione di 40 g L<sup>-1</sup>, poiché questa concentrazione di substrato ha fornito elevate rese di PHB e il M<sub>w</sub> (peso molecolare) del polimero è stato il più alto. Un ulteriore aumento della concentrazione dell'estratto di zucchero a 50 g L<sup>-1</sup> ha aumentato parzialmente i titoli di PHB (Fig. 4), ma ha diminuito sostanzialmente il M<sub>w</sub> del polimero (Tab. 4). Questa diminuzione potrebbe essere attribuita all'elevata forza ionica del terreno di coltura quando si utilizzano quantità elevate di estratto di zucchero, che potrebbe influenzare il M<sub>w</sub> del polimero. La coltivazione di 29,5 ore con 40 g L<sup>-1</sup> di estratto di zucchero d'uva come substrato di carbonio ha prodotto 8,3 g L<sup>-1</sup> di biomassa con il 63,0 % in peso di PHB, ottenendo una resa in PHB di 5,2 g L<sup>-1</sup> e una produttività volumetrica di PHB di 0,176 g L<sup>-1</sup> ora<sup>-1</sup> (Kovalcik et al., 2020).

### Caratterizzazione dei polimeri prodotti

La Tabella 4 mostra il peso molecolare dei campioni di PHB sintetizzati utilizzando olio d'uva, olio esausto di fondi di caffè, olio fritto di scarto, fruttosio ed estratto di zucchero d'uva. La concentrazione della fonte di carbonio influenza in modo significativo il peso molecolare del PHB. La via di sintesi metabolica utilizzata da *C. necator* si attiva principalmente quando manca l'azoto (o il fosforo) e la fonte di carbonio è presente in eccesso. Inoltre, il valore di M<sub>w</sub> è probabilmente influenzato dal rapporto tra l'attività della PHA sintasi e della PHA depolimerasi. Se le cellule dispongono di una quantità sufficiente di substrato esterno, sintetizzano un polimero con un M<sub>w</sub> più elevato. Se c'è una limitazione parziale da parte del substrato, la PHA depolimerasi si attiva, i granuli di PHA vengono utilizzati e quindi il M<sub>w</sub> del polimero accumulato diminuisce. Oltre alla disponibilità delle fonti di carbonio, anche altri parametri possono influenzare il peso

molecolare del polimero. Recentemente è stato riportato che il monomero 3HB del PHB funge da soluto compatibile che protegge le cellule batteriche dall'effetto dannoso della pressione osmotica. Pertanto, si può ipotizzare che l'applicazione della più alta concentrazione di estratto di zucchero d'uva ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) abbia indotto una strategia di adattamento allo stress delle cellule, accompagnata da un aumento dell'attività depolimerasica intracellulare per ottenere il 3HB protettivo. Tale processo è collegato a una parziale diminuzione del  $M_w$  del PHB. Il PHB sintetizzato con oli diversi ha raggiunto un  $M_w$  compreso tra 113,6 kDa e 238,8 kDa. Il  $M_w$  del PHB accumulato in *C. necator* utilizzando fruttosio era molto più alto e raggiungeva i 479,4 kDa. La ragione dei diversi valori di  $M_w$  ottenuti su zuccheri e lipidi può essere il fatto che il glicerolo presente nei lipidi è noto per ridurre il peso molecolare del PHB. I valori di  $M_w$  del PHB sintetizzato con estratto di zucchero d'uva variano fortemente con la concentrazione della fonte di carbonio. Il PHB sintetizzato con  $40 \text{ g L}^{-1}$  di estratto di zucchero d'uva in beuta o in bioreattore ha raggiunto rispettivamente 500,5 kDa e 512,2 kDa. Tutti i campioni sintetizzati hanno una distribuzione del peso molecolare molto stretta. Le proprietà del peso molecolare influenzano la stabilità termica e le proprietà meccaniche dei campioni di PHB; pertanto, solitamente si preferiscono campioni con peso molecolare più elevato e una distribuzione del peso molecolare stretta (Kovalcik *et al.*, 2020).

Sample	Cultivation	Substrate	$M_w$ (kDa)	$\text{Đ}$
PHB – grape oil	Erlenmeyer flasks	$20 \text{ g L}^{-1}$ Grape oil	$238.7 \pm 16.9$	$1.05 \pm 0.01$
PHB – SCG oil	Erlenmeyer flasks	$20 \text{ g L}^{-1}$ Spent coffee grounds oil	$113.6 \pm 15.4$	$1.13 \pm 0.03$
PHB – W-oil	Erlenmeyer flasks	$20 \text{ g L}^{-1}$ Waste fried sunflower oil	$238.8 \pm 36.4$	$1.07 \pm 0.01$
PHB – Fructose	Erlenmeyer flasks	$20 \text{ g L}^{-1}$ Fructose	$479.4 \pm 19.7$	$1.02 \pm 0.01$
PHB – G- extract	Erlenmeyer flasks	$10 \text{ g L}^{-1}$ Grape sugar extract	$252.4 \pm 21.2$	$1.02 \pm 0.01$
PHB – G- extract	Erlenmeyer flasks	$20 \text{ g L}^{-1}$ Grape sugar extract	$267.3 \pm 37.8$	$1.03 \pm 0.01$
PHB – G- extract	Erlenmeyer flasks	$30 \text{ g L}^{-1}$ Grape sugar extract	$337.6 \pm 42.3$	$1.04 \pm 0.02$
PHB – G- extract	Erlenmeyer flasks	$40 \text{ g L}^{-1}$ Grape sugar extract	$500.5 \pm 2.8$	$1.02 \pm 0.01$
PHB – G- extract	Erlenmeyer flasks	$50 \text{ g L}^{-1}$ Grape sugar extract	$374.0 \pm 21.1$	$1.05 \pm 0.01$
PHB – G-extract	2-L Bioreactor	$40 \text{ g L}^{-1}$ Grape sugar extract	$512.2 \pm 8.8$	$1.16 \pm 0.11$

