

UNIVERSITA' DEGLI STUDI PADOVA



Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse
naturali e Ambiente

Corso di Laurea Triennale in
Biotechnologie Agrarie

**LA PRODUZIONE PER VIA MICROBICA
DEI POLIIDROSSIALCANOATI (PHA):
ASPETTI BIOTECNOLOGICI**

Relatore: **prof.ssa Marina Basaglia**

Laureanda: **Luana Bordignon**

Matricola: **572510**

Anno Accademico

2021-22

INDICE

1. LE MATERIE PLASTICHE	3
1.1 LE BIOPLASTICHE	5
2. I POLIIDROSSIALCANOATI (PHA)	9
2.1 STRUTTURA CHIMICA DEI PHA	9
2.2 PROPRIETÀ E UTILIZZI DEI PHA.....	13
3. LA SINTESI MICROBICA DEI PHA.....	15
3.1 LA SINTESI DI PHA A PARTIRE DA COMPOSTI CARBONIOSI C1	17
3.1.1 VIE METABOLICHE PER L'ASSIMILAZIONE DEI COMPOSTI C1.....	19
3.1.2 STRATEGIE DI INGEGNERIA GENETICPER LA PRODUZIONE DI PHA DA GAS C1 ..	24
3.2. LA PRODUZIONE DI <i>scl</i> E <i>mcl</i> PHA.....	27
3.2.1 CEPPI PRODUTTORI DI <i>scl</i> -PHA	27
3.2.2 CEPPI PRODUTTORI DI <i>mcl</i> -PHA	28
3.2.2.1 VIE BIOSINTETICHE E MATERIE PRIME NELLA PRODUZIONE DI <i>mcl</i> -PHA.....	30
4. PROCESSI DOWNSTREAM NELLA PRODUZIONE DEGLI <i>SLC-MCL</i>-PHA ...	33
5. I RIFIUTI LATTIERO-CASEARI COME FONTE DI NUTRIENTI PER LA PRODUZIONE DI PHA	35
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	37
BIBLIOGRAFIA	38

1. LE MATERIE PLASTICHE

Nella società moderna la plastica è un bene essenziale, dal punto di vista di costo, processabilità e proprietà funzionali. Le materie plastiche si ottengono in genere da materie prime fossili quali il petrolio e vengono utilizzate per diverse e/o specifiche applicazioni, adattando la loro struttura chimica alle prestazioni richieste. Solo sette tipi di polimeri coprono circa i due terzi della domanda totale di plastica in tutte le applicazioni (imballaggi, edilizia e costruzioni, automobilistiche, elettriche ed elettroniche, altre). Questi sono: polietilene a bassa e alta densità (PE), polipropilene (PP), polistirene (PS), cloruro di polivinile (PVC) e polietilene tereftalato (PET). Una lista delle materie plastiche più comuni è riportata nella Figura 1.

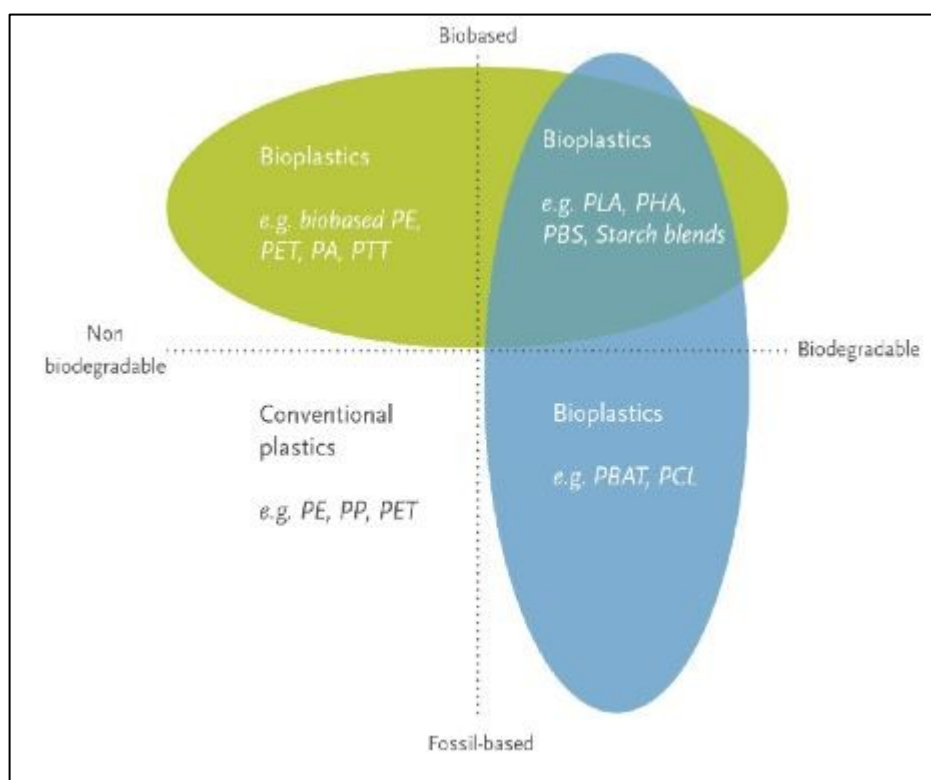


Figura 1. Materie plastiche più comuni e loro applicazioni.

Le poliolefine, seguite dai poliesteri, costituiscono la maggior parte delle materie plastiche (circa il 45%), e sono utilizzate soprattutto come imballaggi. Il 5% di tutto il petrolio e gas naturale è usato annualmente per la loro produzione e si assiste ad un continuo e drammatico incremento dei consumi (Nguyen et al., 2018).

Negli Stati Uniti, il 60% della plastica viene conferito in discarica, il 10 % viene riciclato e il 30% è disperso nell'ambiente terrestre e acquatico. Entro il 2050 il peso della plastica accumulata nell'oceano supererà probabilmente il peso dei pesci, considerando che ogni minuto vengono scartate 10 tonnellate di PE, PP e PS sparse poi per l'oceano (Nguyen et al., 2018).

In questo contesto, le bioplastiche potrebbero offrire un importante contributo alla riduzione dell'uso e della dipendenza dalle limitate risorse petrolifere nonché alla diminuzione dei relativi impatti ambientali (Niaounakis, 2019; Shen, 2009).

1.1 LE BIOPLASTICHE

Le bioplastiche sono secondo la definizione data dalla European Bioplastics, una tipologia di plastiche che possono essere biodegradabili, a base biologica (bio-based) o possedere entrambe le caratteristiche. (vedi Figura 1).

Le bioplastiche hanno le proprietà simili a quelle delle plastiche convenzionali, con importanti vantaggi che riguardano la gestione dei rifiuti nel compostaggio e una riduzione del rilascio in atmosfera di CO₂.

Possono essere ottenute anche da risorse rinnovabili, biodegradabili e/o compostabili e quindi, attraverso il processo di compostaggio, tornare alla natura sotto forma di acqua, anidride carbonica, composti inorganici e biomassa, non lasciando residui tossici (Muniyasamy et al., 2013).

A partire dal 2000, le bioplastiche hanno suscitato grande interesse grazie allo sviluppo di nuovi approcci tecnologici che ne hanno reso più semplice l'ottenimento (Van Beilen et al., 2012). I processi più obsoleti sono stati modificati e utilizzati per produrre intermedi chimici per la produzione di polimeri, come, ad esempio, la disidratazione chimica dell'etanolo, che potrebbe essere utilizzata per produrre Bio-PE e altre materie plastiche.

Gli impianti per l'ottenimento di bioplastiche hanno ancora capacità ridotte rispetto a quelli petrolchimici (come ad esempio nella produzione di polimeri poliidrossialcanoati o PHAs), nonostante ne esistano di grandi dimensioni, come l'impianto di produzione di bio PE.

La UE nel documento “Berlino 27 gennaio 2017- European Bioplastics (EUBP)”, ha stilato la strategia per il controllo del continuo cambiamento nell'industria della plastica verso un'economia più innovativa basata sul risparmio (<https://horimasabp.com/english/bioplasic/>).

Grazie ai continui progressi e innovazioni dell'industria delle bioplastiche nuovi materiali con proprietà migliorate e funzionalità speciali potrebbero essere ottenuti (Philip & Cooper, 2013).

Oggi è possibile ottenere bioplastiche alternative con proprietà e prestazioni simili a quelle dei materiali plastici convenzionali, ma con il grande vantaggio di avere prodotti con *carbon foot print* inferiore o che possono essere trattati negli impianti industriali di compostaggio. [European Bioplastics-Report Bioplastics (accessed on 25 May 2020)].

Le crescenti preoccupazioni per l'impatto ambientale della plastica e la volontà di ridurre la dipendenza dalle risorse di combustibili fossili, hanno accresciuto ancora di più l'attenzione per le bioplastiche. Per quanto riguarda lo sviluppo economico, politico e sociale, questo campo è di grande interesse, in particolare per i beni di plastica monouso, oggetto dell'attuazione della Direttiva sulla plastica monouso, del nuovo Green Deal europeo 2020 della Commissione UE, dell'Economia Circolare Piano d'azione e quadro per le plastiche bio-based e biodegradabili (Philp et al., 2013).

La biodegradabilità delle plastiche, bio e fossili, dipende dalla struttura chimica dei polimeri, ma non dalle fonti utilizzate per la raccolta dei monomeri. Le bioplastiche biodegradabili (vedi in Figura 2 quelle prodotte nel 2016 e nel 2021) e compostabili vengono certificate tali secondo gli standard internazionali come la EN 13432, e possono essere compostate in impianti di compostaggio industriale.

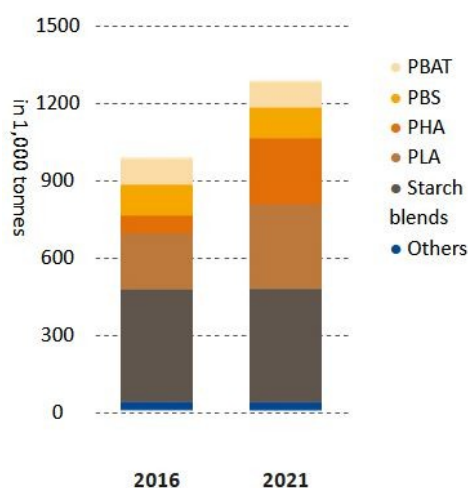


Figura 2. Bioplastiche biodegradabili prodotte nel 2016 e nel 2021

(<https://horimasabp.com/english/bioplasic/>)

Secondo questi principi, le bioplastiche che sono state studiate fino ad ora potrebbero essere suddivise in tre gruppi principali come rappresentato in Tabella 1:

bio-based , NON - biodegradable	PE / PP (PET) PTT / TPC-ET (high-performance polymer)
bio-based , biodegradable	PLA / PHA / PBS
NON - bio-based , biodegradable	PBAT / PCL

Tabella 1. Suddivisione dei 3 gruppi di bioplastiche.

1. bioplastiche ottenute da risorse rinnovabili e biodegradabili e non: come amido plastico, polimeri di cellulosa, proteine, lignina e plastica chitosano, acido polilattico (PLA), poliidrossialcanoati (PHA), ma anche poliidrossibutirradi (PHB), poliidrossivalerato (PHV), e loro copolimeri in diverse percentuali (PHBV); questa classe comprende ora anche polimeri come PVC, PE, PP, PET, nylon e poliammidi (PA), chiamati bioplastiche perché i monomeri di partenza potrebbero essere ottenuti da risorse biologiche ma non sono biodegradabili;

2. bioplastiche a base di risorse fossili ma biodegradabili al 100%: come il policaprolattone (PCL), il polibutilene succinato (PBS), il polibutilene adipato (PBA) e i suoi copolimeri con poliesteri sintetici come il polibutilene adipato-tereftalato (PBAT) e l'alcol polivinilico (PVOH);

3. bioplastiche ottenute utilizzando monomeri provenienti da risorse miste biologiche e petrolifere: come poliesteri ottenuti con acido tereftalico derivato dal petrolio ed etanolo, 1,4-butandiolo e 1,3-propandiolo di derivazione biologica, come polibutilene -tereftalato (PBT), politrimetilene tereftalato (PTT), polietilene-co-isorbite tereftalato (PEIT), poliuretano (PUR) e resine epossidiche (plastica termoindurente).

Una panoramica di queste materie plastiche è riportata nella Figura 3:

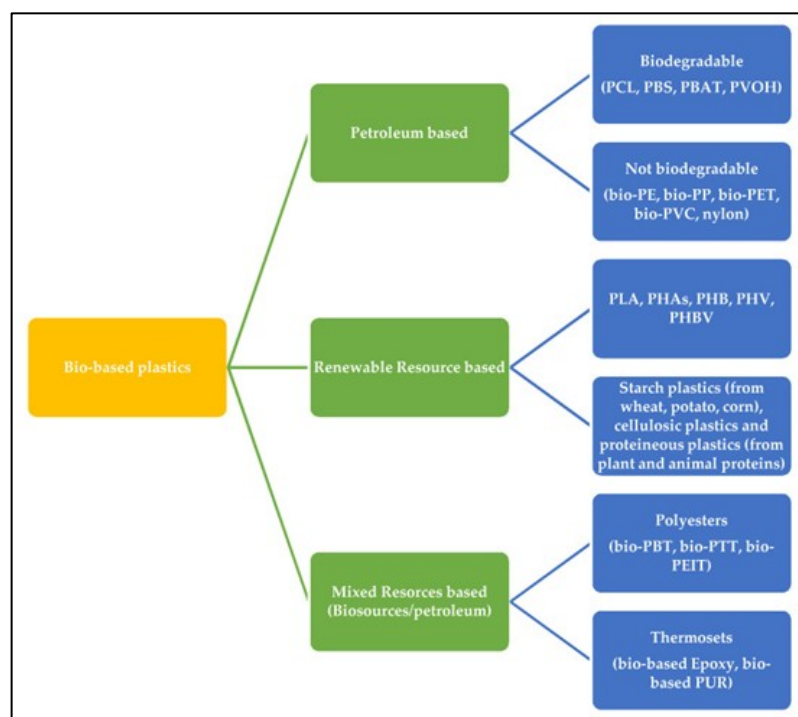


Figura 3. Classificazione delle plastiche bio-based.

Le plastiche derivanti dal petrolio e non biodegradabili permangono nell'ambiente per molti anni, causando un notevole inquinamento. In Europa di tutta la plastica prodotta, solo una piccola parte viene riciclata, la restante parte viene smaltita o in discariche o in impianti di produzione di energia elettrica, causando il rilascio di una notevole quantità di CO₂ e altri gas a effetto serra.

2. I POLIIDROSSIALCANOATI (PHA)

2.1 STRUTTURA CHIMICA DEI PHA

I poliidrossialcanoati (PHA) sono biopolimeri biodegradabili, biocompatibili sintetizzati da molti batteri, in specifiche condizioni di crescita quali l'assenza di micronutrienti (azoto, fosforo e zolfo), un eccesso di carbonio e vengono accumulati come deposito di energia (Chen et al., 2010).

