

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

BIOPLASTICHE PER LA BIOECONOMIA:
PRODUZIONE DI POLIIDROSSIALCANOATI
(PHAs) DAL SIERO DI LATTE

Relatore
Prof. Lorenzo Favaro

Laureando
Luca Bolla
Matricola n.
1223033

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO

Secondo l'associazione European Bioplastics per bioplastiche si intendono tutte le famiglie di materiali plastici originati da biomassa (bio-based), biodegradabili od entrambi.

L'esigenza di progettare materiali alternativi e sostenibili rappresenta la risposta ad una maggiore sensibilità mondiale in tema di tutela dell'ambiente e alla necessità di una transizione verso un'economia circolare.

Le bioplastiche possiedono il vantaggio unico rispetto alle plastiche convenzionali di ridurre la dipendenza da risorse fossili e ridurre le emissioni di gas serra.

L'utilizzo delle bioplastiche è fondamentale per il raggiungimento della neutralità climatica entro il 2050 (obiettivo del Green Deal Europeo).

L'industria della bioplastica è un settore giovane e innovativo che può generare un enorme potenziale economico ed ecologico utilizzando le risorse in modo più efficiente nell'ottica di un'economia circolare a basse emissioni di carbonio.

Una delle categorie di bioplastiche maggiormente studiate è rappresentata dai polioidrossialcanoati (PHA). Nel 1926 il ricercatore francese Lemoigne scoprì il polioidrossibutirrato (PHB) come costituente del *Bacillus megaterium*.

I PHA sono sintetizzati da più di 90 specie batteriche e vengono prodotti in determinate condizioni. Le applicazioni dei PHA in ambito industriale sono tutt'ora in crescita.

Per raggiungere una convenienza economica nel processo di produzione di PHA in scala industriale è necessario lo sviluppo di processi biotecnologici efficienti e l'utilizzo di fonti di carbonio poco costose.

Il possibile utilizzo del siero di latte per la produzione di PHA comporterebbe una drastica riduzione dei costi di produzione e inoltre contemporaneamente si risolverebbe un problema ambientale

ABSTRACT

According to the European Bioplastics association, bioplastics mean all families of plastic materials originating from biomass (bio-based), biodegradable or both.

The need to design alternative and sustainable materials represents the answer to a greater global sensitivity in terms of environmental protection and the need for a transition towards a circular economy.

Bioplastics possess the unique advantage over conventional plastics of reducing dependence on fossil resources and reducing greenhouse gas emissions.

The use of bioplastics is essential for achieving climate neutrality by 2050 (objective of the European Green Deal).

The bioplastic industry is a young and innovative sector that has enormous economic and ecological potential. It uses resources in a more efficient way, in the perspective of a low-carbon circular economy.

One of the most studied categories of bioplastics is represented by polyhydroxyalkanoates (PHA). In 1926 the French researcher Lemoigne discovered polyhydroxybutyrate (PHB) as a cellular component of *Bacillus megaterium*.

PHAs are synthesized by more than 90 bacterial species and are produced under certain conditions. Applications of PHAs in industry are still growing.