Tabella 4: Proprietà del peso molecolare del PHB accumulato da *C. necator* utilizzando diverse fonti di carbonio. Fonte: (Kovalcik *et al.*, 2020)

### 3.2 Rifiuti lattiero-caseari

Il siero del latte è un sottoprodotto della produzione di formaggio e caseina durante la lavorazione del latte. La produzione annuale globale di siero di formaggio è di circa 120 milioni di tonnellate. L'Italia è tra i primi cinque produttori di formaggio in Europa e, di conseguenza, vengono prodotti grandi volumi di siero di formaggio e di rifiuti correlati. La produzione di ricotta è l'approccio più comune per l'utilizzo del siero di latte nelle industrie lattiero-casearie, grazie al suo costo di investimento relativamente basso. Durante la produzione della ricotta viene generato un sottoprodotto liquido, il "siero di secondo formaggio" (SCW). L'ultrafiltrazione del siero di formaggio è un altro processo largamente utilizzato dalle industrie casearie italiane da cui si ottiene il permeato di siero di formaggio (CWP). A causa dell'elevato contenuto di acqua, il CWP è difficile da trasportare dalla fonte ai centri di pretrattamento; pertanto, si applica un processo di evaporazione per ridurre il volume trasportabile (CCWP). Grazie all'elevato contenuto di lattosio, il SCW e il CCWP, possono essere considerati materie prime promettenti per la produzione di PHA.

Il lavoro di Colombo et al. integra la generazione di H<sub>2</sub> e PHA da due flussi di rifiuti lattiero-caseari (SCW e CCW) attraverso la 'dark fermentation'. In questo elaborato verrà esposto più nel dettaglio la produzione di PHA (Colombo *et al.*, 2019).

### 3.2.1 Metodi e materiali

Il siero di secondo formaggio è stato raccolto da un'industria casearia di Brugherio mentre il permeato di siero di formaggio concentrato da un'industria di trattamento del siero di formaggio di Brescia. I due flussi di rifiuti sono stati sottoposti a una fase di idrolisi enzimatica per convertire il lattosio in zuccheri più fermentabili (glucosio, galattosio). Per evitare qualsiasi potenziale interferenza del particolato con la reazione enzimatica l'SCW è stato centrifugato (8000 g, 15 min, 24 °C). Il CCWP aveva un basso contenuto di solidi sospesi, quindi è stato utilizzato nella sua forma grezza. Per facilitare l'idrolisi del lattosio, a SCW e CCWP è stata aggiunta una soluzione tampone di 1 mol L<sup>-1</sup> di acetato, in modo da raggiungere un pH di 4,5 per reazioni enzimatiche ottimali. L'enzima utilizzato è stata la β-galattosidasi di *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, USA) in una proporzione di 16 mg per g di lattosio. Successivamente, le soluzioni miscelate sono state poste su un agitatore a 150 rpm per 10 ore a una temperatura di 30 ± 1 °C. Al termine dell'idrolisi, i due substrati sono stati congelati (Colombo *et al.*, 2019).

#### Dark fermentation

Sono stati preparati sei reattori CSTR, ad agitazione continua, in scala di laboratorio in condizioni termofile (55 °C). L'inoculo utilizzato era digestato anaerobico prelevato da un digestore anaerobico alimentato con insilati di mais e gestito in condizioni termofile. L'inoculo è stato pretrattato termicamente (1 ora a 100 °C) per isolare i batteri sporoformi. I sei reattori sono stati fatti funzionare in modalità batch per tre giorni, utilizzando glucosio puro come fonte di carbonio per acclimatare i batteri produttori di idrogeno; successivamente i reattori sono stati alimentati con SCW e CCWP. Il rapporto inoculo/alimentazione era di 2:1, in cui 1 L di inoculo è stato aggiunto a 0,5 L di soluzione di glucosio regolata con una soluzione di nutrienti misti, mantenendo il rapporto C/N intorno a 30 e il pH a 5,5. Dopo essere stati riempiti, i reattori sono stati sigillati e lo spazio di testa (2,5 L) è stato flussato con N<sub>2</sub> per garantire condizioni anaerobiche. Durante la fermentazione, il pH è stato mantenuto nell'intervallo compreso tra 5,5-5,8 mediante l'aggiunta di KOH (3 M) per inibire la crescita di batteri metanogeni, che potrebbero consumare idrogeno. Dopo la modalità batch, è iniziata l'alimentazione continua dei reattori. I primi due reattori sono stati alimentati con siero di latte secondario idrolizzato (HySCW), mentre altri due con permeato di siero di latte idrolizzato e concentrato (HyCCWP). I restanti due reattori sono stati alimentati con glucosio puro per fungere da trattamenti di controllo (CTRL). A ogni intervallo di alimentazione, è stata aggiunta una porzione di inoculo fresco (50 mL d<sup>-1</sup>) per mantenere stabile l'attività microbica. L'HRT (Hydraulic retention time) è stato di 2 giorni per tutti i sei reattori sperimentali, mentre i tre tassi di carico organico sono stati aumentati del 38 % del contenuto in zuccheri: 8 g di zuccheri

$L^{-1} d^{-1}$  (15 g di COD  $L^{-1}$ ), 11 g di zuccheri  $L^{-1} d^{-1}$  (20,8 g di COD  $L^{-1}$ ) e 15,2 g di zuccheri  $L^{-1} d^{-1}$  (28,7 g di COD  $L^{-1}$ ), corrispondenti a OLR-I, OLR-II e OLR-III (Organic Loading Rate). Dopo aver ottenuto la produzione costante di  $H_2$  (8° giorno), è iniziato il test dell'OLR per ciascun substrato, mantenendo lo stesso OLR per 10 giorni, ottenendo così un periodo di fermentazione combinato di 41 giorni per ciascun substrato. I campioni di effluente (SCW e CCWP), contenenti una quantità significativa di acidi organici (OA), sono stati conservati e congelati per il successivo impiego nella sintesi di PHA (Colombo *et al.*, 2019).