Sono dei poliesteri naturali scoperti per la prima volta nel 1926 dal chimico francese Lemoigne che individuò il poli-3-idrossibutirrato (PHB) in *Bacillus megaterium*. Successivamente, negli anni '70 vennero identificati altri polimeri appartenenti ai PHA, composti da unità monomeriche diverse dell'acido idrossibutirrico. Questa scoperta, fu molto importante perché il PHB essendo parzialmente cristallino risulta molto fragile e poco applicabile, ma con l'aggiunta di altri monomeri all'interno della struttura polimerica le sue proprietà termoplastiche ne sono migliorate (Leimoigne et al., 1962).

Negli anni '80 vennero identificate le vie metaboliche e i geni responsabili della biosintesi dei PHA; questi geni vennero poi clonati, inseriti in batteri ricombinati (*Escherichia coli*) o in piante transgeniche a fini produttivi (Steven et al., 1988).

Ad oggi sono stati identificati numerosi batteri Gram-positivi e Gram- negativi (Tabella 2), produttori di PHA sia in condizioni aerobiche che anaerobiche (Zulfigar et al., 2018).

I PHA sono formati da 600 a 35000 unità monomeriche degli acidi idrossialcanoici (Tan et al., 2014).

I diversi tipi e la struttura, di ciascun biopolimero dipendono dal tipo di microorganismo produttore e dalle condizioni in cui i microbi crescono.

PHA type (mol%)	Strain (Host)	Carbon sources	Feature	DCW (g/L)	Titer (g/L)	Productivity (g/L/h)	Content (wt%)	Yield (g/g)	Scale	Reference
P(3HB)	<i>M. organophilum</i>	Methanol	Wild type; Cultivation under potassium-limiting conditions with 2–3 g/L methanol for 70 h	250	130	1.8–2.0	52–56	0.19	Fed-batch	[82]
P(3HB)	<i>M. hirsute</i>	Methane	Wild type; After screening the nutrient limitation, cultivation under nitrogen limitation by implementing the sequential nitrogen starvation cycle	–	–	⁰ 0.058	34.6 ± 2.5	–	Bubble column bioreactor	[84]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane	Wild type; Cultivation under nitrogen-limitation using a 70 h inoculum; 100% nitrogen in the inoculum culture and 20% nitrogen in the medium	–	–	–	68	–	Batch	[85]
P(3HB)	<i>Methylocystis</i> sp. GB 25 DSMZ 7674	Methane	Wild type; Two-stage cultivation of the continuous growth phase and PHB accumulation phase under ammonia-deficient conditions in 70-L bioreactor	¹ 1899 g	974 g	⁴ 40.6 g/h	51.3	0.52	Batch	[86]
P(3HB)	<i>Methylocystis</i> sp. GB 25 DSMZ 7674	Methane	Wild type; Two-stage cultivation of continuous growth phase and PHB accumulation phase under phosphorus-deficient conditions in 70-L bioreactor	² 2207 g	1033 g	³ 43.0 g/h	46.8	0.55	Batch	[86]
P(3HB)	<i>Methylocystis</i> sp. GB 25 DSMZ 7674	Methane	Wild type; Two-stage cultivation of continuous growth phase and PHB accumulation phase under magnesium-deficient conditions in 70-L bioreactor	² 2304 g	652 g	² 27.2 g/h	28.3	0.37	Batch	[86]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane	Wild type; Cultivation without nitrogen in the incubation medium for 48 h	1.78 ± 0.14	⁰ 0.89	0.36 ± 0.03 g-P3HB/g-TSS/h	50 ± 5	–	160 mL serum bottle culture	[88]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane 3HB	Wild type; Cultivation with 100 mg/L 3HB as cosubstrate without nitrogen in the incubation medium for 48 h	1.95 ± 0.16	¹ 1.17	0.41 ± 0.02 g-P3HB/g-TSS/h	60 ± 5	–	160 mL serum bottle culture	[88]
P(3HB)	<i>M. trichosporium</i> OB3b	Methane	Wild type; PHB production with nitrate-free medium using the culture of the mid-exponential phase for 24 h	–	–	–	38 ± 4	–	125 mL serum bottles	[89]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane	Wild type; PHB production with nitrate-free medium using the culture of the mid-exponential phase for 24 h	–	–	–	36 ± 8	–	125 mL serum bottles	[89]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane	Wild type; PHB production under nitrogen-limiting conditions for 66 h	⁰ 0.557	0.28 ± 0.03	⁰ 0.004	50.3 ± 3.3	0.24	125 mL serum bottles	[89]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane	Wild type; Cultivation with methane as a sole carbon source under nitrogen-limited medium for 48 h	1.6 ± 0.18	⁰ 0.672	⁰ 0.014	42 ± 3	–	160 mL serum bottles	[95]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane Butyrate	Wild type; Cultivation with 1.2 mM butyrate as cosubstrate under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of cosubstrate to the 48 h culture)	1.66 ± 0.2	⁰ 0.913	⁰ 0.019	55 ± 3	–	160 mL serum bottles	[95]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane 3-hydroxybutyrate	Wild type; Cultivation with 1.2 mM 3-hydroxybutyrate as cosubstrate under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of cosubstrate to the 48 h culture)	1.82 ± 0.22	¹ 1.074	⁰ 0.022	59 ± 5	–	160 mL serum bottles	[95]
P(3HB)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane Octanoate	Wild type; Cultivation with 1.2 mM octanoate as cosubstrate under nitrogen-	1.72 ± 0.18	⁰ 0.929	⁰ 0.019	54 ± 3	–	160 mL serum bottles	[95]

PHA type (mol%)	Strain (Host)	Carbon sources	Feature	DCW (g/L)	Titer (g/L)	Productivity (g/L/h)	Content (wt%)	Yield (g/g)	Scale	Reference
mol% 3HV)			in the incubation medium for 48 h						bottle culture	
P(3HB-co-25 mol% 3HV)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane Valerate	Wild type; Cultivation with 1.2 mM valerate as cosubstrate under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of cosubstrate to the 48 h culture)	1.76 ± 0.16	⁰ 0.95	⁰ 0.02	54 ± 4	–	160 mL serum bottles	[95]
P(3HB-co-31.8 mol% 3HV)	<i>Methylobacterium</i> sp. KCTC 0048	Methanol Valeric acid	Wild type; Cultivation with 5 mmol valeric acid and 0.5% (v/v) methanol under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of cosubstrate to the 24 h culture)	2.34	⁰ 0.573	⁰ 0.008	24.5	–	Batch (2 L fermenter)	[96]
P(3HB-co-36.5 mol% 3HV)	<i>Methylobacterium</i> sp. KCTC 0048	Methanol Pentanol	Wild type; Cultivation with 5 mmol pentanol and 0.5% (v/v) methanol under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of cosubstrate to the 24 h culture)	2.01	⁰ 0.5	⁰ 0.007	24.9	–	Batch (2 L fermenter)	[96]
P(3HB-co-27.1 mol% 3HV)	<i>Methylobacterium</i> sp. KCTC 0048	Methanol Heptanoic acid	Wild type; Cultivation with 5 mmol heptanoic acid and 0.5% (v/v) methanol under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of cosubstrate to the 24 h culture)	2.21	⁰ 0.643	⁰ 0.009	29.1	–	Batch (2 L fermenter)	[96]
P(3HB-co-25 mol% 3HV)	<i>M. organophilum</i> CZ-2	Methane Propionate	Wild type; Cultivation with methane and 0.25 g/L propionate under nitrogen-limited medium	⁰ 0.167	0.05	–	30	–	Bioreactor	[98]
P(3HB-co-84 mol% 3HV)	<i>P. denitrificans</i>	Methanol n-amyl alcohol	Wild type; Cultivation with 0.5% (v/v) methanol and 0.05% (v/v) n-amyl alcohol under nitrogen-limited medium for 48 h	1.8	⁰ 0.378	⁰ 0.008	21	–	Flask	[104]
P(3HB-co-38.2 mol% 3HV)	<i>M. extorquens</i>	Methanol n-amyl alcohol	Wild type; Cultivation with 0.5% (v/v) methanol and 0.05% (v/v) n-amyl alcohol under nitrogen-limited medium for 48 h	1.0	⁰ 0.331	⁰ 0.007	33.1	–	Flask	[104]
P(3HB-co-3HV)	<i>Methylocystis</i> sp. WRR1	Methane Pentanol	Wild type; Cultivation with 0.91 g/L of cosubstrate consumption under nitrogen-limited medium	0.5	0.14 (3HB) 0.17 (3HV)	–	62	0.46	2 L fernbach flask	[106]
P(3HB-co-3HV)	<i>Methylocystis</i> sp. WRR1	Methane Valerate	Wild type; Cultivation with 0.78 g/L of cosubstrate consumption under nitrogen-limited medium	0.8	0.25 (3HB) 0.32 (3HV)	–	71.25	0.67	2 L fernbach flask	[106]
P(3HB-co-58 mol% 3HV)	<i>Methylocystis</i> sp. WRR1	Methane Valerate	Wild type; Cultivation with 0.34% valerate as cosubstrate under copper-limited medium	–	–	–	78	–	2 L fernbach flask	[106]
P(3HB-co-3.92 mol% 3HV)	<i>M. extorquens</i> AM1	Methanol	Wild type; Cultivation under cobalt-deficient conditions with 0.5% (v/v) methanol and 1.35 μM Co ²⁺ for 72 h	0.70 ± 0.1	⁰ 0.059	⁰ 0.001	8.4 ± 2.3	–	500 mL flask	[126]
P(3HB-co-1.4 mol% 3HV-co-3.6 mol% 5HV)	<i>M. parvus</i> OBBP	Methane 5-hydroxyvalerate	Wild type; Cultivation with 1.2 mM 5-hydroxyvalerate as cosubstrate under nitrogen-limited medium for 48 h (Addition of co-substrate to the 48 h culture)	1.64 ± 0.18	⁰ 0.787	⁰ 0.016	48 ± 4	–	160 mL serum bottles	[95]
P(3HB-co-3.23 mol% 3HV-co-0.20 mol% 3HHx)	Recombinant <i>M. extorquens</i> AM1	Methanol	Replacing the original <i>phoC</i> with <i>phoC</i> from <i>Aeromonas caviae</i> and expressing the <i>phaA-phaB</i> genes; Cultivation under cobalt-deficient conditions with 0.5% (v/v) methanol and 1.35 μM Co ²⁺ for 72 h	0.42 ± 0.03	⁰ 0.183	⁰ 0.003	43.6 ± 3.3	–	500 mL flask	[126]

Tabella 2. Esempi di microrganismi produttori di PHA

La struttura chimica dei PHA dipende dalla lunghezza della catena laterale, in cui **R** è la catena laterale di ciascun monomero e **n** il numero di monomeri come riportato in Figura 4 (Tan et al., 2014).

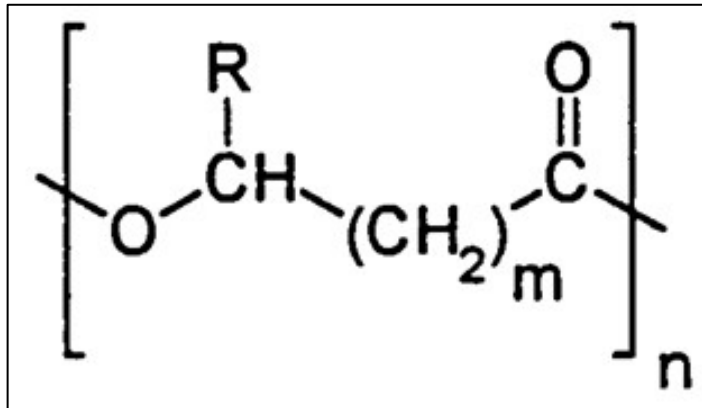


Figura 4. Struttura chimica dei PHA.

Sono classificati in tre classi:

1. A catena corta (*scl*-PHA): composti da monomeri con 3-5 atomi di carbonio
2. A catena media (*mcl*-PHA): composti da monomeri con 6-14 atomi di carbonio
3. A catena lunga (*lcl*-PHA): composti da monomeri con più di 14 atomi di carbonio

Il primo gruppo comprende PHA a corta catena (*scl*-PHA), fragili a causa della loro cristallinità. Esempi di *scl*-PHA sono il poli(3-idrossibutirrato) o il poli(4-idrossibutirrato).

Il secondo gruppo di PHA a catena media (*mcl*-PHA) comprende eteropolimeri con basso livello di cristallinità, elastici e gommosi. Esempi di *mcl*-PHA sono il poli(3-idrossiesanoato) o il poli(3-idrossiepatanoato).

I meno usati sono gli *lcl*-PHA.

I principali PHA naturali sono la combinazione *slc-mlc* (Tan, 2014; Hartmann, 2006).

2.2 PROPRIETÀ E UTILIZZI DEI PHA

Come sopra riportato i PHA sono polimeri termoplastici semi-cristallini, le loro proprietà dipendono dalla loro struttura chimica (omopolimerica e copolimerica). Data la presenza di un gran numero di monomeri, è possibile ottenere diverse caratteristiche

Le proprietà chimico-fisiche variano quindi a seconda della loro composizione, sono stabili ai raggi UV rispetto ad altre bioplastiche come l'acido polilattico. Sono insolubili in acqua, ma solubili in idrocarburi clorurati, presentano una scarsa resistenza agli acidi e alle basi. Sono stati scoperti più di 150 monomeri di PHA e il PHB è stato il primo omopolimero di PHA studiato.

Il PHB presenta alcune proprietà termiche e meccaniche comparabili con alcuni polimeri di origine fossile (ad esempio il propilene); ha infatti un alto punto di fusione e una buona resistenza alla trazione. Tuttavia, dal punto di vista applicativo, a causa della sua rigidità e fragilità, è poco utilizzato; se miscelato con altri PHA e sostanze varie di origine naturale, tra cui lignina, cellulosa e amido, va a costituire biopolimeri con proprietà migliori e più facilmente degradabili (Bugnicourt et al., 2014).

L'amido, che ad esempio presenta una elevata biodegradabilità, è compatibile con il PHB e miscelandolo a questo porta minori costi di produzione e proprietà fisico-chimiche migliorate. La miscela PHA-amido viene utilizzata come materiale di rivestimento nelle industrie di imballaggio alimentare (Li et al., 2016).

La lignina che contiene gruppi ossidrilici e acido carbossilico, invece viene utilizzata come filler del PHA.

Come soprariportato, la famiglia dei PHA presenta un ampio range di proprietà termiche e meccaniche, in dipendenza dei monomeri allargando di conseguenza le proprietà applicative. La miscela *slc-mcl* PHA fabbricati dimostra buone proprietà fisico-chimiche e meccaniche.