To achieve cost-effectiveness in the industrial-scale PHA production process, the development of efficient biotechnological processes and the use of inexpensive carbon sources is necessary. The possible use of whey as feedstock for PHA would lead to a drastic reduction in production costs and at the same time it would also solve an environmental problem.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RIASSUNTO | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1.0 INTRODUZIONE | 5 |
| 2.0 BIOPLASTICHE..... | 6 |
| 2.1 GENERALITA' | 6 |
| 2.2 BENEFICI E MERCATO ATTUALE BIOPLASTICHE | 8 |
| 2.3 STRATEGIE EUROPEE FAREVOLI ALLO SVILUPPO DELLE BIOPLASTICHE E LE CERTIFICAZIONI ... | 11 |
| 2.4 CLASSIFICAZIONE BIOBASED POLYMER | 15 |
| 3.0 POLIIDROSSIALCANOATI | 16 |
| 3.1 PROPRIETA' PHAS | 17 |
| 3.2 SINTESI ED ESTRAZIONE PHAS | 19 |
| 3.2.1 SINTESI PHAS..... | 20 |
| 3.2.2 ESTRAZIONE PHAS..... | 20 |
| 3.3 BIODEGRADAZIONE PHAS | 23 |
| 3.4 APPLICAZIONI PHAS | 24 |
| 4.0 VALORIZZAZIONE SCARTI ALIMENTARI PER PRODUZIONE BIOPLASTICHE | 25 |
| 4.1 PRODUZIONE DI POLIIDROSSIALCANOATI (PHA) DAL SIERO DI LATTE..... | 26 |
| 4.1.1 MICRORGANISMI UTILIZZATI PER LA PRODUZIONE DI PHA DAL SIERO DI LATTE | 26 |
| 4.1.2 SIERO DI LATTE: PRETRATTAMENTI | 27 |
| 4.1.3 ANALISI TECNICO-ECONOMICA DELLA PRODUZIONE DI PHA DAL SIERO DI LATTE | 32 |
| 4.1.4 ANALISI LCA (LIFE CYCLE ASSESSMENT)..... | 33 |
| 5.0 CONCLUSIONI | 34 |

1.0 INTRODUZIONE

Thompson et al., definiscono l'era che oggi stiamo vivendo come "l'era della plastica".

La produzione di plastica è notevolmente aumentata negli ultimi decenni, raggiungendo attualmente circa 350 milioni di tonnellate all'anno (PlasticsEurope, 2018).

I suoi molti vantaggi, rappresentati dalla durata, dalla flessibilità e dall'economicità, la rendono onnipresente e indispensabile nella vita quotidiana.

Tuttavia, vi sono prove crescenti che l'attuale uso e smaltimento porti ad un sostanziale inquinamento degli ecosistemi terrestri e acquatici.

Si stima che oltre 250.000 tonnellate di plastica galleggino in mare (Eriksen et al., 2014), influenzando negativamente sulla fauna marina e sugli esseri umani a causa dell'ingresso della microplastica (cioè particelle di plastica inferiori a 5mm) nella catena alimentare.

Inoltre, l'uso diffuso della plastica in agricoltura è stato postulato come una fonte rilevante di degrado del suolo attraverso la presenza di microplastiche.

Per di più, esperimenti di laboratorio dimostrano che la plastica è una fonte di cambiamento climatico antropogenico poiché la plastica più comunemente utilizzata potrebbe produrre gas serra se esposta alla luce solare.

Il rischio per la salute umana, associato all'uso di tale materiale, più studiato attualmente, è rappresentato dall'esposizione a sostanze chimiche dannose utilizzate come additivi per la plastica.

Oltre a ciò, le particelle di plastica possono fungere da veicoli di inquinanti persistenti (Peng et al., 2017).

Il potenziale pericolo per la salute umana potrebbe quindi derivare dall'assunzione di prodotti alimentari che sono stati a contatto con la plastica o contengono microplastica.

Le strategie di efficienza, come il riciclaggio, possono risparmiare risorse a prima vista, ma alla fine, possono portare a un cambiamento nel comportamento delle persone poiché consumano di più e quindi riducono il risparmio di risorse.

Il vero punto di svolta sta quindi nello studio e nell'impiego di materie bioplastiche, che permettano così di superare le problematiche di approvvigionamento e di smaltimento presenti nelle materie plastiche derivanti dal petrolio.

2.0 BIOPLASTICHE

2.1 GENERALITA'

Nella storia, i primi polimeri utilizzati dall'uomo sono stati di origine naturale. Tali polimeri erano ottenuti da fonti di energia rinnovabile. Una tra le risorse più sfruttate era il caucciù. Questo materiale, scoperto nel XVIII, si estrae dal lattice di alcune piante come per esempio l'*Hevea brasiliensis*.

Nel 1863 fu scoperta la celluloida, ad opera di John Welsey Hyatt, ma ben presto l'utilizzo di questo materiale fu abbandonato a causa della sua pericolosità.