### **Pretrattamento di SCW e CCWP fermentati**

Inizialmente i substrati sono stati sottoposti a centrifugazione (20.000 g) per 15 minuti a temperatura ambiente per rimuovere i solidi in sospensione, poi sono stati raccolti solo i surnatanti. Per la prima fase di produzione di PHA, i surnatanti sono stati diluiti con acqua deionizzata ed è stato aggiunto  $NH_4Cl$  per mantenere il rapporto C:N pari a 10 e il carico organico pari a circa 1.500 mg COD  $L^{-1}$ . Nella seconda fase, i surnatanti sono stati diluiti fino a raggiungere un carico organico finale pari a 7.500 mg COD  $L^{-1}$ . Non è stata aggiunta ammoniaca, poiché la mancanza di N può determinare una maggiore conversione del carbonio in PHA a causa della limitazione della crescita cellulare (Colombo *et al.*, 2019).

### **Produzione di PHA**

La produzione di PHA è stata realizzata in un processo a due fasi mediante l'utilizzo di una coltura microbica mista (MMC). Nella prima fase sono stati selezionati da una MMC i batteri che immagazzinano PHA, mentre la seconda fase ha consentito la produzione di PHA utilizzando la coltura microbica selezionata. Sono stati eseguiti due processi di produzione di PHA, alimentando la MMC con SCW fermentato (SBR 1) e utilizzando poi il CCWP fermentato come substrato (SBR 2). Per selezionare i batteri produttori di PHA è stato utilizzato un inoculo rappresentato da fanghi attivi (8 g di solidi sospesi totali-TSS  $L^{-1}$ ) prelevati da un impianto di trattamento delle acque reflue. Per arricchire la popolazione batterica produttrice di PHA è stato utilizzato un reattore Sequencing Batch (SBR) con un volume di lavoro di 1 L, applicando una strategia di alimentazione dinamica aerobica (ADF). L'andamento della selezione è stato monitorato attraverso la misurazione della concentrazione di ossigeno disciolto (DO) per determinare la durata della fase "feast", in cui si verificava una crescita attiva dei batteri produttori di PHA. Durante la selezione dei batteri, sono stati utilizzati 500 mL di fanghi attivi come inoculo alimentato per ogni ciclo con 500 mL del flusso fermentato. Per valutare le prestazioni del processo di selezione, l'SBR è stato monitorato una volta per ogni SRT (Solid Retention Time). L'accumulo di PHA è stato ottenuto mediante saggi fed-batch eseguiti in un reattore di vetro da 500 mL di volume di lavoro, con aerazione e agitazione continua. I flussi fermentati sono stati aggiunti a 200 mL di coltura arricchita (almeno 3 SRT dall'inizio della selezione) con un metodo di alimentazione a impulsi. La concentrazione di ossigeno disciolto (DO) nel terreno di coltura è stata monitorata in continuo e, quando la DO è aumentata fortemente, i flussi fermentati sono stati immessi nel



reattore. Il substrato totale aggiunto è stato calcolato considerando che il rapporto carbonio/microrganismi doveva essere uguale a quello all'interno del reattore di selezione, interrompendo i test quando non si osservava alcuna variazione di DO dopo che il substrato era stato alimentato. Per i test di accumulo, le condizioni operative utilizzate erano quelle adottate nel reattore di selezione, temperatura di  $21 \pm 1$  °C, aerazione di  $6 \text{ L min}^{-1}$  e agitazione a 110 rpm. La biomassa ottenuta dal processo di selezione è stata sottoposta a test di accumulo utilizzando lo stesso substrato come fonte di carbonio e per ogni SBR sono stati eseguiti due test di accumulo in doppio (Colombo *et al.*, 2019).

### 3.2.2 Risultati e discussione

#### Produzione di acidi organici

I principali OA prodotti dalla 'dark fermentation' di HySCW e HyCCWP sono stati acetato, n-butirrato e quantità minori di lattato. La resa in acetato ottenuta da HySCW è stata del 49,7-54,7% degli OA totali e del 45,3-48,4% per HyCCWP, valori da confrontare con il 16,8-24,4% degli OA totali ottenuti dal glucosio puro (controllo). Il n-butirrato ottenuto durante la fermentazione al buio di HySCW e HyCCWP era nell'intervallo 18,6-36,3% e 42,9-49,8% degli OA totali, rispetto al 14,6-16,1% ottenuti dal controllo (Tab. 5). Come previsto, l'aumento dell'OLR ha comportato un incremento della produzione di acidi organici per tutti i substrati. I valori massimi di OA totali sono stati ottenuti per OLR-III. Durante questo periodo, gli OA totali prodotti (in media) sono stati di  $12,1 \pm 0,5 \text{ g OAs L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  controllo,  $14,6 \pm 3,2 \text{ g OAs L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  HySCW e  $12,6 \pm 1,3 \text{ g OAs L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  HyCCWP. Inoltre la composizione in acidi organici dei due flussi fermentati è rimasta abbastanza stabile per i tre OLR (metà butirrato e metà acetato per HyCCWP ed acetato seguito da butirrato e lattato per HySCW), a parte l'OLR-I in cui l'HySCW fermentato ha mostrato una maggiore presenza di acido lattico. La miscela di OA ottenuta da OLR-III, grazie alla più alta concentrazione di acidi organici, è stata ritenuta un buon precursore per i batteri produttori di PHA (Colombo *et al.*, 2019).