I PHA presentano inoltre altre proprietà fisico-chimiche uniche, questa loro caratteristica li rende in grado di generare i nano-composti.

I PHA miscelati con i nano-composti sono utilizzati nelle aree dei prodotti farmaceutici e della bioingegneria (Tarrahi et al., 2020).

Nonostante il maggior problema dei PHA siano gli elevati costi di produzione, alcune società hanno avviato la produzione e la successiva commercializzazione dei PHA. La più grande azienda produttrice di *mcl*-PHA è Polyferm (www.polyfermcanada.com), che utilizza zuccheri e oli vegetali come substrati per la coltivazione di microrganismi selezionati (Tortajada et al., 2013).

3. LA SINTESI MICROBICA DEI PHA

Come già sopra citato, i PHA sono sintetizzati da diversi organismi viventi principalmente da piante e batteri. Le piante possono accumulare PHA solo a bassi livelli, inferiori al 10% del peso secco, viceversa gli Archea lo accumulano fino al 90% della massa cellulare (Verlinden, 2007; Jiang, 2011).

Come sopra riportato, i poliidrossialcanoati fungono da riserva di energia per i microrganismi, vengono sintetizzati in condizioni di stress quali la carenza di macronutrienti ma in eccesso di carbonio. Quando la fonte di carbonio è esaurita nell'ambiente, i microrganismi depolimerizzano i PHA utilizzandoli come fonte di carbonio (Verlinden, 2014; Kourmentza, 2017).

Lo studio della biosintesi dei PHA è in continua evoluzione e, ad oggi sono state trovate 8 principali vie di sintesi. Tra le più importanti ci sono la via metabolica a partire dagli zuccheri nella quale il monomero viene sintetizzato a partire dall'acetil-CoA, oppure altre vie che utilizzano vari intermedi metabolici del ciclo di Krebs o la β -ossidazione degli acidi grassi, che vengono utilizzati da precursori per la sintesi dei monomeri. La polimerizzazione avviene sempre ad opera della PHA-sintetasi (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

I principali substrati utilizzati per la produzione dei PHA sono zuccheri semplici, glicerolo e oli vegetali; su scala industriale questi substrati raffinati vengono utilizzati generando costi elevati. I PHA sono ottenuti principalmente dal sciroppo di glucosio prodotto dal mais; si stima che entro il 2050 un terzo del mais prodotto verrà utilizzato per la produzione di queste bioplastiche. Tale approccio comporta grandi costi, e genera un problema etico che deriva dall'utilizzo di una fonte di alimenti per altri scopi non alimentari. Per questa ragione si stanno cercando soluzioni alternative tra cui l'utilizzo come materiale di partenza di substrati di scarto (Jo, 2021; Sohn, 2020).

La produzione di PHA basata sui residui ha un grande potenziale, perché consentirebbe di risolvere sia problemi ambientali che economici, riducendo nello stesso tempo i costi dei PHA che le emissioni inquinanti.

Le biomasse residuali agroalimentari e industriali come la melassa di canna da zucchero, il siero di latte, gli oli vegetali di scarto e gli idrolizzati lignocellulosici potrebbero essere utilizzati come materia prima nella produzione dei PHA (Saratale & Khang, 2021; Sohn, 2020).

La maggior parte della biomassa è costituita da grandi molecole polimeriche quali la cellulosa, la emicellulosa o l'amido, che non possono essere metabolizzate dai ceppi *wild-type* grandi accumulatori di PHA (Jo, 2021; Sohn, 2020). Prima dell'utilizzo come substrati, queste biomasse devono essere quindi pretrattate con metodi fisici, chimici o enzimatici perché vengano rilasciati i monomeri utilizzabili dai microrganismi, aumentando i costi di produzione e diminuendo in determinati casi anche la purezza dei PHA, rendendo quindi necessari più complessi processi di purificazione del polimero (Koller & Sohn, 2020).

3.1 LA SINTESI DI PHA A PARTIRE DA COMPOSTI CARBONIOSI C1

I composti derivanti da C1 sono abbondanti e a basso costo; dei C1 fanno parte gas come CH₄, CO₂, CO e liquidi come metanolo e acido formico e possono derivare da processi industriali. CO₂ e CH₄ sono i principali componenti dei gas serra che contribuiscono al riscaldamento globale. La cattura e l'utilizzo dei gas C1 è quindi fondamentale per l'equilibrio ecologico del pianeta.

La produzione di PHA da gas C1 è molto promettente in termini di costi. Un ciclo di carbonio completamente chiuso all'interno del ciclo di vita del materiale PHA, potrebbe essere ideato utilizzando direttamente come fonti di carbonio i composti C1 emessi industrialmente; alla fine del suo ciclo di vita il PHA viene scomposto in acqua e CO₂, o in acqua e una miscela di CO₂ e CH₄, in condizioni rispettivamente aerobiche e anaerobiche come riportato in Figura 5 (Koller & Sohn, 2020).

A differenza dei processi biosintetici a partire da zuccheri raffinati o da biomasse lignocellulosiche che richiedono la fotosintesi, il processo a partire da C1 richiede un ciclo molto più breve e veloce di pochi giorni o settimane.

Benché il prezzo della materia prima dei composti C1 sia relativamente basso, si è cercato di utilizzare per la produzione su larga scala, i gas di scarico (Perez et al., 2020).

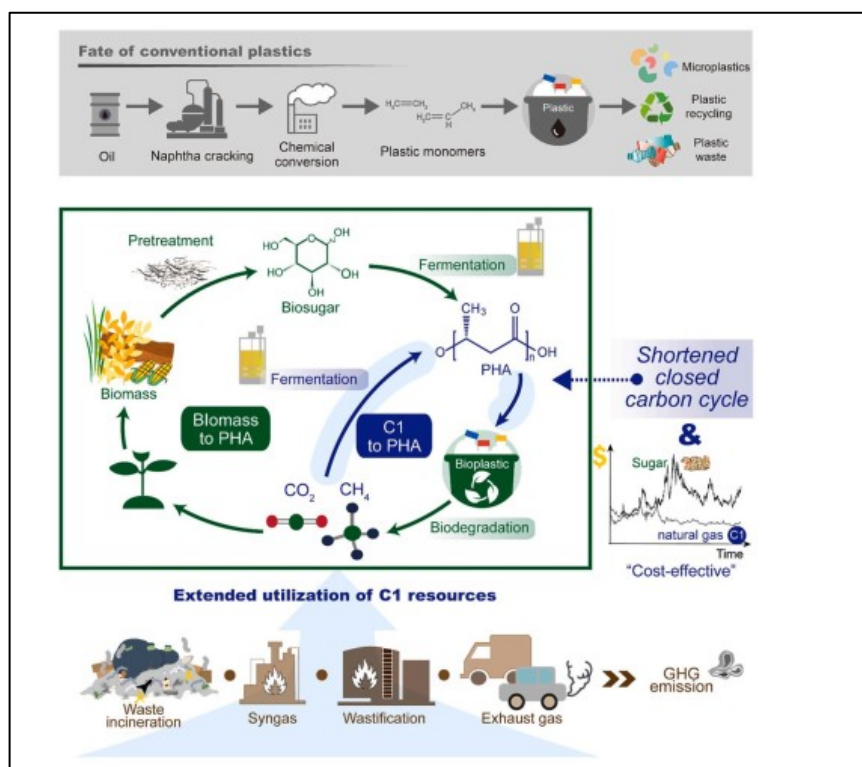


Figura 5. Ciclo di carbonio chiuso all'interno di un ciclo di vita PHA.

Ad esempio, il metano è il principale componente del gas proveniente dagli impianti di trattamento dei rifiuti. La produzione di PHA dai gas di scarico viene eseguita utilizzando biogas da discariche, impianti di trattamento delle acque reflue e strutture agricole.

Importanti aziende come la Mango Materials e la Newlight Technologies, hanno già ottenuto la produzione su scala commerciale dei PHA da gas C1.

Inoltre, l'azienda Mango Materials è riuscita a sviluppare un'importante processo di bioconversione del biogas di scarto in PHA, utilizzando microbi metanotrofi come biocatalizzatori senza nessun processo di pretrattamento o sterilizzazione. Grazie alla produzione dei PHA da gas C₁ si prevede una riduzione del 30-35% dei costi di produzione, e una riduzione del 20-30% della produzione annua di plastica di origine fossile prodotta; tali processi potranno sostituire l'uso di combustibili fossili o risorse alimentari come il mais e la canna da zucchero rendendo eticamente ed economicamente sostenibile l'intero processo. (Pfluger, 2011; Cantera, 2019).

3.1.1 VIE METABOLICHE PER L'ASSIMILAZIONE DEI COMPOSTI C1

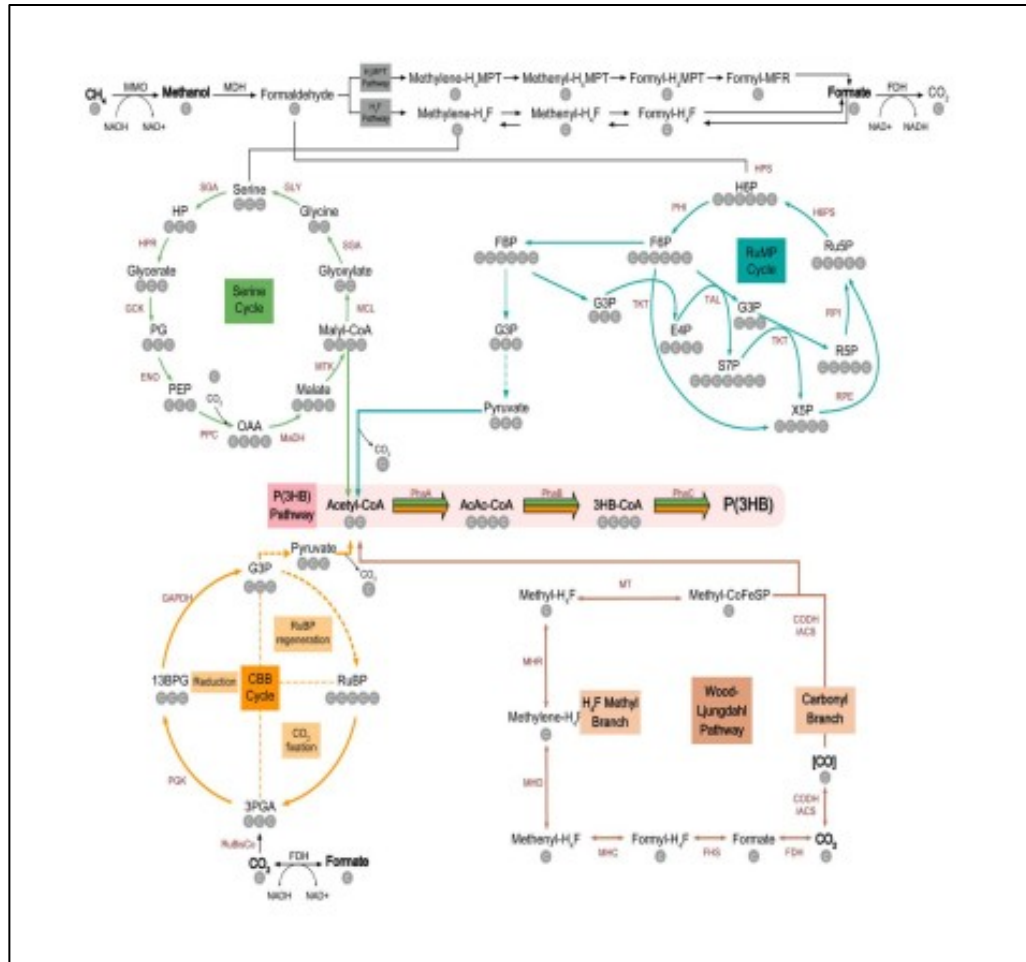


Figura 6. Via metabolica di metilotrofia e chemiolitoautrofi per l'utilizzo delle risorse C1 e la produzione dei PHA.

Per la produzione di PHA da fonti C1, è preferibile l'utilizzo di gas C1 rispetto ai liquidi C1, in quanto le risorse C1 liquide vengono facilmente convertite con metodi sia chimici che biologici in gas C1 a costi bassi. L'utilizzo dei C1 ha luogo tramite due diverse vie di fissazione del carbonio: le vie metilotrofiche e autotrofe. CH_4 e metanolo seguono le vie di ossidazione metilotrofiche, mentre CO_2 e CO seguono le vie autotrofe come riportato in Figura 6 (Chistoserdova et al., 2018).

Le due vie di assimilazione dei composti C1 sono qui di seguito brevemente descritte:

1. Via metilotrofica: i metilotrofi sono un gruppo di batteri in grado di crescere utilizzando i gruppi metilici come unica fonte di carbonio. I metanotrofi sono un sottogruppo dei metilotrofi, che per la crescita cellulare e biosintesi dei metaboliti ossidano il CH₄ in metiletanolo tramite la metano-monossigenasi (MMO) (Lidstrom et al., 2006).

I metanotrofi preferiscono il metano come fonte di C, altri crescono in modo indipendente dal metano, e i metilotrofi non metanotrofi possono crescere con il metano come unica fonte di carbonio. Nonostante le fonti di carbonio usate siano diverse, le vie di ossidazione, per la formazione della formaldeide tramite la metanolo-deidrogenasi (MDH) sono le stesse per tutti i metilotrofi.

La formaldeide viene ulteriormente ossidata o attraverso il percorso indipendente della tetraidometanopterin (H₄MPT) da cui si genererà NADH e NADPH, o attraverso il percorso dipendente dal tetraidrofolato (H₄F) da cui si genererà il NADPH (Lee, 2016; Matsen, 2013).

Come ultimo step il formiato viene ossidato a CO₂ tramite la formiato deidrogenasi (FDH), producendo NADH. Per l'assimilazione dei composti C1 sono possibili due distinti percorsi: il ciclo del ribuloso monofosfato (RuMP) e il ciclo della serina. Nel ciclo RuMP la formaldeide entra direttamente, mentre nel ciclo della serina la formaldeide viene condensata spontaneamente con H₄F, formando il metilene-H₄F. Il metilene-H₄F viene generato mediante una reazione sequenziale reversibile in cui il formiato viene convertito in formil-H₄F, poi in metanolo H₄F, e come ultimo in metilene-H₄F.

I proteobatteri che usano il ciclo RuMP sono più efficienti dal punto di vista energetico, anche se la CO₂ viene fissata durante il ciclo della serina. Nei metilotrofi la CO₂ viene riciclata, per questo non sono considerati autotrofi, in quanto viene utilizzata per generare il NADH (Trotsenko, 2008; Van Dien, 2002).

I metilotrofi appartengono alle sottoclassi dei Gram-negativi α , β e γ proteobatteri, e i batteri Gram-positivi. Tra questi solo quelli appartenenti alla sottoclasse γ producono PHA (Lidstrom et al., 2006).