Nel 1908 l'ingegnere svizzero Jacques Edwin Bradenberger inventò il cellophane, una pellicola sottile e trasparente composta da cellulosa.

Tale materiale è tutt'oggi molto utilizzato per imballaggi e confezioni alimentari.

Questi tre materiali sono tre esempi di bioplastiche.

Il caucciù (gomma naturale) è classificabile come polimero naturale.

La celluloida e il cellophane sono dei polimeri artificiali ma non sintetici perché derivano dalla lavorazione di materie prime naturali.

Nel 1926 Maurice Lemoigne scoprì il poliidrossibutirrato (PHB), che fu utilizzato come componente per la prima "bioplastica" prodotta dai batteri.

Negli anni '50 iniziarono ad essere sperimentate applicazioni commerciali di bioplastiche, ma tali sperimentazioni furono tralasciate a seguito del boom del petrolio. In questo periodo, infatti, la produzione e l'utilizzo delle plastiche petrolchimiche aumentarono in maniera esponenziale.

Le caratteristiche che favorirono lo sviluppo delle plastiche petrolchimiche furono il prezzo vantaggioso e la facilità d'uso mentre l'impatto critico di queste plastiche sull'ambiente non venne tenuto in considerazione.

Il settore delle bioplastiche iniziò a crescere realmente negli anni '90 quando furono avviate le prime produzioni industriali di PLA (acido polilattico) e di PHA (poliidrossialcanoati) e le plastiche a base di amido.

A partire dagli anni 90 il concetto di sostenibilità iniziò ad acquisire una maggiore importanza sul piano socioculturale e di conseguenza sul piano politico.

Riguardo ai polimeri bio-based e/o biodegradabili di ultima invenzione, in questi ultimi anni sono stati attuati vari studi. Tali studi analizzavano la diversificazione delle materie prime utilizzate per produrre questi materiali cercando di valorizzare scarti e rifiuti di diverse biomasse allo scopo di utilizzare in maniera efficiente ogni risorsa abbattendo i costi di produzione.

Con il termine bioplastica, in ultima analisi, non intendiamo un singolo materiale ma esso comprende una famiglia di materiali che possiedono diverse proprietà ed applicazioni.

L'esigenza di creare materiali alternativi alle plastiche di origine petrolchimica, individuando tecnologie produttive sostenibili, rappresenta la risposta ad una maggiore sensibilità mondiale in tema di tutela dell'ambiente e rappresenta l'irrinunciabile necessità della transizione verso uno sviluppo sostenibile nell'ottica di un'economia circolare. [European Bioplastics, report 2022]

Oggi è l'intero ciclo di vita del prodotto a rivestire un nuovo interesse. Non ci si focalizza solamente nel processo di produzione e nella convenienza economica ma inizia ad essere

fondamentale anche l'impatto ambientale del prodotto a fine utilizzo. Di conseguenza nasce l'esigenza di studiare nuovi materiali e le relative tecnologie di produzione.

L'associazione European Bioplastics, sancisce che il termine bioplastica comprende tutte le famiglie di materiali plastici originati da biomassa (bio-based), biodegradabili od entrambi. [European Bioplastics, report 2022]

Due concetti fondamentali sono il concetto di **bio-based** e **biodegradabile**. Il termine bio-based significa che il materiale o il prodotto è totalmente o parzialmente derivato da biomassa (piante). Il termine Biodegradabile si riferisce al processo chimico durante il quale i microrganismi presenti nell'ambiente trasformano i materiali in sostanze naturali come acqua, anidride carbonica, e biomassa (senza l'introduzione di additivi artificiali).

Questo processo è influenzato dalle condizioni ambientali e dal materiale.

I microrganismi presenti nell'ambiente riconoscono la plastica come cibo, dunque la consumano e la digeriscono. Il processo di biodegradazione comprende diverse fasi biotiche ed abiotiche. Il processo fondamentale è la mineralizzazione cioè la conversione da carbonio organico a carbonio inorganico.