	OLR-I (8 g sugars $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )			OLR-II (11 g sugars $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )			OLR-III (15.2 g sugars $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )			
	Control <sup>a</sup>	HySCW <sup>b</sup>	HyCCWP <sup>c</sup>	Control	HySCW	HyCCWP	Control	HySCW	HyCCWP	
<b>Organic acids</b>										
Net Total OAs	$\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$7.15 \pm 0.57$	$7.83 \pm 2.5$	$6.89 \pm 3.4$	$10.6 \pm 1$	$8.87 \pm 2.04$	$7.76 \pm 0.93$	$12.1 \pm 0.5$	$14.6 \pm 3.2$	$12.6 \pm 1.3$
Total OAs	$\text{mmol L}^{-1}$	$86 \pm 26a$	$97 \pm 15A$	$94 \pm 7a$	$131 \pm 26ab$	$119 \pm 10A$	$105 \pm 17a$	$184 \pm 35b$	$203 \pm 30B$	$169 \pm 4b$
Formate	% OAs (mmol basis)	$2.1 \pm 0.6$	$3.1 \pm 0$	$3.2 \pm 1.3$	$8 \pm 2$	$0$	$2.8 \pm 0.8$	$7.8 \pm 1.1$	$2.5 \pm 0.5$	$2.4 \pm 0.5$
Acetate		$17.5 \pm 9.5$	$52.5 \pm 6.2$	$45.4 \pm 3.7$	$16.8 \pm 1.5$	$49.7 \pm 1.9$	$45.3 \pm 9.9$	$24.4 \pm 4.9$	$54.7 \pm 8.4$	$48.4 \pm 0.6$
Propionate		$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$
Isobutyrate		$0$	$0$	$7.5 \pm 0.9$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$
n-butyrate		$14.6 \pm 7.5$	$18.6 \pm 3$	$42.9 \pm 1$	$16.1 \pm 3.3$	$34.9 \pm 4.3$	$49.8 \pm 4.6$	$14.9 \pm 5$	$36.3 \pm 5.4$	$49.1 \pm 1.4$
Isovalerate		$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$	$0$
Lactate		$65.7 \pm 12.9$	$25.8 \pm 6.4$	$1.1 \pm 0$	$59.1 \pm 13$	$15.4 \pm 2.5$	$2 \pm 0.7$	$52.9 \pm 22.3$	$6.5 \pm 0.6$	$0$

The statistics are based on a One-Way ANOVA with emphasis on the effect of change in OLRs and the statistical differences were computed using Post hoc Tukey Tests analysis.

<sup>a</sup> Control: glucose fed reactor.

<sup>b</sup> HySCW: hydrolysed second cheese whey.

<sup>c</sup> HyCCWP: hydrolysed concentrated cheese whey permeate.

<sup>\*</sup> Averages followed by the same letter are not statistically different for a  $p < 0.05$  (italic lower case letters for CTRL; capital letters for HySCW; lowercase letters for HyCCWP).

Tabella 5: Produzione di acidi organici (OAs) per i diversi tassi di carico organico (OLR). Fonte: (Colombo *et al.*, 2019)

#### Produzione di PHA

Dopo essere state trattate, le due frazioni liquide fermentate provenienti dalla 'dark fermentation' (OLR-III) sono state utilizzate come substrati per selezionare i

batteri accumulatori di PHA a partire da un fango attivo. Il rapporto F/F, rapido indicatore dell'arricchimento dei batteri accumulatori di PHA, è stato in media di 0,07 per SBR1 e 0,08 per SBR2, tranne per i primi cicli in cui la MMC si stava adattando alle nuove condizioni di crescita. I valori medi erano al di sotto di 0,33, limite superiore di F/F per mantenere buone condizioni per la selezione dei batteri accumulatori PHA nell'SBR.

Durante la fase 'feast' in entrambi i SBR, il tasso di accumulo specifico di PHA è stato superiore al tasso di crescita microbica specifico, indicando un consumo preferenziale della fonte di carbonio per la biosintesi di PHA piuttosto che per la crescita batterica. Riguardo l'accumulo di PHA, anche se le prove eseguite con CCWP hanno presentato una quantità iniziale di PHA maggiore rispetto a quelle eseguite con SCW, entrambe le MMC selezionate con SCW e CCWP fermentato hanno mostrato prestazioni simili. Entrambe hanno riportato una resa di stoccaggio del PHA sugli acidi organici consumati, come media dei quattro test di accumulo eseguiti, di  $0,78 \pm 0,2$  mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>OA-cons.</sub>, che era circa il 10-20 % superiore alla resa di stoccaggio del PHA sul COD totale consumato (media di  $0,72 \pm 0,21$  mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>cons.</sub>). Per quanto riguarda la resa di accumulo di PHA sul substrato alimentato, i due consorzi microbici selezionati hanno riportato risultati analoghi, cioè in media  $0,74 \pm 0,14$  mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>OA-in</sub> e  $0,45 \pm 0,13$  mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>in</sub>, riferiti rispettivamente agli acidi organici e al COD alimentato (Tab. 6).

Substrate	PHA content end test <sup>a</sup>	Polymer composition <sup>b</sup>	-q <sub>COD</sub> <sup>c</sup>	q <sub>PHA</sub> <sup>d</sup>	PHA Yield <sup>e</sup>	PHA Yield <sup>f</sup>	PHA Yield <sup>g</sup>	PHA Yield <sup>h</sup>	PHA Yield <sup>i</sup>	PHA Yield <sup>j</sup>	Ref.
FSCW <sup>k</sup>	62 ± 4.5	100:0	644.04 ± 109.7 40.55 ± 0.09	471.60 ± 92.1 90.42 ± 0.08	0.84 ± 0.28 0.88 ± 0.30	0.77 ± 0.14	0.75 ± 0.17	0.46 ± 0.10	682 ± 130	274 ± 60	This study
FCCWP <sup>l</sup>	55.1 ± 1.3	100:0	437.80 ± 78.83 0.37 ± 0.07	350.00 ± 69.3 90.31 ± 0.06	0.82 ± 0.13 0.87 ± 0.14	0.72 ± 0.14	0.69 ± 0.26	0.45 ± 0.16	567 ± 210	268 ± 100	This study
FCW <sup>m</sup>	~32	87:13	-	-	-	-	-	-	-	-	Oliveira et al. (2017)
FCW1	65.9 ± 4.6	100:0	-	-	0.86 ± 0.07 OA contain also ethanol (13% C mol)	-	-	-	-	-	Colombo et al. (2016)
FCW2	81.4 ± 5.7	60:40	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	-	-	-	-	-	Colombo et al. (2016)
FCW	-	85 ± 2:15 ± 2	227	106	0.4	-	-	-	-	-	Valentino et al. (2015)
FCW	65	81:19	-	-	0.67 ± 0.13	-	-	-	-	-	Duque et al. (2014)
			0.45 ± 0.07	0.3 ± 0.06	-	-	-	-	-	-	

<sup>a</sup> PHA content at the end of the test expressed as % (g PHA g<sup>-1</sup> VSS).