2. Via autotrofica: ci sono diversi tipi di microorganismi autotrofi in grado di fissare la CO_2 . La fissazione della CO_2 avviene in modo obbligato, o da fototrofi facoltativi attraverso diversi tipi di percorsi: la Wood-Ljungdahl Pathway (WL) e il ciclo CBB (Gonzales et al., 2019). Nella Pathway WL la fissazione della CO_2 avviene tramite il gruppo metilico

H_4F -dipendente con 6 fasi di riduzione, e il ramo carbonilico mediato dalla CO deidrogenasi (CODH). Due molecole di CO_2 con un atomo di C ridotto in entrambi i due rami, vengono condensate in 1 molecola di Ac-CoA con 2 atomi di C. A sua volta, Ac-CoA viene utilizzato per la formazione di ATP o convertito in acetato. I batteri della via WL sono acetogeni, come *Clostridium*. Questi batteri sono in grado di produrre Ac-CoA, che viene convertito in P(3HB) come intermedio nel percorso di biosintesi, attraverso l'ingegneria metabolica (Ragsdale, 2008; Koller, 2020). Invece, nel ciclo CBB nella prima fase la fissazione della CO_2 è mediato dall'enzima chiave ribuloso 1,5-bisfosfatocarbossilasi/ossigenasi (RuBisCO), che condensa la CO_2 con il 1,5-bisfosfato (RuBP). Il RuBP è un composto instabile a 6 atomi di C, che si divide in 2 composti a 3 atomi di C il 3-fosfoglicerato (3PGA). Nella seconda fase di riduzione il 3PGA viene fosforilato tramite la fosfoglicerato-chinasi (PGK) formando il 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPG). La gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) riduce il 1,3BPG, producendo la gliceraldeide 3-fosfato (G3P). 1 mol di CO_2 condensata con 1 mol di RuBP, produce 2 mol di G3P. Nella fase finale, si avrà la rigenerazione di RuBP, recuperando 3 mol di RuBP da 5 mol di G3P che sono state generate da 3 mol di CO_2 . 1 mol di G3P, sarà utilizzata per un altro metabolismo. Fanno parte di questa via alcuni ceppi batterici autotrofi tra cui *Cupriavidus*, i ciano-batteri fototrofici e i batteri azzurri. I maggiori accumulatori di PHA, sono specie del genere *Cupriavidus* (Lee, 2021; Volova, 2002).

Varie risorse C_1 vengono utilizzate per produrre PHA sia ad opera di metilotrofi che di autotrofi. Con la finalità di ottenere industrialmente una buona resa e produttività di PHA, la progettazione dei processi di fermentazione è mirata a 3 obiettivi:

- 1) aumentare il contenuto di PHA
- 2) aumentare la produzione di copolimeri
- 3) aumentare la velocità di trasferimento di massa

Nonostante i proteobatteri metilotrofici e le specie *Cupriavidus* producano P(3HB) in condizioni regolari, la limitazione di nutrienti come (azoto, fosforo, magnesio) è una strategia ampiamente adottata nel mezzo di coltura per ottenere un maggiore contenuto di PHA (Comer, 2017; Macrotrends, 2021).

Come sopra scritto l'omopolimero P(3HB) presenta una struttura cristallina che lo rende rigido e fragile, questo ne comporta una limitazione del suo utilizzo in vari campi. Per sopperire a questa sua mancanza, sono stati incorporati altri monomeri nella sua struttura interna, per migliorarne le proprietà di materiale, quali una maggiore flessibilità, una temperatura di fusione inferiore (T_m), una migliore temperatura di transizione vetrosa (T_g), cristallinità e permeabilità all'acqua (Myung et al., 2019).

Sono stati eseguiti vari esperimenti con ceppi metilotrofici e autotrofi utilizzando fonti di carbonio secondarie, per produrre copolimeri P(3HB) migliorati. Un problema con il carbonio gassoso, è la limitazione nella velocità di trasferimento di massa. CH_4 , CO e CO_2 sono composti idrofobici, nell'ambiente sono presenti in soluzione gassosa, mentre i ceppi sono coltivati nel mezzo acquoso. Per ovviare a questo problema, nella produzione di PHA dai gas C_1 sono state sviluppate diverse strategie per migliorare il trasferimento di massa da gas a liquido; in quanto il superamento del basso tasso di trasferimento di massa è una caratteristica fondamentale per aumentarne l'efficienza di produzione (Mariana et al., 2018).

Sono state a tal fine costruite delle colonne a bolle e bireattori ad anello tubolare verticale, per la produzione di P(3HB) da CH₄ in *Methylocystis hirsuta* ottenendo il 42,5% in peso secco, e il 51,6% in peso di P(3HB). La coltivazione ad alta densità cellulare di *Methylocystis hirsuta* nel reattore di colonna a bolle ha consentito la produzione del 73,4% in peso di P(3HB) (Ghoddosi et al., 2019).

Un ulteriore problema è l'utilizzo come fonte di carbonio o di energia di gas infiammabili o tossici. I problemi possono essere ovviati tramite linee sigillate di gas, sensori di rilevamento del gas e una ventilazione adeguata.

Un bioreattore con una fornitura di gas separata, o un livello di O₂ controllato è un'importante soluzione. Un esempio di tali apparati è il Mes (reattore di elettrosintesi microbica) utilizzato per ridurre il rischio legato all'idrogeno (H₂). Il Mes è in grado di produrre formiato da CO₂ utilizzando l'energia elettrica, la quale viene riconvertita in CO₂ e NADH all'interno della cellula, fornendo un buon apporto sia di carbonio che di fonte di energia (Garrigues, 2020; Chakravarty, 2018).

C. necator ad esempio è stato in grado di produrre 165 mg/L di P(3HB) da CO₂ senza apporto di H₂. La giusta quantità di H₂ per la fermentazione di *C. necator* può essere generato scindendo una molecola d'acqua, rendendo così il processo più sicuro (Li, 2012; Chen, 2018).

C. necator in condizioni di assenza di H₂ ma utilizzando il sistema di scissione dell'acqua è stato in grado di produrre 700 mg/L di P(3HB) (Liu et al., 2016).

3.1.2 STRATEGIE DI INGEGNERIA GENETICA PER LA PRODUZIONE DI PHA DA GAS C1

Numerosi studi di ingegneria genetica sono stati condotti con lo scopo di produrre vari tipi di PHA a partire da varie risorse C1 come riportato in Figura 7 (Garcia-Gonzales et al., 2018).

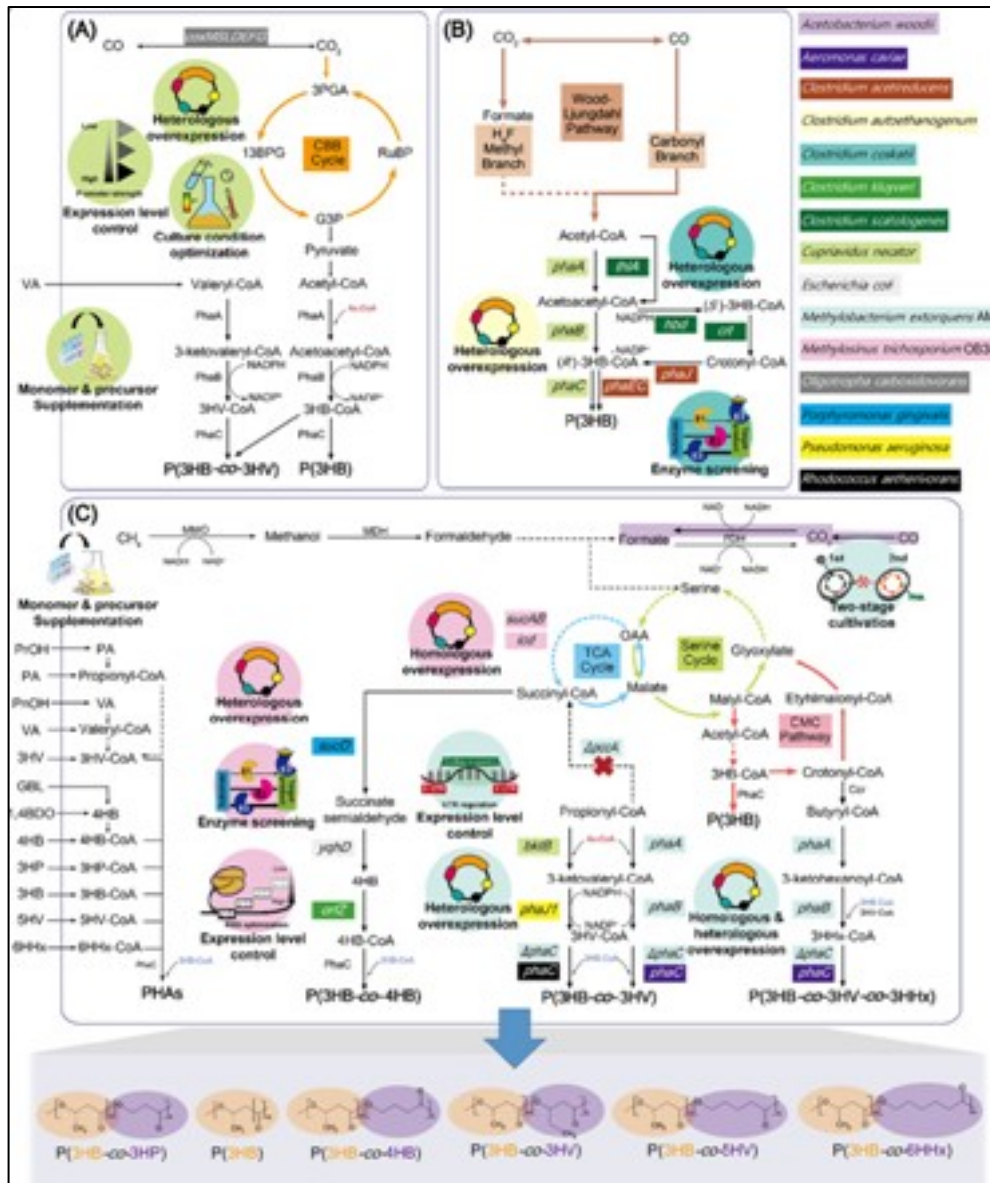


Figura 7. Percorso metabolico ingegnerizzato di: (A) *C. necator* (B) *Acetogeni* (C) *Metilotrofi* per la produzione di PHA.

L'ingegneria metabolica dei ceppi microbici per la produzione di PHA dalle risorse C1 si basa su 3 percorsi:

1. ingegnerizzare per utilizzare risorse C1 da microbi eterotrofi che non possono assorbire risorse C₁, ma possono produrre PHA
2. ingegnerizzare per la produzione di PHA da microbi metilotrofi e autotrofi nativi, ma che non producono PHA
3. ingegnerizzare percorsi metabolici di metilotrofi e autotrofi nativi, microbi che producono naturalmente PHA per la produzione di copolimeri senza che vengano utilizzati monomeri e precursori (Garcia-Gonzales et al., 2018).

Nel primo gruppo di ceppi ingegnerizzati che non possono utilizzare C₁ ma producono PHA, *Cupriavidus necator* H16 (Fig.9A), in cui è stato introdotto il gene per CODH di *Oligotropha carboxidovorans*. Il ricombinate risultante è capace di crescere con CO come unica fonte di C, producendo il 49,7% del peso secco di P(3HB) (Heinrich et al., 2017).

Il secondo gruppo è costituito da ceppi chemiolitoautotrofi che non possono produrre naturalmente PHA, ma crescono con CO₂ come unica fonte di C. Un esempio sono gli acetogeni che non possono produrre P (3HB) da risorse C1 in condizioni autotrofe, a causa della mancanza dell'operone *pha*. Ebbene siano in grado di assorbire CO e CO₂ e convertirle in Ac-CoA. Grazie all'introduzione dell'operone *pha* di *Cupriavidus necator* in *Clostridium autoethanogenum* (Fig.9B), si è ottenuto P(3HB) da una miscela di gas di sintesi CO e CO₂. Sebbene i 3 passaggi da AC-CoA a P (3HB) non richiedano ATP, l'energia limitata e il potenziale redox sbilanciato determina la produzione del solo 5.6% del peso secco di P(3HB) (Lemgruber & Fluchter, 2019).

Nel terzo gruppo sono in corso vari esperimenti mirati ad ingegnerizzare i ceppi metilotrofi. Un esempio è il caso del copolimero P(3HB-co-3HB) e il terpolimero P(3HB co-3HV-co-3HHx) in (Fig.9C). Questi polimeri, sono prodotti con CO₂ in condizioni limitate, utilizzando *Methylobacterium extorquens* AM1 ingegnerizzato (Orita et al., 2014).

In conclusione quindi, le risorse C_1 , stanno diventando sempre più fonti di C sostenibili e rispettose dell'ambiente per la produzione microbica di diverse sostanze chimiche, determinando un grande valore aggiunto in termini di costi, senza nessun inquinamento ambientale, o problema etico relativo al cibo, come quello generato dall'utilizzo di grandi quantitativi di mais (Balasubramanian, 2010; Clomburg, 2017).

3.2. LA PRODUZIONE DI *scl* E *mcl* PHA

3.2.1 CEPPI PRODUTTORI DI *scl*-PHA

Gli *scl*-PHA sono costituiti da monomeri da tre a cinque atomi di carbonio e sono fragili a causa della loro cristallinità. Sono utilizzati principalmente per la produzione di articoli usa e getta e materiali per l'imballaggio alimentare (Kourmentza et al., 2017).

Il poli-3-idrossibutirrato P(3HB) è il più noto tra gli *scl*-PHA, composto da 1000 a 30000 monomeri di acidi grassi idrossilici come in Figura 8.

Il PHB è un polimero rigido e fragile ed è difficile da lavorare a causa della sua natura cristallina (Bugnicourt et al., 2018).

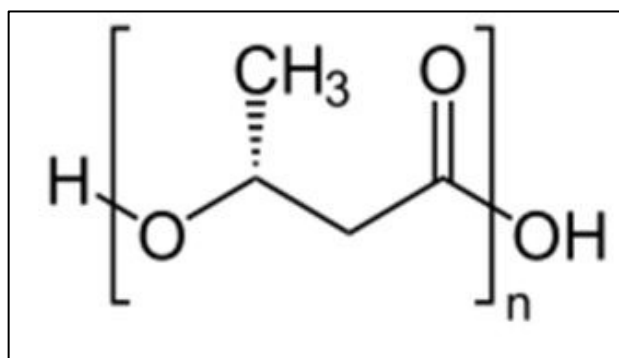


Figura 8 Struttura del poli-3-idrossibutirrato, P(3HB).

Il microrganismo più studiato nella produzione dei PHA, e noto principalmente per la capacità di accumulare il P(3HB) è il *Cupriavidus necator*.