La biodegradazione consiste nella completa assimilazione del materiale frammentato da parte dei microrganismi.

La biodegradazione può avvenire in condizioni aerobiche (presenza di ossigeno) e in condizioni anaerobiche (assenza di ossigeno).

In presenza di ossigeno i prodotti del processo sono anidride carbonica, acqua e biomassa, mentre in condizioni anaerobiche i prodotti sono metano, acqua e biomassa. [Figura 1](#)

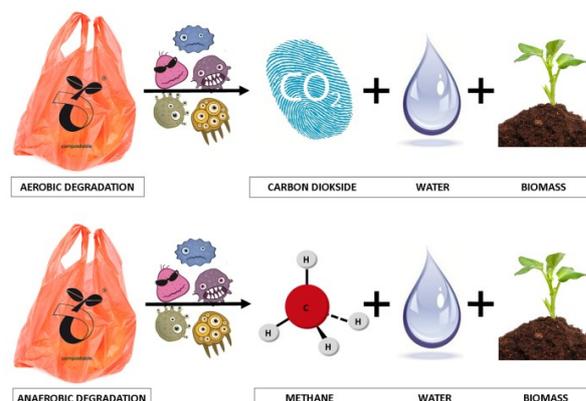


Figura 1 Biodegradazione in ambiente aerobico ed anaerobico [European Bioplastics, report 2022].

Possiamo suddividere le bioplastiche in tre gruppi a seconda delle loro caratteristiche:

- 1) Bioplastiche bio-based ma non biodegradabili come polietilene a base biologica (PE), polipropilene (PP), polietilene tereftalato (PET). Esse sono plastiche tradizionali non biodegradabili prodotte da risorse rinnovabili.
Per esempio, il "polietilene verde" derivato dall'etanolo.
L'etanolo viene convertito in etilene e a sua volta polimerizzato.
- 2) Bioplastiche bio-based e biodegradabili come acido polilattico (PLA), poliidrossialcanoati (PHA), polibutilene succinato (PBS) o diverse miscele di amido.
Tali plastiche possiedono la potenzialità di sostituire quelle di origine petrolchimica.
Le prime produzioni risalgono al 1995.

- 3) Plastiche ottenute da combustibili fossili e biodegradabili come il polibutilene adipato tereftalato (PBAT). Esiste l'obiettivo di produrle in futuro da fonti biologiche (in alcuni casi lo sono già).

Per illustrare questo tipo di classificazione la European Bioplastics ha introdotto un modello a due assi in cui possono essere inseriti tutti i tipi di plastica, e le loro combinazioni. **Figura 2**

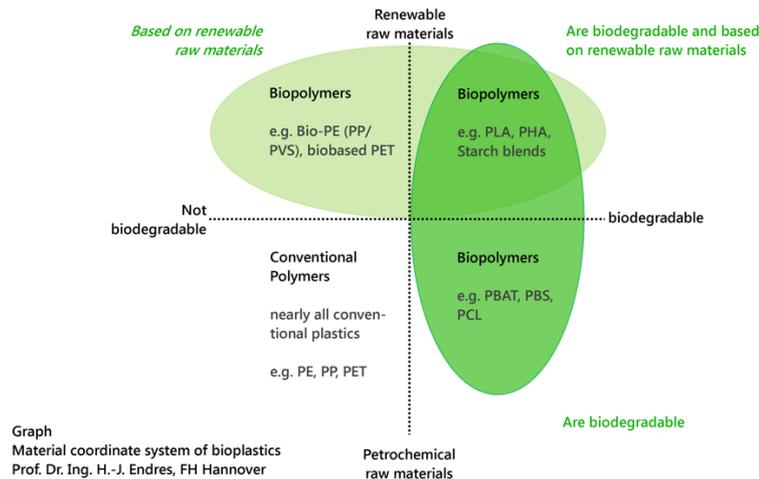


Figura 2 Classificazione plastiche secondo European Bioplastics [European Bioplastics, report 2022]