<sup>b</sup> Polymer composition expressed as ΔHB/ΔHV in % (w/w).

<sup>c</sup> -q<sub>COD</sub>: specific COD consumption rate. For each cell the first value is expressed as mg COD mg<sup>-1</sup> COD<sub>x</sub> h<sup>-1</sup>, the second value as mmol C mmol<sup>-1</sup> C<sub>x</sub> h<sup>-1</sup>.

<sup>d</sup> q<sub>PHA</sub>: specific PHA storage rate. For each cell the first value is expressed as mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>x</sub> h<sup>-1</sup>, the second value as mmol C<sub>PHA</sub> mmol<sup>-1</sup> C<sub>x</sub> h<sup>-1</sup>.

<sup>e</sup> PHA storage yield on organic acids consumed. For each cell the first value is expressed as mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>OA-cons.</sub>, the second value as mmol C<sub>PHA</sub> mmol<sup>-1</sup> C<sub>OA-cons.</sub>.

<sup>f</sup> PHA storage yield expressed as mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>OA-in</sub>.

<sup>g</sup> PHA storage yield expressed as mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>cons.</sub>.

<sup>h</sup> PHA storage yield expressed as mg COD<sub>PHA</sub> mg<sup>-1</sup> COD<sub>in</sub>.

<sup>i</sup> PHA produced expressed as g PHA kg OA<sub>in</sub>.

<sup>j</sup> PHA produced expressed as g PHA kg COD<sub>in</sub>.

<sup>k</sup> FSCW: fermented second cheese whey.

<sup>l</sup> FCCWP: fermented concentrated cheese whey permeate.

<sup>m</sup> FCW: fermented cheese whey.

Tabella 6: Confronto tra i parametri che caratterizzano i test di accumulo di PHA eseguiti in questo studio e in altri studi condotti con sottoprodotti lattiero-caseari fermentati. Fonte: (Colombo et al., 2019)

Il polimero immagazzinato durante le prove di accumulo era solo PHB, mentre il contenuto medio massimo di polimero sul peso secco delle cellule ottenuto per i due flussi testati era del  $62 \pm 4,5\%$  (g PHA g<sup>-1</sup> VSS) per le SCW fermentate e del  $55,1 \pm 1,3\%$  (g PHA g<sup>-1</sup> VSS) per le CCWP fermentate. La minore quantità di polimero immagazzinata con CCWP era probabilmente dovuta al maggiore

contenuto di fosforo nel substrato rispetto a SCW, che può interferire negativamente con la capacità dei batteri di accumulare PHA.

Confrontando i test di accumulo eseguiti con SCW e CCWP fermentati con altri studi sulla produzione di PHA da MMC utilizzando sottoprodotti lattiero-caseari (Tab. 6), si è osservato che sono state ottenute rese di accumulo di PHA molto elevate, riferite agli acidi organici consumati. I dati sono in linea con la resa ottenuta da Oliveira et al. (2017), la più alta utilizzando gli scarti caseari come substrato ( $0,86 \pm 0,07$  mmol  $C_{PHA}$  mmol  $1 C_{OA-cons.}$ ).

La produzione di PHA durante i test di accumulo utilizzando SCW fermentato come substrato ha generato una quantità totale di  $274 \pm 60$  g PHA per kg di  $COD_{in}$ , corrispondenti a  $682 \pm 130$  g PHA per kg di  $OA_{in}$ , e  $268 \pm 100$  g PHA per kg di  $COD_{in}$ , pari a  $567 \pm 210$  g PHA per kg di  $OA_{in}$ , quando il CCWP fermentato è stato utilizzato come fonte di carbonio. In entrambi i processi, la resa complessiva di produzione di PHA utilizzando gli acidi organici somministrati è stata simile, mentre per SCW fermentato è stata superiore rispetto a quella riportata da Domingos et al. (2018), i quali hanno utilizzato il siero di formaggio fermentato per alimentare una coltura pura di *Cupriavidus necator* DSMZ 545 (600 g PHA per kg di OA).

Nonostante le differenze nelle quantità massime di PHA raggiunte, le prestazioni simili riportate dalle colture selezionate utilizzando SCW fermentato e CCWP fermentato rappresentano un risultato positivo in termini di riproducibilità del processo di produzione di PHA utilizzando due flussi di latte fermentato diversi. Considerando la resa di COD dopo la fermentazione al buio, calcolata come 0,76 g COD per g di  $COD_{sugar}$  per HySCW e 0,66 g COD per g di  $COD_{sugar}$  per HyCCWP, e la resa di PHA pari a 0,46 g  $COD_{PHA}$  per g di  $COD_{in}$  per HySCW e 0,45 g  $COD_{PHA}$  per g di  $COD_{in}$  per HyCCWP, la resa complessiva calcolata è stata di 0,35 g  $COD_{PHA}$  per g di  $COD_{sugar}$  e 0,30 g  $COD_{PHA}$  per g di  $COD_{sugar}$  (Colombo et al., 2019).