Cupriavidus necator è un β -proteobatterio Gram-negativo non patogeno, è in grado di crescere sia in ambienti anaerobici che aerobi. E' un batterio chemolitotrofo facoltativo in grado di crescere su miscele di H_2 , CO_2 o su formiato senza alcuna dipendenza dalla disponibilità di luce, perché non è un organismo fototrofo. *C. necator* assimila la CO_2 utilizzando il ciclo autotrofico di Calvin-Benson-Bassham (CBB) (Tian et al., 2005).

3.2.2 CEPPI PRODUTTORI DI *mcl*-PHA

Gli *mcl*-PHA sono stati identificati per la prima volta nel 1983 in varie specie microbiche (Tabella 3), e il primo produttore è stato *Pseudomonas oleovorans* coltivato con il 50% di ottano come fonte di carbonio, con la produzione di un biopolimero composto da 3HO monomeri (De Smet et al., 1983).

Gli *mcl*-PHA sono sintetizzati da diversi tipi di batteri come riportato in (tabella 3), tra i quali il *Pseudomonas fluorescens* il più studiato nella produzione degli *mcl*-PHA (Chung et al., 2001).

I PHA a catena media sono ottenuti coltivando i microrganismi su un'ampia varietà di materie quali carboidrati, lipidi, alcoli e acidi organici (Mozejiko-Ciesielska et al., 2019).

Bacteria	Substrates	PHA (wt %)	Monomers composition (wt%)					Mw (kDa)	PDI	Thermal properties (°C)		X _c (%)	Ref.
			HHx	HO	HD	HDD	HTD			T _g	T _m		
<i>P. putida</i>	Terephthalic acid	4.6–84.3	0–10	0–100	16–100	0–84	0–16	7.4–361.4	1.97–2.37	-53 to -32.5	34–77.6	18.7–31.1	[12, 13,14, 15,16, 71]
	Oils												
	Decanoic acid												
<i>P. aeruginosa</i>	Octanoic acid	0.26–23.5	5–6	27–36	42–47	13–20	n.d.	57–188	1.6–2.0	-52 to -39	48–52	n.a.	[15, 17, 18]
	10-undecenoic acid												
	Dodecanoic acid												
<i>P. mediterranea</i>	Oils	21	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	54	n.a.	-40.6	40.6	n.a.	[19]
	Oleic acid												
<i>P. chlororaphis</i>	Erucic acid	10–45	5–16	10–51	26–49	1–43	0–12	0.8–1.2	1.5–2.3	n.a.	n.a.	37	[20, 21,22, 23]
	Nervonic acid												
	Heptadecanoic acid												
<i>P. citronellolis</i>	Nonadecanoic acid	3–30	1–14	22–48	28–68	5–14	0–4	0.3–3.7	1.5–2.6	n.a.	n.a.	1–15	[24, 25,26, 27,28, 29, 30]
	Heneicosanoic acid												
	Glycerol												
<i>P. resinovorans</i>	Crude glycerol	2–53	3–19	27–48	30–48	8–15	0–10	0.2–3.4	1.5–2.2	n.a.	n.a.	6–7	[31, 32,33, 34]
	Fatty acids												
	Palm kernel oil												
	Ensilaged grass press juice												
	Olive oil distillate												
	Fatty acids												
	Margarine waste												
	Apple pulp waste												
	Tallow based biodiesel												
	Olive oil distillate												
	Used cooking oil												
	Biodiesel fatty acids												
	Olive oil distillate												
	Crude Pollock oil												
	Apricots Solaris grapes												

Tabella 3. Tipi, di composizione polimerica e proprietà degli *mcl*-PHA.

La strategia di coltivazione più usata per gli *mcl-PHA* è l'utilizzo di monoculture, in cui un singolo ceppo batterico viene coltivato per produrre PHA con una specifica composizione di monomeri. Tuttavia, viene maggiormente utilizzata la co-coltura di due o più microrganismi massimizzando così il consumo di materie prime (Rebocho et al., 2019).

Un'altra strategia usata nella coltivazione degli *mcl-PHA* è l'utilizzo di consorzi microbici misti (MMC).

Gli MMC sono colture microbiche aventi una composizione indefinita, vengono selezionati da colture di microrganismi di diverso tipo mediante specifiche pressioni selettive come periodi di alimentazione alternati (Valentino et al., 2020).

Gli *mcl-PHA* si accumulano nel citoplasma batterico sotto forma di granuli che costituiscono una riserva di carbonio e di energia essenziali per la vita dei batteri. L'accumulo di polimeri è vitale per l'integrità cellulare anche, quando la cellula viene esposta a squilibri osmotici (Sedlacek et al., 2019).

3.2.2.1 VIE BIOSINTETICHE E MATERIE PRIME NELLA PRODUZIONE DI *mcl*-PHA

La produzione di PHA dipende dal metabolismo della cellula. Processi come la via glicolitica, la via del pentoso fosfato, il ciclo dell'acido tricarbossilico e la via di sintesi e degradazione degli acidi grassi volatili sono coinvolte direttamente o indirettamente nella sintesi di molecole precursori di PHA. La struttura molecolare, la lunghezza della catena del carbonio e delle molecole dei processi prima descritti, dipendono da diversi tipi di fattori che includono sia lo stato metabolico dei batteri sia l'attività di specifici enzimi (Sasong, 2018; Kniewel, 2019).

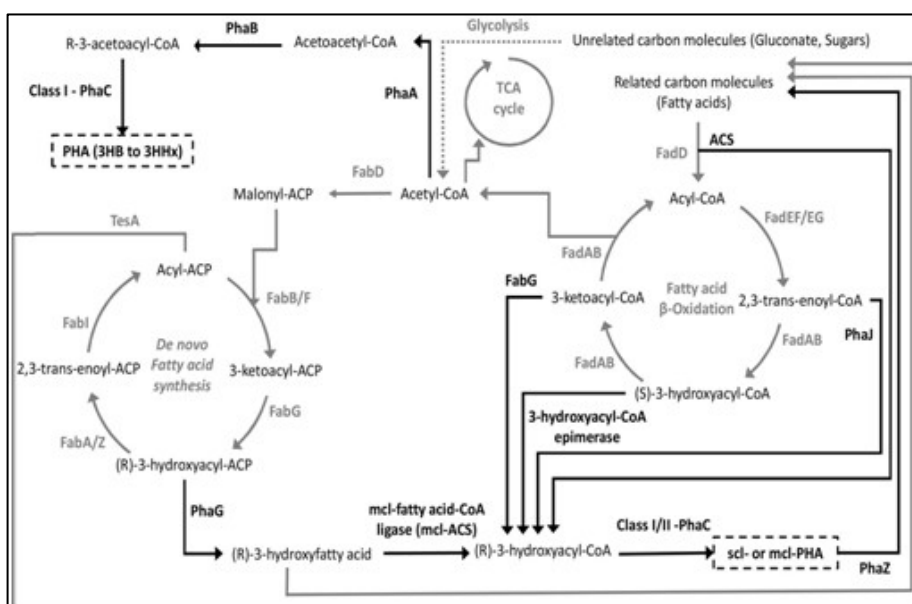


Figura 8. I tre percorsi biosintetici naturali dei PHA.

I precursori di PHA sono trasformati in biopolimeri da diversi tipi di enzimi descritti in 3 vie biosintetiche naturali associate come in Figura 8:

1. alla sintesi di P(3HB), poli (3HB co-3-idrossialcanoati) e P(3HB-co-3HA)
2. al ciclo di sintesi degli acidi grassi utilizzando fonti di carbonio non correlate come (gli zuccheri)
3. al ciclo beta-ossidazione degli acidi grassi utilizzando come fonti di carbonio correlate (acidi grassi volatili) (Sasong, 2018; Kniewel, 2019).

I substrati di carbonio più utilizzati nella produzione degli *mcl*-PHA sono gli alcani, gli acidi grassi e i carboidrati. Negli *mcl*-PHA si possono identificare tre principali tipi di substrati di carbonio:

1. substrati che supportano sia la crescita cellulare che la produzione di PHA
2. substrati che supportano la crescita cellulare, ma non sono in grado di produrre PHA
3. substrati che supportano solo la produzione di PHA, ma non la crescita cellulare (kim et al., 2007).

La produzione di PHA è quindi strettamente correlata alla via catabolica degli acidi grassi. La scelta del tipo di substrato per la crescita cellulare, influenza il tipo percorso di biosintesi utilizzato dai batteri produttori di *mcl*-PHA

Ad esempio, *Pseudomonas oleovorans* è stato coltivato utilizzando una miscela di acido 5-fenilvalerico e di acidi n-alcanoici come fonte di carbonio, influenzando sia la resa del biopolimero che la sua composizione. Nel polimero 3-idrossi-5-fenilvalerato si è ottenuto una resa maggiore rispetto all'acido-5-fenilvalerico (kim et al., 1991).

I costi nella produzione di PHA su larga scala vanno da 2.25 a 2.75 dollari USA per libbra, molto maggiori rispetto ai prezzi delle materie plastiche a base di petrolio come PE o PP che sono dalle cinque, alle dieci volte inferiori. E' proprio questo il principale problema della commercializzazione dei PHA (Kourmentza, 2017; Hartmann, 2006).

A questo scopo, si stanno cercando substrati più economici e poco costosi, portando la capacità dei microrganismi a crescere su una vasta gamma di substrati di carbonio come effluenti di scarto, oli vegetali, acidi grassi, carboidrati semplici e alcani per ridurre i costi di produzione.

L'aumento dell'urbanizzazione globale e delle industrie hanno portato a un accumulo di residui industriali e agroindustriali, sia solidi che liquidi. Si prevede, che entro il 2025 verranno prodotti circa 2.6 miliardi di tonnellate di rifiuti (www.worldbank.org).

I materiali di scarto agroindustriali consistono in (foglie, bucce, gusci, olio di palma, glicerolo grezzo ecc..) che, solitamente vengono inceneriti o lasciati nelle discariche, con conseguente emissione di metano e CO₂ causandone contaminazione e malattie nell'ambiente.

Il mancato utilizzo di questi rifiuti, la loro scarsa valorizzazione e l'aumento dei costi per il loro smaltimento costituiscono un significativo allarme economico. Una possibile soluzione per utilizzare efficacemente i rifiuti ottenendo prodotti biotecnologici aventi un valore aggiunto, potrebbe essere l'ottenimento di *mcl*-PHA.

I rifiuti agroindustriali e i residui forestali sono costituiti da zuccheri, lignina, cellulosa, emicellulose, proteine, lipidi e fibre. A seconda del loro diverso utilizzo, i rifiuti o i residui vengono sottoposti a pretrattamenti con agenti biologici, fisici o chimici ottenendo un substrato di carbonio fermentescibile, che sarà poi utilizzato da molti batteri per produrre *mcl*. La produzione di *mcl*-PHA dipende molto dal tipo di substrato utilizzato, che andrà ad influire sulle proprietà del prodotto finale. L'interesse relativo alla produzione batterica degli *mcl*-PHA è in continua crescita, in modo particolare nel campo dell'ingegneria metabolica. Con lo scopo di ottenerne, una riduzione sempre più ampia dei costi e una produzione sempre più elevata di polimeri, con specifiche proprietà per ampliarne il campo di utilizzo (Chee et al., 2010).

4. PROCESSI DOWNSTREAM NELLA PRODUZIONE DEGLI *slc-mcl*-PHA

L'uso di rifiuti come substrato per la produzione di PHA richiede dei processi di purificazione, questo però va ad aumentarne i costi di produzione. Pertanto, per diminuirne i costi sono state elaborate delle procedure a monte e a valle nella lavorazione dei PHA. La lavorazione a valle dei PHA utilizza la biomassa derivante dal processo produttivo, da cui viene estratto e purificato il polimero come riportato in Figura 9 (Jiang, 2006; Koller, 2014).

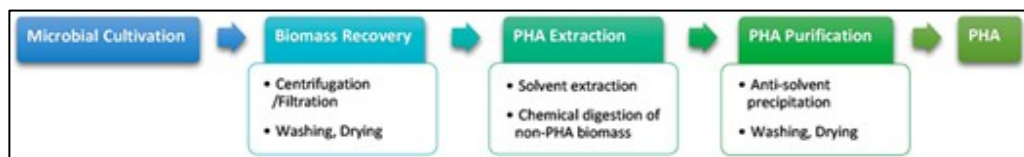


Figura 9. Processi downstream nella produzione degli *slc-mcl*-PHA.

L'estrazione dei PHA viene ottenuta in due processi qui sotto brevemente descritti:

1. Estrazione con solvente: consiste nel recupero dei PHA dalla biomassa.

La biomassa viene disciolta in un solvente alogenato come cloroformio o cloruro di metile, che ne modifica la membrana cellulare; permettendone così il rilascio dei granuli di PHA e la solubilizzazione del polimero. La soluzione viene filtrata e centrifugata per rimuoverne i detriti cellulari, il solvente viene fatto evaporare, ottenendo così un biopolimero privo di impurità (Jacquel, 2008; Ishak, 2016).

2. Digestione chimica della massa cellulare non-PHA (NPCM): il metodo NPCM consiste nel sottoporre la biomassa a trattamenti fisici come (interruzione meccanica con l'utilizzo di mulini a sfere, ultrasuoni) o chimici come (tensioattivi e acidi) o enzimatici. Segue poi, una fase di filtrazione e/o centrifugazione per separare i granuli di PHA dai componenti cellulari, questa fase viene ripetuta più volte al fine di ottenere una maggiore purezza del biopolimero. Questo è il metodo molto usato per l'estrazione di PHB (Kunasundari, 2011; Tamer, 1998).

Con entrambi questi sistemi, le cellule batteriche vengono sottoposte prima a un processo di centrifugazione e/o filtrazione; il surnatante privo di cellule viene quindi eliminato, e viene conservato il pellet da cui viene estratto il PHA. Successivamente la biomassa secca verrà trattata con metanolo per rimuovere lipidi e composti colorati, aumentando così la purezza del polimero estratto.

Per l'estrazione degli *scl*-PHA si usano solventi con composti clorurati come cloroformio o cloruro di metile, molecole molto tossiche e pericolose.

Per l'estrazione degli *mcl*-PHA si utilizzano solventi come l'acetone o il metil-terz-butil etere (MTBE) per aumentarne la purezza del polimero estratto.

Il grado di purezza è uno dei punti critici dei processi a valle di purificazione dei PHA, infatti la presenza di contaminanti biologicamente attivi come proteine e lipopolisaccaridi (LPS) devono essere eliminati perché possono produrre reazioni avverse. In particolare, gli LPS agiscono come endotossine, che venendo a contatto con il sangue innescano gravi effetti. Gli LPS si trovano nella membrana esterna dei batteri Gram negativi e durante la lisi cellulare vanno a contaminare i PHA. La presenza di impurità (come proteine, tossine, tensioattivi e endotossine) nel polimero finale non è tollerata dagli enti regolatori per le applicazioni in campo medico e farmaceutico (Rai, 2011; Wampfler, 2010).