### 3.3 Rifiuti dell'industria del biodiesel

Il biodiesel è un carburante alternativo alla benzina. È prodotto da fonti rinnovabili come grassi animali e oli vegetali, tuttavia, durante questo processo si genera un principale sottoprodotto di scarto chiamato glicerolo grezzo, che costituisce circa il 10 % (w/w). I rifiuti liquidi generati dal biodiesel (BLW) possono diventare un problema ambientale. Una possibile soluzione per il BLW in eccesso è impiegarlo come fonte di carbonio ed energia per promuovere la crescita di microrganismi che producono PHA. Questo approccio potrebbe rendere il PHA economicamente competitivo e minimizzare i problemi di smaltimento dei rifiuti. Diversi studi hanno dimostrato che specie batteriche come *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediterranea* e *Pseudomonas putida* possono produrre scl-PHA e mcl-PHA utilizzando BLW come substrato. Tuttavia, in condizioni di crescita non bilanciate (limitazione di azoto e abbondanza di carbonio), alcune specie di *Pseudomonas* producono anche alginato come esopolisaccaride (EPS) commercialmente utile. Questo può limitare l'uso del substrato di carbonio disponibile per la PHA. Nel lavoro di Chanasit et al. è stato utilizzato un nuovo ceppo di *Pseudomonas mendocina* PSU in grado di accumulare PHA a partire da BLW come unica fonte di carbonio. Però è stata riscontrata anche una produzione di alginato. (Chanasit et al., 2016).

### 3.3.1 Materiali e metodi

I batteri che sintetizzano PHA sono stati ottenuti da un campione di sedimenti contaminati da biodiesel presso il Biodiesel Ethyl Ester Pilot Plant, lo Specialized R & D Center for Alternative Energy from Palm Oil and Oil Crops, Faculty of Engineering, Prince of Songkla University, Thailandia secondo i metodi di isolamento standard (Chanasit *et al.*, 2016).

#### Biosintesi di PHA da BLW

Come unica fonte di carbonio per la produzione di PHA è stata utilizzata una BLW ottenuta dal Biodiesel Ethyl Ester Pilot Plant dell'Università Prince of Songkla. È risultato un substrato di carbonio adatto per la biosintesi di PHA grazie al suo elevato contenuto di carbonio e glicerolo e al basso contenuto di azoto. Il rapporto iniziale carbonio/azoto (C/N) era di circa 800-850. L'inoculo per ogni esperimento è stato preparato utilizzando 50 mL di terreno ricco di nutrienti (NR) in una beuta da 250 mL. La coltura è stata incubata in un agitatore rotante a 200 rpm e 35 °C fino al raggiungimento della fase di mid-log, quindi una sospensione di inoculo al 4 % (v/v) è stata aggiunta al terreno sperimentale, un terreno a base di sali minerali a limitazione di azoto (MSM). Le condizioni aerobiche sono state mantenute mediante agitazione e i campioni sono stati prelevati ogni 12 ore nelle 72 ore di coltivazione. Per ogni campione sono stati analizzati la massa cellulare, il contenuto di PHA e la sua composizione e l'utilizzo del substrato dalla coltura liquida libera da cellule (Chanasit *et al.*, 2016).

L'effetto delle diverse quantità di BLW sulla crescita cellulare e sulla sintesi di PHA da parte di *Pseudomonas sp.* PSU è stato studiato attraverso la crescita in terreno di produzione MSM integrato con varie concentrazioni di glicerolo nel BLW, ad esempio 5, 10, 20, 30, 40 e 50 g/L (Chanasit *et al.*, 2016).

Sono state testate diverse fonti di azoto:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  (urea), nel MSM contenente 20 g/L di glicerolo, per verificarne gli effetti sulla biomassa e sull'accumulo di PHA. La quantità della migliore fonte di azoto è stata poi regolata per trovare la concentrazione ottimale e il rapporto C/N adatto alla produzione di PHA durante la Response Surface Methodology (RSM) (Chanasit *et al.*, 2016).

L'ottimizzazione della crescita cellulare e della produzione di PHA è stata condotta utilizzando un approccio a singolo fattore su tre fattori, noti come fattore (A) (rapporto carbonio/azoto in mole/mole), fattore (B) (pH iniziale) e fattore (C) (temperatura di incubazione in °C). Il parametro fisso era la concentrazione di carbonio (glicerolo totale nel BLW) a 20 g/L, mentre le concentrazioni di azoto, il pH iniziale e la temperatura di incubazione sono state variate per ottimizzare le condizioni di produzione al fine di ottenere la massima crescita cellulare e il massimo contenuto di PHA (Chanasit *et al.*, 2016).

### 3.3.2 Risultati e discussione

#### Effetti sulla crescita batterica e sulla produzione di PHA

Una DCW massima di 3,65 g/L con una concentrazione di PHA di 2,59 g/L (circa il 77 % di DCW) e una produttività di PHA di 0,072 g/L/h sono state prodotte da *P. mendocina* PSU quando coltivata con 20 g/L di glicerolo aggiunto come parte della BLW (Tab. 7). Concentrazioni più elevate di glicerolo, ad esempio da 30 a 50 g/L, hanno causato una riduzione significativa della biomassa e della produzione di PHA. Anche altri studi, effettuati con diversi ceppi batterici, hanno mostrato che, aumentando la concentrazione di glicerolo, si ottenevano diminuzioni nella biomassa microbica e nella concentrazione di PHA. Le elevate concentrazioni potrebbero aver creato uno stress osmotico che ha influenzato il metabolismo cellulare. Di conseguenza, potrebbe esserci stata una diminuzione dell'efficienza enzimatica e un rallentamento del tasso di crescita batterica. Questo è indicato dalla riduzione della biomassa batterica, che a sua volta ha influenzato negativamente la resa di PHA.

Total glycerol concentration in BLW (g/L)	Maximum DCW (g/L)	Maximum PHA concentration (g/L)	Maximum PHA content (% DCW)	PHA productivity (g/L/h)
5	3.13 ± 0.07	1.88 ± 0.04	57.42 ± 2.28	0.052 ± 0.003
10	3.37 ± 0.09	2.47 ± 0.05	70.47 ± 3.40	0.069 ± 0.002
20	3.65 ± 0.10	2.59 ± 0.07	76.89 ± 2.31	0.072 ± 0.003
30	2.90 ± 0.04	2.37 ± 0.03	64.77 ± 2.07	0.066 ± 0.002
40	2.05 ± 0.04	0.96 ± 0.03	46.61 ± 2.80	0.027 ± 0.002
50	1.93 ± 0.08	0.58 ± 0.04	30.06 ± 5.15	0.016 ± 0.001

Tabella 7: Crescita cellulare massima, produzione di PHA e produttività di PHA prodotta da *Pseudomonas mendocina* PSU a varie concentrazioni di glicerolo totale in BLW. Fonte: (Chanasit et al., 2016).

*P. mendocina* PSU ha mostrato un basso utilizzo degli altri substrati carboniosi presenti nel BLW, come gli acidi grassi liberi (FFA) e gli esteri metilici di acidi grassi residui (FAME), per sostenere la crescita e la produzione di PHA. È stato quindi valutato il consumo di questi substrati alternativi. I risultati hanno indicato che *P. mendocina* PSU utilizza il glicerolo come substrato preferenziale rispetto agli acidi grassi per la produzione di PHA (Chanasit et al., 2016).

Il solfato di ammonio è risultato la migliore fonte di azoto testata per la produzione e produttività di PHA da parte di *Pseudomonas mendocina* PSU (Tab. 8). La preferenza per il solfato di ammonio come substrato azotato potrebbe essere attribuita a un tasso di assorbimento dell'ammonio più elevato in presenza dell'anione solfato (Chanasit et al., 2016).

Nitrogen source	Maximum DCW (g/L)	Maximum PHA concentration (g/L)	Maximum PHA content (% DCW)	PHA productivity (g/L/h)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.65 ± 0.10	2.59 ± 0.07	76.89 ± 2.31	0.072 ± 0.003
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.28 ± 0.04	1.85 ± 0.03	56.40 ± 1.82	0.038 ± 0.005
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (urea)	2.72 ± 0.10	1.32 ± 0.03	48.93 ± 3.73	0.028 ± 0.004

Tabella 8: Crescita cellulare massima, produzione di PHA e produttività di PHA prodotta da *Pseudomonas mendocina* PSU da tre diverse fonti di azoto. Fonte: (Chanasit et al., 2016).

## Ottimizzazione della crescita batterica e della produzione di PHA utilizzando l'RSM

L'analisi statistica e l'adattamento del modello per l'ottimizzazione della crescita batterica e della produzione di PHA sono stati eseguiti mediante RSM effettuando 17 prove sperimentali. La DCW variava da 2,10 a 3,56 g/L, il contenuto di PHA era compreso tra il 18,59 e il 76,30 % della DCW e il carbonio consumato era compreso tra 2,83 e 9,60 g/L.

Durante il periodo di crescita esponenziale da parte di *P. mendocina* PSU coltivata con MSM integrato con 20 g/L di glicerolo totale nella BLW, l'accumulo di PHA è aumentato continuamente e ha raggiunto una DCW massima di 3,65 g/L e una concentrazione di PHA di 2,59 g/L (pari a circa il 77 % DCW del contenuto di PHA) a 36 h di coltivazione, contemporaneamente alla riduzione dell'apporto di carbonio e azoto. Dopo 36 ore, l'accumulo di PHA e la crescita cellulare sono diminuiti, rispettivamente a 1,83 e 3,25 g/L, presumibilmente a causa della riduzione della fonte di carbonio metabolizzabile preferita e del consumo completo della fonte di azoto, per cui le cellule hanno iniziato a degradare il PHA di stoccaggio a scopo di mantenimento cellulare. L'accumulo di PHA è aumentato costantemente all'aumentare della biomassa, ciò indica che la biosintesi di PHA in questo batterio è un processo associato alla crescita.

In questo studio, il massimo della biomassa (3,65 g/L) e del contenuto di PHA (circa il 77% di DCW) è stato ottenuto con un rapporto C/N di 40, un pH iniziale di 7 e 35 °C. Ciò può essere spiegato dal fatto che a un rapporto C/N di 20, il carbonio diventa il fattore limitante della crescita, mentre ogni ulteriore aumento di C/N fino a 60 non ha portato a un ulteriore incremento della quantità di biomassa perché la concentrazione di azoto non era più sufficiente a sostenere la crescita. In generale, la limitazione dell'azoto è stata ampiamente utilizzata per promuovere la biosintesi di PHA. Il rapporto C/N è importante in una coltura a uno stadio, perché l'accumulo di acetilCoA è determinato dalla quantità di azoto disponibile nel terreno di coltura. Rapporti C/N compresi tra 20 e 40 sono utilizzati per una biosintesi ottimale di PHA. In genere, i processi metabolici sono molto sensibili a variazioni anche minime del pH. La maggior parte dei dati sperimentali ha indicato che valori di pH diversi da 7 riducono la produzione di PHA. La temperatura ottimale per la crescita della maggior parte degli organismi mesofili è compresa tra i 30 e i 37 °C, eventuali scostamenti al di sopra e al di sotto di questa contribuiscono ad aumentare lo stress e possono quindi mettere in discussione la sua capacità di accumulare PHA (Chanasit *et al.*, 2016).