I PHA per applicazioni in campo medico devono avere un basso contenuto di proteine, tensioattivi e endotossine (Kunasundari, 2011; Tan, 2014).

5. I RIFIUTI LATTIERO-CASEARI COME FONTE DI NUTRIENTI PER LA PRODUZIONE DI PHA

I rifiuti agricoli sono un potenziale substrato per la sintesi microbica dei PHA.

I residui agroalimentari sono formati da complessi composti, che devono essere pretrattati in modo che i microbi produttori di PHA possano utilizzarli come substrato.

Il pretrattamento dei rifiuti agricoli mette a disposizione una buona quantità di zuccheri semplici e grassi, utilizzabili da parte dei microrganismi.

Il settore lattiero-caseario è il settore con crescita più rapida tra tutti i settori alimentari considerando le sue vendite, la produttività, la nutrizione e il prezzo.

Dall'industria lattiero casearia derivano vari prodotti considerati rifiuti dopo la lavorazione delle materie prime, tra cui il siero di latte nella produzione del formaggio, fanghi, effluenti liquidi. Ogni anno, milioni di tonnellate di rifiuti di lavorazione dei prodotti caseari, vengono scaricate nelle acque dei fiumi causandone gravi impatti nell'ambiente e sulla popolazione umana.

Le acque di lavorazione contengono un insieme di componenti come grassi, sostanze nutritive, cloruri, lattosio, solfati che una volta rilasciati nei corsi d'acqua formano uno strato in superficie che va a ridurre il quantitativo di ossigeno disciolto impedendone la sopravvivenza di piante e animali.

I rifiuti dalle lavorazioni dei prodotti caseari sono di aspetto biancastro e di natura alcalina, ma a causa della fermentazione dello zucchero del latte convertito poi in acido lattico, diventano acidi (Khatami et al., 2020).

Le proprietà dei rifiuti lattiero caseari dipendono dalla quantità di latte utilizzato e dal tipo di prodotto fabbricato. I rifiuti di lavorazione dell'industria lattiero casearia presentano un'elevata concentrazione di materia organica e pH, per il loro smaltimento sono necessari dei trattamenti delle acque reflue con vari metodi per prevenire l'inquinamento ambientale.

Tra i rifiuti di scarto delle lavorazioni agroalimentari, quelli che nel mercato vengono utilizzati maggiormente come substrato per la trasformazione in PHA, sono quelli che provengono dal settore lattiero-caseario (Koller et al., 2017; Bozorg et al., 2015; Chee et al., 2019).

PHA sono quindi stati prodotti mediante l'utilizzo degli scarti di lavorazione dei prodotti lattiero-caseari utilizzando acque reflue, siero di latte e altri composti di scarto.

Il siero di latte deriva dalla lavorazione del formaggio e il 50% viene scaricato come rifiuto nelle acque reflue. Il siero di latte contiene grassi, lattosio, minerali e vitamine (B e C), componenti essenziali per la crescita microbica. Può quindi venir utilizzato come fonte di carbonio a basso costo nella produzione di PHA. Proprio il siero di latte che non richiede nessun pretrattamento tramite idrolisi con metodi fisici e/o enzimatici prima del processo di fermentazione, sta diventando un importante substrato nella produzione dei PHA.

La produzione di PHA avviene in vari passaggi tra cui la fermentazione, la separazione della biomassa dal brodo di coltura, l'essiccazione della biomassa, l'estrazione del biopolimero e l'imballaggio finale.

La produzione industriale può prevedere un processo continuo oppure in batch. La scelta delle varie tecniche da utilizzare dipende dal ceppo microbico, dalla sua cinetica di crescita e dalla fase del metabolismo in cui accumula il polimero (Koyoama et al., 1995).

Per esempio, il processo mediato da *Cupriavidus necator* predilige due reattori: in un primo step la produzione della biomassa avviene in un reattore continuo e continua poi in un reattore discontinuo in batch, nel quale le condizioni di incubazione vengono sbilanciate a favore della fonte di carbonio. Il tutto, per ottenere una miglior resa di accumulo ed estrazione (Braunegg et al., 1995).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Con la presente Tesi si è voluto evidenziare il problema del grande accumulo di plastica che sta causando un grave impatto ambientale.

La maggior parte della plastica prodotta finisce nei mari o negli oceani, provocandone contaminazione e danni rilevanti agli esseri viventi.

Per ovviare a questo problema, si è avviata la produzione di plastica biodegradabile. Le bioplastiche sono un'industria innovativa, in rapida crescita per offrire nuove modalità di recupero e riciclaggio.

Le bioplastiche sono, inoltre biopolimeri ecologici, con proprietà fisico-chimiche che non provocano alcun tipo di inquinamento nei processi di smaltimento dei rifiuti.

Tra i biopolimeri prodotti, i più importanti sono i PHA che stanno avendo una grande applicazione nelle industrie alimentari, in campo medico e farmaceutico.

I PHA sono biopolimeri biodegradabili derivanti da fonti rinnovabili come rifiuti agricoli, oli vegetali e amido.

Uno dei metodi utilizzati nella biosintesi dei PHA è basata sull'utilizzo delle risorse C1, considerate fonti di carbonio sostenibili e di nuova generazione per la produzione microbica, tramite i processi di bioraffineria (Bugnicourt et al., 2016).

La produzione di PHA da composti C1 ha un valore aggiunto con un vantaggio in termini di costi e di impatto ambientale.

In conclusione, gli studi e la ricerca sull'uso di materie prime per diminuirne i costi di produzione sono in continua evoluzione, al fine di ridurre l'uso di plastica derivante dal petrolio e avere un minor inquinamento.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, T., Aadil, R.M., Ahmed, H., Rahman, U., Soares, B.C., Souza, S.L., Pimentel, T.C., Scudino, H., Guimarães, J.T., Esmerino, E.A., Freitas, M.Q., 2019. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends Food Science Technology*, 88, 361–372.
- Al-Battashi H.S., N. Annamalai, N. Sivakumar, S. Al-Bahry, B.N. Tripathi, Q. D. Nguyen, V.K. Gupta, Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production, *Rev. Environ. Science BioTechnology*, 18 (1) (2019), 183–205.
- Al-Battashi, H., Annamalai, N., Al-Kindi, S., Nair, A.S., Al-Bahry, S., Verma, J.P., Sivakumar, N., 2019. Production of bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) using waste paper as a feedstock: Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation employing *Burkholderia sacchari*. *Journal Cleaner Productions*, 214, 236–247.
- Arefin, M.A., Nabi, M.N., McIntosh, S., 2020. Harnessing energy from Australian dairy waste: utilizing five methodologies. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 14, 1180–1196.
- B.A. Ramsay, I. Saracovan, J.A. Ramsay, R.H. Marchessault, Effect of nitrogen limitation on long-side-chain poly-3-hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*. *Applied Environmental Microbiology*, 58 (1992), 744–746.
- Balasubramanian R., S.M. Smith, S. Rawat, L.A. Yatsunyk, T.L. Stemmler, A.C. Rosenzweig, Oxidation of methane by a biological dicopper centre, *Nature*, 465 (2010), 115–119.
- Bezerra M.A., M.A.Z. Arruda, S.L.C. Ferreira, Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: A Review. *Applied Spectroscopy Review*, 40 (4) (2007), 269–299.
- Borrero-de Acuña, J.M., Aravena-Carrasco, C., Gutierrez-Urrutia, I., Duchens, D., Poblete-Castro, I., 2019. Enhanced synthesis of medium-chain-length poly (3- hydroxy alkanoates) by inactivating the tricarboxylate transport system of *Pseudomonas putida* KT2440 and process development using waste vegetable oil. *Process Biochemistry*, 77, 23–30.

Bosco, F., Chiampo, F., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy waste water activated sludge: production of bioplastics using dairy residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109 (4), 418–421.

Bozorg, A., Vossoughi, M., Kazemi, A., Alemzadeh, I., 2015. Optimal medium composition to enhance poly- β - hydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* using cane molasses as sole carbon source. *Applied Food BioTechnology*, 2 (3), 39–47.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing, and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8, 791–808.

Cantera S., S. Bordel, R. Lebrero, J. Gancedo, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Bio- conversion of methane into high profit margin compounds: an innovative, environmentally friendly and cost-effective platform for methane abatement. *Microbiology Biotechnology.*, 35 (2019), 16.

Cerrone F., R. Davis, S.T. Kenny, T. Woods, A. O'Donovan, V.K. Gupta, M. Tuohy, R.P. Babu, P. O'Kiely, K. O'Connor, Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation, *Bioresour. Technology.*, 191 (2015), 45–52.

Chakravarty J., C.J. Brigham, Solvent production by engineered *ralstonia eutropha*: channeling carbon to biofuel. *Applied Microbiology Biotechnology*, 102 (2018), 5021–5031.

Chee J., S. Yoga, N. Lau, S. Ling, R.M.M. Abed, Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics, in: A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial BioTechnology*, *Formatex Research Center*, Spain, (2010), pp. 1395–1404.

Chee, J.Y., Lakshmanan, M., Jeepery, I.F., Hairudin, N.H.M., Sudesh, K., 2019. The potential application of *Cupriavidus necator* as polyhydroxyalkanoates producer and single-cell protein: A review on scientific, cultural and religious perspectives. *Applied Food Biotechnology*, 6 (1), 19–34.

Chen X., Y. Cao, F. Li, Y. Tian, H. Song, Enzyme-assisted microbial electrosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) via CO₂ bioreduction by engineered *Ralstonia eutropha*, *ACS Catal*, 8 (2018), 4429–4437,

Chen Y.J. Bioplastics and their role in achieving global sustainability. *JOURNAL Chem. Pharm. Res.*, 2014; 6:226–231

Chistoserdova L., Applications of methylotrophs: can single carbon be harnessed for BioTechnology, *Curr. Opin. BioTechnology*, 50 (2018), 189–194.

Cho D.H., M.G. Jang, Y.H. Kim, Formatotrophic production of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) from *Methylobacterium* sp. Using formate as the sole carbon and energy source, Korean. *Chemistry Engineering Resources*, 54 (2016), 719–721.

Choi S.Y., M.N. Rhie, H.T. Kim, J.C. Joo, I.J. Cho, J. Son, S.Y. Jo, Y.J. Sohn, K. A. Baritugo, J. Pyo, Y. Lee, S.Y. Lee, S.J. Park, Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: a 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*, 58 (2020), 47–81.

Choi T.R., Y.L. Park, H.S. Song, S.M. Lee, S.L. Park, H.S. Lee, H. Kim, S.K. Bhatia, R. Gurav, K. Choi, Y.H. Yang, Fructose-based production of short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer by Arctic *Pseudomonas* sp. B14–6. *Polymers*, 13 (9) (2021).

Choonut A., P. Prasertsan, S. Klomklao, K. Sangkharak, *Bacillus thermoamylovorans*-related strain isolated from high temperature sites as potential producers of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA). *Current Microbiology*, 77 (2020), 3044–3056.

Chung D.M., M.H. Choi, J.J. Song, S.C. Yoon, I.-K. Kang, N.E. Huh, Intracellular degradation of two structurally different polyhydroxyalkanoic acids accumulated in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas citronellolis* from mixtures of octanoic acid and 5-phenylvaleric acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 29 (2001) 243–250.

Ciesielski S., T. Pokoj, E. Klimiuk, Molecular insight into activated sludge producing polyhydroxyalkanoates under aerobic–anaerobic conditions. *J. Ind. Microbiology Biotechnology*, 35 (2008), 805–814.

Clomburg J.M., A.M. Crumbley, R. Gonzalez, Industrial biomanufacturing: the future of chemical production. *Science*, 355, (2017).

Comer A.D., M.R. Long, J.L. Reed, B.F. Pflieger, Flux balance analysis indicates that methane is the lowest cost feedstock for microbial cell factories. *Metabolic Engineering Communications*, 5 (2017), 26–33,

Cooper T.A. Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG) Woodhead Publishing; Cambridge, UK: 2013. *Developments in bioplastic materials for packaging food, beverages and other fast-moving consumer goods*, pp. 108–152.

Cromwick A.M., T. Foglia, R.W. Lenz, The microbial production of poly (hydroxyalkanoates) from tallow. *Applied Microbiology Biotechnology*, 46 (1996), 464–469.

M.H. Choi, S.C. Yoon, Polyester biosynthesis characteristics of *Pseudomonascitronellolis* grown on various carbon sources, including 3-methyl-branched substrates. *Applied Environmental Microbiology*, 60 (1994), 3245–3254.

Crowther G.J., G. Kosály, M.E. Lidstrom, Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in methylobacterium extorquens AM1. *J. Bacteriol*, 190 (2020), 5057–5062.

Cruz M.V., D. Araújo, V.D. Alves, F. Freitas, M.A.M. Reis, Characterization of medium chain length polyhydroxyalkanoate produced from olive oil deodorizer distillate. *International Journal of Biology Macromolecules*, 82 (2016), 243–248.

Cruz M.V., F. Freitas, A. Paiva, F. Mano, M. Dionísio, A.M. Ramos, M.A.M. Reis, Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *New Bioeth*, 33 (2016), 206–215.

De Paula, F.C., Kakazu, S., de Paula, C.B.C., Gomez, J.G.C., Contiero, J., 2017. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol. *J. King Saud Univ. Science*, 29, 166–173.

De Smet M.J., G. Eggink, B. Witholt, J. Kingma, H. Wynberg, Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.*, 154 (1983), 870–878.

Dionisi D., M. Majone, V. Papa, M. Beccari, Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnology Bioengineering*, 85 (2004), 569–579.

Domingos, J.M.B., Puccio, S., Martinez, G.A., Amaral, N., Reis, M.A.M., Bandini, S., Fava, F., Bertin, L., 2018. Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chemistry Engineering Journal*, 336, 47–53.

Elhadi D., L. Lv, X.R. Jiang, H. Wu, G.Q. Chen, CRISPRi engineering E. Coli for morphology diversification. *Metabolic Engineering*, 38 (2016), 358–369.

Escapa I.F., V. Morales, V.P. Martino, E. Pollet, L. Avérous, J.L. García, M.A. Prieto, Disruption of β -oxidation pathway in *Pseudomonas putida* KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups. *Applied Microbiology BioTechnology*, 89 (2011), 1583–1598.

Fernández D., E. Rodríguez, M. Bassas, M. Viñas, A.M. Solanas, J. Llorens, A.M. Marqués, A. Manresa, Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: effect of culture conditions. *Biochemistry Engineering Journal*, 26 (2005), 159–167.

Ferre-Guell A., J. Winterburn, Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates with controlled composition and microstructure. *Biomacromolecules*, 19 (3), (2018) 996–1005.

Fiorese M.L., F. Freitas, J. Pais, A.M. Ramos, G.M.F. de Aragão, M.A.M. Reis, Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering Life Science*, 9 (6) (2009), 454–461.