### **Composizioni monomeriche di PHA**

*P. mendocina* PSU è in grado di accumulare scl-PHA e mcl-PHA; studi a livello molecolare hanno confermato che possiede due vie per la sintesi di PHA, ognuna delle quali richiede una specifica PHA sintasi. Il PHA prodotto da *P. mendocina* PSU coltivato per 36 h con BLW era composto da tre tipi di monomeri: 3-idrossibutirrato (3HB) (scl-PHA), 3-idrossiottanoato (3HO) e 3-idrossidecanoato (3HD) (mcl-PHA). L'unità 3HB verrebbe sintetizzata dal glicerolo attraverso la via della glicolisi e dagli acidi grassi attraverso una via di  $\beta$ -ossidazione. Al contrario, i precursori dell'mcl-PHA verrebbero prodotti attraverso una via biosintetica de novo degli acidi grassi e una via di  $\beta$ -ossidazione quando vengono utilizzati il glicerolo e l'acido grasso. Questo è interessante perché finora non è stato riportato che le specie di *P. mendocina* possano produrre 3HB. Pertanto, *P. mendocina* PSU è stato considerato il ceppo più probabile da utilizzare per la sintesi di nuovi PHA mediante la manipolazione dei geni della PHA sintasi e la modifica dei substrati (Chanasit *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nel primo esperimento, in *C. necator*, utilizzando come fonte di carbonio l'olio d'uva fermentato in beuta è stato ottenuto il 76,8 % di PHB su base secca. Quando è stato utilizzato l'estratto di zucchero d'uva in beuta la CDW variava da 28,9 a 71,5 % a seconda della concentrazione dell'estratto di zucchero. La resa del PHB nel bioreattore da 2 L con 40 g l<sup>-1</sup> di zucchero d'uva è stata del 63 %, sempre con *C. necator* (Kovalcik *et al.*, 2020). Nel secondo esperimento, utilizzando una MMC e siero del latte come fonte di carbonio, il massimo contenuto di PHA ottenuto è stato del 62 % per SCW e del 55,1 % per CCWP (Colombo *et al.*, 2019). Nell'ultimo invece è stato utilizzato il ceppo batterico *P. mendocina* PSU che ha dato una resa del 77 % con BLW come substrato (Chanasit *et al.*, 2016).

Quando sono stati utilizzati gli scarti del biodiesel e il siero del latte come fonti di carbonio, siccome sono stati usati rispettivamente il ceppo batterico *P. mendocina* PSU e una MMC, la composizione finale del PHA era mista. Perché, come è già stato detto, *P. mendocina* PSU produce tre monomeri diversi e le MMC sintetizzano PHA differenti a seconda dei microrganismi presenti.

Si è visto in tutti gli studi che la quantità di carbonio presente nel substrato gioca un ruolo fondamentale nella produzione di PHA, bisogna sempre prima trovare la migliore concentrazione di carbonio per l'accumulo di PHA.

L'utilizzo di prodotti di scarto come fonte di carbonio per la produzione di PHA può essere una soluzione per abbassare i costi del PHA e favorire un'economia circolare, bisogna però considerare che i processi fermentativi di questi studi sono stati effettuati solo su scala pilota o da laboratorio. Quindi devono essere presi in considerazione per una futura applicazione su larga scala per consentire una produzione di PHA vantaggiosa dal punto di vista economico e ambientale. Per esempio, considerando i costi di scarto del siero di formaggio pari a zero perché rappresentano un rifiuto da smaltire in sicurezza, il costo per la produzione di PHA pari a 1.000 € ton<sup>-1</sup> e il valore del PHA pari a 3.410 € ton<sup>-1</sup>, e considerando le rese di PHA pari a 14 kg PHA m<sup>3</sup> HySCW e 24,7 kg PHA m<sup>3</sup> HyCCWP, il ricavo netto può essere calcolato in: 33,6 € m<sup>3</sup> HySCW e 59,3 € HyCCWP, cioè 610 € ton<sub>TS</sub><sup>-1</sup> HySCW e 581 € ton<sub>TS</sub><sup>-1</sup> HyCCWP (Colombo *et al.*, 2019).

Oltre alla continua ricerca di nuove fonti di carbonio e metodi di estrazione più sostenibili, sono in atto altri studi per cercare di contenere i costi e aumentare l'efficienza di produzione della PHA. Ad esempio l'ingegneria metabolica può essere una soluzione per migliorare la bassa conversione dei substrati, eliminando enzimi (*fadA* e *fadB*) e prodotti collaterali che indeboliscono le vie di sintesi del PHA. La tecnologia CRISPR/Cas 9 sta aprendo nuove finestre nella manipolazione dei geni associati alla sintesi di PHA e nella regolazione della struttura e del peso molecolare di PHA. Si stanno conducendo ricerche sull'applicazione di strategie di 'bioaugmentation' nei MMC, ovvero l'introduzione di un particolare consorzio o ceppi microbici per intensificare una popolazione esistente e promuovere un'attività desiderata (Khatami *et al.*, 2021).

## BIBLIOGRAFIA

Bhatia, S.K. *et al.* (2021) 'Biowaste-to-bioplactic (polyhydroxyalkanoates): Conversion technologies, strategies, challenges, and perspective', *Bioresource Technology*, 326, p. 124733. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124733>.

Chanasit, W. *et al.* (2016) 'Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(7), pp. 1440–1450. Available at: <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1158628>.

Colombo, B. *et al.* (2019) 'Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) as products of a two-steps bioprocess from deproteinized dairy wastes', *Waste Management*, 95, pp. 22–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.052>.

European Bioplastics (2022) 'What are bioplastics?' Available at: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>.

Khatami, K. *et al.* (2021) 'Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?', *Waste Management*, 119, pp. 374–388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>.

Koller, M. (2018) 'A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters', *Fermentation*, 4(2), p. 30. Available at: <https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>.

Kovalcik, A. *et al.* (2020) 'Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products', *Food and Bioproducts Processing*, 124, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.003>.

PlasticsEurope (2022) 'Plastics - the Facts 2022'. Available at: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>.

Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. (2017) 'Chapter 2 - Microbial growth kinetics', in *Principles of Fermentation Technology*. (Third Edition), pp. 21–74. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080999531000028>.

Tsang, Y.F. *et al.* (2019) 'Production of bioplactic through food waste valorization', *Environment International*, 127, pp. 625–644. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076>.



Yadav, B. *et al.* (2020) 'Bioconversion of waste (water)/residues to bioplastics- A circular bioeconomy approach', *Bioresource Technology*, 298, p. 122584.  
Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122584>.