Flüchter S., S. Follonier, B. Schiel-Bengelsdorf, F.R. Bengelsdorf, M. Zinn, P. Dürre, Anaerobic production of Poly(3-hydroxybutyrate) and its precursor 3- hydroxybutyrate from synthesis gas by autotrophic clostridia. *Biomacromolecules*, 20 (2019), 3271–3282.

Follonier S., M.S. Goyder, A.-C. Silvestri, S. Crelier, F. Kalman, R. Riesen, M. Zinn, Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71 (2014), 42–52.

Fukui T., Y. Doi Y, Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol*, 179(1997), 4821–4830.

García-Pérez T., J.C. López, F. Passos, R. Lebrero, S. Revah, R. Muñoz, Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor. *Chemistry Engineering Journal*, 334 (2018), 691–697.

Garrigues L., L. Maignien, E. Lombard, J. Singh, S.E. Guillouet, Isopropanol production from carbon dioxide in *Cupriavidus necator* in a pressurized bioreactor. *New BioTechnology*, 56 (2020), 16–20.

Ghoddosi F., H. Golzar, F. Yazdian, K. Khosravi-Darani, E. Vasheghani-Farahani, Effect of carbon sources for PHB production in bubble column bioreactor: emphasis on improvement of methane uptake. *Journal Environmental Chemistry Engineering*, 7 (2) (2019), 102978.

Gillis J., K. Ko, J.A. Ramsay, B.A. Ramsay, Potential for mcl-PHA production from nonanoic and azelaic acids. *Canadian Journal Microbiology*, 64 (2018), 11–19.

Gonzales J.N., M.M. Matson, S. Atsumi, Nonphotosynthetic biological CO₂ reduction. *Biochemist*, 58 (2019), 1470–1477.

Gumel A.M., M.S.M. Annuar, T. Heidelberg, Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. *Brazilian Journal Microbiology*, 438 (2016), 427–438.

Harada K., S. Kobayashi, K. Oshima, S. Yoshida, T. Tsuge, S. Sato, Engineering of *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase through site-directed mutagenesis for enhanced polymerization of the 3-hydroxyhexanoate unit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9 (2021), 99.

Hartmann R., R. Hany, E. Pletscher, A. Ritter, B. Witholt, M. Zinn, Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GP01: batch versus chemostat production. *Biotechnology Bioengineering*, 93 (2006)737–746.

Heinrich D., M. Raberg, A. Steinbüchel, Studies on the aerobic utilization of synthesis gas (syngas) by wild type and recombinant strains of *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology BioTechnology*, 11 (2017), 647–656.

Hottle T.A., Bilec M.M., Landis A.E. Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polymer Degradation Stability*, 98 (2013), 1898–1907.

Impallomeni G., A. Ballistreri, G.M. Carnemolla, S.P.P. Guglielmino, M.S. Nicolò, M.G. Cambria, Synthesis and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Brassica carinata* oil with high content of erucic acid and from very long chain fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (2011), 137–145.

Impallomeni, G., Ballistreri, A., Carnemolla, G.M., Rizzo, M.G., Nicolò, M.S., Guglielmino, S.P.P., 2018. Biosynthesis and structural characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 from long odd-chain fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 608–614.

Ishak K.A., M.S.M. Annuar, T. Heidelberg, A.M. Gumel, Ultrasound-assisted rapid extraction of bacterial intracellular medium-chain-length poly(3- hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) in medium mixture of solvent/marginal non-solvent. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41 (2016), 33–44.

Israni, N., Venkatachalam, P., Gajaraj, B., Varalakshmi, K.N., Shivakumar, S., 2020. Whey valorization for sustainable polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus megaterium*: Production, characterization and in vitro biocompatibility evaluation. *Journal of Environmental Management*, 255, 109884.

Jacquel N., C.-W. Lo, Y.-H. Wei, H.-S. Wu, S.S. Wang, Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39 (1) (2008), 15–27.

Jacquel, N., Lo, C.W., Wei, Y.H., Wu, H.S., Wang, S.S., 2008. Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxy alkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39 (1), 15–27.

Jiang X., J.A. Ramsay, B.A. Ramsay, Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440, *Journal of Microbiological Methods*, 67 (2006), 212–219.

Jiang Y., L. Marang, R. Kleerebezem, G. Muyzer, M.C.M. van Loosdrecht, Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotechnology and bioengineering symposium*, 108 (9) (2011), 2022–2035.

Jo S.Y., Y.J. Sohn, S.Y. Park, J. Son, J.I. Yoo, K.A. Baritugo, Y. David, K.H. Kang, H. Kim, J.I. Choi, M.N. Rhie, H.T. Kim, J.C. Joo, S.J. Park, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by recombinant *Ralstonia eutropha* strains, Korean, *J Chem. Engineering*, 38 (2021), 1452–1459.

Kalyuzhnaya M.G., A.W. Puri, M.E. Lidstrom, Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*, 29 (2015), 142–152.

Kamravamanesh D., M. Lackner, C. Herwig, Bioprocess engineering aspects of sustainable polyhydroxyalkanoate production in cyanobacteria, *Bioengineering*, 5 (2018), 111.

Keshavarz T., I. Roy, Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13 (2010), 321–326.

Khang T.U., M.J. Kim, J.I. Yoo, Y.J. Sohn, S.G. Jeon, S.J. Park, J.G. Na, Rapid analysis of polyhydroxyalkanoate contents and its monomer compositions by pyrolysis-gas chromatography combined with mass spectrometry (Py-GC/MS). *International Journal of Biological Macromolecules*, 174 (2021), 449–456.

Kim D.Y., W.K. Hyung, G.C. Moon, H.R. Young, Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology*, 45 (2007), 87–97.

Kim S.W., P. Kim, H.S. Lee, J.H. Kim, High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnology Letters*, 18 (1996), 25–30.

Kim Y.B., R.W. Lenz, R.C. Fuller, Preparation and characterization of poly (β -hydroxyalkanoates) obtained from *Pseudomonas oleovorans* grown with mixtures of 5-phenylvaleric acid and n-alkanoic acids. *Macromolecules*, 24 (1991), 5256–5260.

Kimura Y. Molecular, Structural, and Material Design of Bio-Based Polymers. *Polym. J.* 2009;41:797–807. doi: 10.1295/polymj.PJ2009154. [CrossRef] Nakajima H., Kimura Y. Chapter 1, General introduction: Overview of the current development of biobased polymers. In: Kimura Y., editor. *Bio-Based Polymers*, 1 (2013), pp. 1–23.

Klemeš J.J., Y. Van Fan, R.R. Tan, P. Jiang, Minimising the present and future plastic waste, energy and environmental footprints related to COVID-19. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 127 (2020), 109883.

Kniewel R., O.R. Lopez, M.A. Prieto, Biogenesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates, in: O. Geiger (Ed.), Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2019.

Koller (Ed.) M., *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*, CRC Press, Boca Raton, 2021.

Koller M., H. Niebelschütz, G. Braunegg, Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences*, 13 (2013), 549–562.

Koller M., L. Maršálek, M.M. de Sousa Dias, G. Braunegg, Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, 37 (2017), 24–38.

Koller, M., Hesse, P., Fasl, H., Stelzer, F., Braunegg, G., 2017. Study on the effect of levulinic acid on whey-based biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Applied Food Biotechnology*, 4 (2), 65–78.

Kourmentza C., J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H.N. Gavala, M.A.M. Reis, Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production, *Bioengineering*, 4 (2017), 1–43.

Kunasundari B., K. Sudesh, Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5 (7) (2011), 620–634.

Lee J., H.J. Park, M. Moon, J.S. Lee, K. Min, Recent progress and challenges in microbial polyhydroxybutyrate (PHB) production from CO₂ as a sustainable feedstock: a state-of-the-art review. *Bioresource Technology*, (2021), 125616.

Lee O.K., D.H. Hur, D.T.N. Nguyen, E.Y. Lee, Metabolic engineering of methanotrophs and its application to production of chemicals and biofuels from methane. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10 (2016) 848–863.

Lee S.H., J.H. Kim, C.-W. Chung, D.Y. Kim, Y.H. Rhee, Analysis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in activated sludge samples enriched by aerobic periodic feeding. *Microbial Ecology*, 75 (2018) 720.

Lemgruber R.D.S.P., K. Valgepea, R. Tappel, J.B. Behrendorff, R.W. Palfreyman, M. Plan, M.P. Hodson, S.D. Simpson, L.K. Nielsen, M. Köpke, E. Marcellin, Systems-level engineering and characterisation of clostridium autoethanogenum through heterologous production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB). *Metabolic Engineering*, 53 (2019) 14–23.

Levett I., G. Birkett, N. Davies, A. Bell, A. Langford, B. Laycock, P. Lant, S. Pratt, Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane—The case for thermophilic bioprocessing. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4 (2016), 3724–3733.

Li H., P.H. Ogenorth, D.G. Wernick, S. Rogers, T.Y. Wu, W. Higashide, P. Malati, Y.X. Huo, K.M. Cho, J.C. Liao, Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science*, 335 (2012), 1596.

Lidstrom M.E., Aerobic methylotrophic prokaryotes, in: M. Dworkin, S. Falkow, Rosenberg E., K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes*, Vol 2: Ecophysiology and Biochemistry, New York, 2006, pp. 618–634.

Lin J., R. Ma, J. Luo, S. Sun, C. Cui, L. Fang, H. Huang, Microwave pyrolysis of food waste for high-quality syngas production: positive effects of a CO₂ reaction atmosphere and insights into the intrinsic reaction mechanisms. *Energy Conversion and Management*, 206 (2020), 112490.

Liu C., B.C. Colón, M. Ziesack, P.A. Silver, D.G. Nocera, Water splitting–biosynthetic system with CO₂ reduction efficiencies exceeding photosynthesis. *Science*, 352 (2016), 1210–1213.

Liu L.Y., G.J. Xie, D.F. Xing, B.F. Liu, J. Ding, N.Q. Ren, Biological conversion of methane to polyhydroxyalkanoate: current advances, challenges, and perspectives. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2 (2020), 100029.

Liu Q., G. Luo, X.R. Zhou, G.Q. Chen, Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering*, 13 (2011), 11–17.

Lokuruka, M.N., 2016. Overview of dairy processing and marketing in East African dairy value chains: Opportunities and challenges. *African Journal of Food Science*, 10 (11), 254–262.

Madkour M.H., D. Heinrich, M.A. Alghamdi, I.I. Shabbaj, A. Steinbüchel, PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules*, 14 (2013), 2963–2972.

Mariyana R., M.S. Kim, C.I. Lim, T.W. Kim, S.J. Park, B.K. Oh, J. Lee, J.G. Na, Mass transfer performance of a string film reactor: a bioreactor design for aerobic methane bioconversion. *Catalysts*, 8 (2018), 490.

Matsen J.B., S. Yang, L.Y. Stein, D.A. Beck, M.G. Kalyuzhnaya, Global molecular analyses of methane metabolism in methanotrophic alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part I: transcriptomic study, *Front. Microbiology*, 4 (2013), 40.

Meereboer K.W., M. Misra, A.K. Mohanty, Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chemistry*, 22 (2020), 5519–5558.

Mezzolla V., O.F. D’Urso, P. Poltronieri, Role of PhaC type I and type II enzymes during PHA biosynthesis. *Polymers*, 10 (8) (2018), 910.

Misra S.K., S.P. Valappil, I. Roy, R. Aldo, Boccaccini, Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 7 (2006), 2249–2258.

Mizuno S., A. Hiroe, T. Fukui, H. Abe, T. Tsuge, Fractionation and thermal characteristics of biosynthesized polyhydroxyalkanoates bearing aromatic groups as side chains. *Polymer Journal*, 49 (2017) 557-563.

Molina-Besch K., Palsson H. A Supply Chain Perspective on Green Packaging Development-Theory Versus Practice . *Pack. Technology. Science*, 29 (2016), 45–63.

Morais C., F. Freitas, M.V. Cruz, A. Paiva, M. Dionísio, M.A.M. Reis, Conversion of fat-containing waste from the margarine manufacturing process into bacterial polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71 (2014), 68–73.

Morya, R., Kumar, M., Thakur, I.S., 2018. Utilization of glycerol by *Bacillus sp.* ISTVK1 for production and characterization of Polyhydroxyvalerate. *Bioresource Technology*, 2, 1–6.

Mozejko-Ciesielska J., K. Szacherska, P. Marciniak, *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 27 (2019), 1151–1166.

Mozumder M.S.I., L. Garcia-Gonzalez, H. De Wever, E.I. Volcke, Poly (3- hydroxybutyrate)(PHB) production from CO₂: model development and process optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 98 (2015), 107–116.

Muhr A., E.M. Rechberger, A. Salerno, A. Reiterer, M. Schiller, M. Kwiecień, G. Adamus, M. Kowalczyk, K. Strohmeier, S. Schober, M. Mittelbach, M. Koller, Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated by *Ps. citronellolis*. *Reactive and Functional Polymers*, 73 (2013), 1391–1398.

Muhr A., E.M. Rechberger, A. Salerno, A. Reiterer, K. Malli, K. Strohmeier, S. Schober, M. Mittelbach, M. Koller, Novel description of mcl -PHA biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from animal-derived waste. *Journal of Biotechnology*, 165 (2013), 45–51.

Mulhaupt R. Green Polymer Chemistry and Bio-based Plastics: Dreams and Reality. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214 (2013), 159–174.

Muneer F., I. Rasul, F. Azeem, M.H. Siddique, M. Zubair, H. Nadeem, Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): efficient replacement of synthetic polymers. *Journal of Polymers and the Environment*, 28 (2020) 2301–2323.

Muneer, F., Rasul, I., Azeem, F., Siddique, M.H., Zubair, M., Nadeem, H., 2020. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of synthetic polymers. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 2301–2323.

Muniasamy S., Reddy M.M., Misra M., Mohanty A. Biodegradable green composites from bioethanol co-product and poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Ind.CropsProd.*, 48 (2013), 812–819.

Murugesan S., R. Iyyaswami, Nonionic surfactants induced cloud point extraction of Polyhydroxyalkanoate (PHA) from *Cupriavidus necator*. *Separation Science and Technology*, 52 (12) (2017), 1929–1937.

Myung J., J.C.A. Flanagan, R.M. Waymouth, C.S. Criddle, Expanding the range of polyhydroxyalkanoates synthesized by methanotrophic bacteria through the utilization of omega-hydroxyalkanoate co-substrates. *AMB Express*, 7 (1) (2017), 1–10.

Myung J., J.C.A. Flanagan, R.M. Waymouth, C.S. Criddle, Methane or methanol-oxidation dependent synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by obligate type II methanotrophs. *Process Biochemistry*, 51 (2016), 561–567.

Nabeoka R., H. Suzuki, Y. Akasaka, N. Ando, T. Yoshida, Evaluating the ready biodegradability of biodegradable plastics using OECD test guideline 301F. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 00 (2021), 1–7.

Narancic T., F. Cerrone, N. Beagan, K.E. O'Connor, Recent advances in bioplastics: application and biodegradation. *Polymers*, 12 (2020), 920.

Nguyen D.T.N., O.K. Lee, T.T. Nguyen, E.Y. Lee, Type II methanotrophs: a promising microbial cell-factory platform for bioconversion of methane to chemicals. *Biotechnology Adv.*, 47 (2021), 107700.

Nguyen H.T.H., Qi P., Rostagno M., Feteha A., Miller S.A. The quest for high glass transition temperature bioplastics. *J. Mater. Chem. A*. 2018;6:9298–9331.

Nguyen H.T.H., Qi P., Rostagno M., Feteha A., Miller S.A. The quest for high glass transition temperature bioplastics. *J. Mater. Chem. A*. 2018;6:9298–9331.

Niaounakis M. Recycling of biopolymers—The patent perspective. *Europe Polymer Journal*, 114 (2019), 464–475.

Nielsen, C., Rahman, A., Rehman, A.U., Walsh, M.K., Miller, C.D., 2017. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology*, 10, 1338–1352.

Obruca S., P. Sedlacek, F. Mravec, O. Samek, I. Marova, Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100 (2016), 1365–1376.

Obruca S., P. Sedlacek, V. Krzyzanek, F. Mravec, K. Hrubanova, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, I. Marova, Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS One*, *11* (2016), 1–16.

Oh M.K., Y.H. Kim, Two-stage bioconversion of carbon monoxide to biopolymers via formate as an intermediate. *Chemical Engineering Journal*, *389* (2020), 124394.

Oliveira G.H.D., M. Zaiat, J.A.D. Rodrigues, J.A. Ramsay, B.A. Ramsay, Towards the Production of mcl-PHA with enriched dominant monomer content: process development for the sugarcane biorefinery context. *Journal of Polymers and the Environment*, *28* (2020), 844–853.

Orita I., K. Nishikawa, S. Nakamura, T. Fukui, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by methylobacterium extorquens AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*, *98* (2014), 3715–3725.

Pérez R., S. Cantera, S. Bordel, P.A. García-Encina, R. Muñoz, The effect of temperature during culture enrichment on methanotrophic polyhydroxyalkanoate production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *140* (2019), 144–151.

Pérez V., C.R. Mota, R. Muñoz, R. Lebrero, polyhydroxyalkanoates (PHA) production from biogas in waste treatment facilities: assessing the potential impacts on economy, environment and society. *Chemosphere*, *255* (2020), 126929.

Pérez V., R. Lebrero, R. Muñoz, Comparative evaluation of biogas valorization into electricity/heat and poly (hydroxyalkanoates) in waste treatment plants: assessing the influence of local commodity prices and current Biotechnologyological limitations, *ACS Sustain. Chemical Engineering*, *8* (20) (2020), 7701–7709.

Pappalardo F., M. Fragalà, P.G. Mineo, A. Damigella, A.F. Catara, R. Palmeri, A. Rescifina, Production of filmable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates produced from glycerol by *Pseudomonas mediterranea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *65* (2014), 89–96.

- Park S.J., T.W. Lee, S.C. Lim, T.W. Kim, H. Lee, M.K. Kim, S.H. Lee, B.K. Song, S.Y. Lee, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 93 (2012), 273–283.
- Pereira J.R., D. Araújo, A.C. Marques, L.A. Neves, C. Grandfils, C. Sevrin, V.D. Alves, E. Fortunato, M.A.M. Reis, F. Freitas, Demonstration of the adhesive properties of the medium-chain-length polyhydroxyalkanoate produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* from glycerol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122 (2019), 1144–1151.
- Peyraud R., K. Schneider, P. Kiefer, S. Massou, J. Vorholt, J.P. Portais, Genome- scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. *BMC Systems Biology*, 5 (2011), 189.
- Pfeifenschneider J., T. Brautaset, V.F. Wendisch, Methanol as carbon substrate in the bio-economy: metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11 (2017), 719–731.
- Pfluger A.R., W.M. Wu, A.J. Pieja, J. Wan, K.H. Rostkowski, C.S. Criddle, Selection of type I and type II methanotrophic proteobacteria in a fluidized bed reactor under non-sterile conditions. *Bioresource Technology*, 102 (2011), 9919–9926.
- Philp J.C., Bartsev A., Ritchie R.J., Baucher M.-A., Guy K. Bioplastics science from a policy vantage point. *New Biotechnolog*, 30 (2013), 635–646.
- Philp J.C., Ritchie R.J., Allan J.E.M. Biobased chemicals: The convergence of green chemistry with industrial Biotechnology. *Trends Biotechnology*, 31 (2013), 219–222.
- Philp J.C., Ritchie R.J., Guy K. Biobased plastics in a bioeconomy. *Trends Biotechnology*, 31 (2013), 65–67.
- Pieja A.J., E.R. Sundstrom, C.S. Criddle, Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community. *Bioresource Technology*, 107 (2012), 385–392.
- Pieja A.J., K.H. Rostkowski, C.S. Criddle, Distribution and selection of poly-3- hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic proteobacteria. *Microbial Ecology*, 62 (2011), 564–573.

Pieja A.J., M.C. Morse, A.J. Cal, Methane to bioproducts: the future of the bioeconomy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 41 (2017), 123–131.

Pion F., Ducrot P.-H., Allais F. Renewable Alternating Aliphatic–Aromatic Copolyesters Derived from Biobased Ferulic Acid, Diols, and Diacids: Sustainable Polymers with Tunable Thermal Properties. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 21 (2014), 431–439.

Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. *Environmental Technology*, 38, 1779–1791.

Ragsdale S.W., E. Pierce, Acetogenesis and the wood-ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins. Proteom.*, 1784 (12) (2008), 1873–1898.

Rahnama F., E. Vasheghani-Farahani, F. Yazdian, S.A. Shojaosadati, PHB production by methylocystis hirsuta from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 65 (2012), 51–56.

Rai R., D.M. Yunos, A.R. Boccaccini, J.C. Knowles, I.A. Barker, S.M. Howdle, G.D. Tredwell, T. Keshavarz, I. Roy, Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a medium chain length polyhydroxyalkanoate homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromolecule*, 12 (2011), 2126–2136.

Rai R., T. Keshavarz, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Roy, Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science Engineering Research*, 72 (2011), 29–47.

Rameshwari R., M. Meenakshisundaram, A review on downstream processing of bacterial thermoplastic-polyhydroxyalkanoate, *International journal of pure and applied bioscience*, 2 (2) (2014), 68–80.

Rani, R.U., Kumar, S.A., Kaliappan, S., Yeom, I.T., Banu, J.R., 2012. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 103 (1), 415–424.

Rebocho A.T., J.R. Pereira, F. Freitas, L.A. Neves, V.D. Alves, C. Sevrin, C. Grandfils, M.A.M. Reis, Production of medium-chain length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste, *Applied Food Biotechnology*, 6 (2019), 71–82.

Rottig A., A. Steinbuchel, Acyltransferases in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77 (2013), 277–321.

Sagong H., H.F. Son, S.Y. Choi, S.Y. Lee, K. Kim, Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis, *Trends in Biochemical Sciences*, 43 (2018), 790–805.

Saratale R.G., S.K. Cho, G.D. Saratale, A.A. Kadam, G.S. Ghodake, M. Kumar, R.N. Bharagava, G. Kumar, D.S. Kim, S.I. Mulla, H.S. Shin, A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams. *Bioresource Technology*, 325 (2021), 124685.

Sedlacek P., E. Slaninova, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 49(2019), 129–136.

Shahid S., R. Mosrati, J. Ledauphin, C. Amiel, P. Fontaine, J.-L. Gaillard, D. Corroler, Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116 (2013), 302–308.

Sharma P.K., R.I. Munir, W. Blunt, C. Dartiailh, J. Cheng, T.C. Charles, D.B. Levin, Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant *Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA synthase (PhaC₁₆) enzyme. *Applied Science*, 7 (2017), 242.

Shaw A.J., F.H. Lam, M. Hamilton, A. Consiglio, K. MacEwen, E.E. Brevnova, G. Stephanopoulos, Metabolic engineering of microbial competitive advantage for industrial fermentation processes, *Science*, 353 (6299) (2016), 583–586.

Shen L., Haufe J., Patel M.K., *Product Overview and Market Projection of Emerging Biobased Plastics*. Utrecht University; Utrecht, The Netherlands: 2009. pp. 1–243.

Shete, B.S., Shinkar, N.P., 2013. Dairy industry wastewater sources, characteristics & its effects on environment. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 3 (5), 1611–1615.

Sicotte D.M., J.L. Seamon, Solving the plastics problem: moving the US from recycling to reduction. *Society & Natural Resources*, 34 (2020), 393–402.

Silva-Queiroz S.R., L.F. Silva, J.G.C. Pradella, E.M. Pereira, J.G.C. Gomez, PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology*, (2009), 111–118.

Sirohi R., J.S. Lee, B.S. Yu, H. Roh, S.J. Sim, Sustainable production of polyhydroxybutyrate from autotrophs using CO₂ as feedstock: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, (2021), 125751.

Sohn Y.J., H.T. Kim, K.A. Baritugo, S.Y. Jo, H.M. Song, S.Y. Park, S.K. Park, J. Pyo, H.G. Cha, J.G. Na, K. H., C. Park, J.I. Choi, J.C. Joo, S.J. Park, Recent advances in sustainable plastic upcycling and biopolymers. *Biotechnology Journal*, 15 (2020), 1900489.

Sohn Y.J., H.T. Kim, S.Y. Jo, H.M. Song, K.A. Baritugo, J. Pyo, J.I. Choi, J.C. Joo, S.J. Park, Recent advances in systems metabolic engineering strategies for the production of biopolymers. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 25 (2020), 846–861.

Sohn Y.J., J. Son, S.Y. Jo, S.Y. Park, J.I. Yoo, K.A. Baritugo, J.G. Na, J.I. Choi, H.T. Kim, J.C. Joo, S.J. Park, Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: a Review. *Bioresource Technology*, 340 (2021), 125693.

Sun Z., J. Ramsay, M. Guay, B. Ramsay, Enhanced yield of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by co-feeding glucose in carbon-limited, fed-batch culture. *Journal of Biotechnology*, 143 (2009), 262–267.

Sun, S., Liu, P., Ji, N., Hou, H., Dong, H., 2018. Effects of various cross-linking agents on the physicochemical properties of starch/PHA composite films produced by extrusion blowing. *Food Hydrocoll*, 77, 964–975.

Suriyamongkol P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney, S. Shah, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a Review. *Biotechnology Advances*, 25 (2007) 148–175.

Tamer I.M., M. Moo-Young, Y. Chisti, Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly(3-hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37 (1998), 1807–1814.

Tan G.-Y.A., C.-L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I.M.N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.-Y. Wang, Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Polymer*, 6 (2014), 706–754.

Tan G.Y.A., C.L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I.M.N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.Y. Wang, Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Polymers*, 6 (2014), 706–754.

Tan G-Y.A., C.-L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I.M.N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.-Y. Wang, Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Polymers*, 6 (2014), 706–754.

Trotsenko Y.A., J.C. Murrell, Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Advances in Applied Microbiology*, 63 (2008), 183–229.

Valentino F., L. Lorini, M. Gottardo, P. Pavan, M. Majone, Effect of the temperature in a mixed culture pilot scale aerobic process for food waste and sewage sludge conversion into polyhydroxyalkanoates. *Journal of Biotechnology*, 323 (2020), 54–61.

Van Beilen J.B., Poirier Y. Plant Biotechnology and Agriculture. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2012. *Plants as factories for bioplastics and other novel biomaterials*; pp. 481–494.

Van Dien S.J., M.E. Lidstrom, Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph methylobacterium extorquens AM1, with application to reconstruction of C3 and C4 metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 78 (3) (2002), 296–312.

Vanapalli K.R., H.B. Sharma, V.P. Ranjan, B. Samal, J. Bhattacharya, B.K. Dubey, S. Goel, Challenges and strategies for effective plastic waste management during and post COVID-19 pandemic. *Science of The Total Environment*, 750 (2021), 141514.

Verlinden R.A.J., D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams, I. Radecka, Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (2007), 1437–1449.

Vialkova, E.I., Sidorenko, O.V., Glushchenko, E.S., 2019. Qualitative composition and local pretreatment of dairy wastewaters, In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. *IOP Publishing*, 687(6), 1-9.

Volova T., G. Kalacheva, O. Altukhova, Autotrophic synthesis of polyhydroxyalkanoates by the bacteria *Ralstonia eutropha* in the presence of carbon monoxide. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58 (2002), 675–678.

Volova T.G., E.G. Kiselev, E.I. Shishatskaya, N.O. Zhila, A.N. Boyandin, D.A. Syrvaicheva, O.N. Vinogradova, G.S. Kalacheva, A.D. Vasiliev, I.V. Peterson, Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. *Bioresource Technology*, 146 (2013), 215–222.

Wampfler B., T. Ramsauer, S. Rezzonico, R. Hischer, R. Köhling, L. Thöny-Meyer, M. Zinn, Isolation and purification of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. *Biomacromolecules*, 11 (2010), 2716–2723.

Wang J., D.R. Salem, R.K. Sani, Microbial polymers produced from methane: Overview of recent progress and new perspectives, in: S. Das, H.R. Dash (Eds.), *Microbial and Natural Macromolecules*, Academic Press, Cambridge, 2021, pp. 117–142.

Wang Z., Y. Itoh, Y. Hosaka, I. Kobayashi, Y. Nakano, I. Maeda, F. Umeda, J. Yamakawa, M. Kawase, K. Yagi, Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (2003), 541–543.

Xie S., M.C. Paau, C.F. Li, D. Xiao, M.M.F. Choi, Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. *Journal of Chromatography*, 1217 (2010), 2306–2317.

Yun H.S., D. Kim, C.W. Chung, H.W. Kim, Y. Yang, Y.H. Rhee, Characterization of a tacky poly(3-Hydroxyalkanoate) produced by *seudomonas chlororaphis* HS21 from palm kernel oil. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 13 (2003), 64–69.

Zamakhaeva S.A., D.N. Fedorov, Y.A. Trotsenko, Methylo-trophic producers of bioplastics. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53 (2017), 389–400.

Zhang Y., H. Liu, Y. Liu, K. Huo, S. Wang, R. Liu, C. Yang, A promoter engineering-based strategy enhances polyhydroxyalkanoate production in *Pseudomonas putida* KT2440. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191 (2021), 608–617.

Zhao F., F. He, X. Liu, J. Shi, J. Liang, S. Wang, C. Yang, R. Liu, Metabolic engineering of *Pseudomonas mendocina* NK-01 for enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates with enriched content of the dominant monomer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154 (2020), 1596–1605.

Zhila Z., E. Shishatskaya, Properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing 4-hydroxybutyrate monomer units. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111 (2018), 1019–1026.

Zinn M., R. Hany, Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification. *Advanced Engineering Materials*, (2005), 408–411.