Queste bioplastiche offrono un'ampia gamma di funzionalità e sono ottimizzate per ogni tipo di applicazione. È possibile ottenere moltissimi prodotti utilizzando le tecnologie tradizionali della lavorazione della plastica. Ogni processo deve però essere adattato alle caratteristiche specifiche di ciascun polimero. Nel mercato esistono molte plastiche biodegradabili. Quelle che meritano maggiore attenzione sono i poliidrossialcanoati (PHAs), gli acidi polilattici (PLAs) e le miscele amido-polimero. [European Bioplastics, report 2022]

2.2 BENEFICI E MERCATO ATTUALE BIOPLASTICHE

La transizione dall'uso del petrolio greggio all'uso delle risorse rinnovabili è guidata principalmente dagli sforzi di sviluppo sostenibile dell'industria della bioplastica. Ridurre la dipendenza dal petrolio e mitigare gli effetti del cambiamento climatico sono quindi due driver fondamentali per l'utilizzo di risorse rinnovabili nella produzione di materie plastiche.

Le bioplastiche hanno il vantaggio unico rispetto le plastiche convenzionali di ridurre la dipendenza da risorse fossili e di ridurre le emissioni di gas serra. Sono prodotte da fonti rinnovabili anziché dal petrolio e di conseguenza rappresentano un potenziale sostituto delle plastiche petrolchimiche derivanti da fonti non rinnovabili. Le piante sequestrano l'anidride carbonica durante la loro crescita e la convertono in materia organica ricca di carbonio. Quando questi materiali vengono utilizzati nella produzione di bioplastiche, il carbonio viene immagazzinato all'interno dei prodotti durante la loro vita utile, che può essere prolungata se i prodotti vengono riciclati. Questo carbonio viene infine rilasciato nuovamente nell'atmosfera attraverso il recupero di energia o il compostaggio. Di conseguenza, le bioplastiche possono aiutare a ridurre le emissioni di gas serra per raggiungere nel 2050 l'obiettivo europeo della neutralità climatica. Le bioplastiche possiedono la capacità distintiva di ridurre le emissioni di gas serra o addirittura essere carbon neutral.

L'utilizzo di piante per produrre bioplastiche costituisce una rimozione temporanea di gas serra dall'atmosfera. Questa fissazione del carbonio può essere estesa per un determinato periodo di tempo a seconda se il materiale viene riutilizzato o riciclato più volte prima di essere utilizzato per il recupero di energia. Nel recupero energetico, la CO₂ precedentemente sequestrata viene rilasciata e viene prodotta energia rinnovabile. Le bioplastiche sono infatti materiali dotati di una tecnologia produttiva efficace non solo per il prodotto stesso e per il proprio utilizzo ma efficace anche a seguito della fine dell'uso del prodotto. Le plastiche di origine petrolchimica a fine del proprio utilizzo rappresentano un serio problema perché non essendo biodegradabili si accumulano negli oceani formando estese discariche di rifiuti galleggianti. Inoltre, si stima che solo il 9% della plastica totale venga riciclata.

L'industria della plastica è un settore giovane e innovativo che riveste un enorme potenziale economico ed ecologico nell'ottica di un'economia circolare a basse emissioni di carbonio utilizzando le risorse in modo più efficiente. L'UE ha iniziato a riconoscere i numerosi vantaggi di tale produzione e sta destinando fondi e risorse alla ricerca e allo sviluppo di questo settore. I fattori che guidano lo sviluppo del mercato sono sia interni che esterni.

Nell'ambito dei fattori esterni possiamo osservare che sempre più consumatori, consapevoli della necessità di diminuire l'uso di plastiche derivate dai combustibili fossili, sono favorevoli all'acquisto di opzioni di prodotti sostenibili. Inoltre, le fluttuazioni dei prezzi dei materiali derivanti da combustibili fossili portano alla necessità di ridurre la dipendenza dalle risorse non rinnovabili.

Le bioplastiche rappresentano, di conseguenza, una soluzione irrinunciabile.

La consapevolezza a livello mondiale della necessità di una transizione verso uno sviluppo sostenibile è sempre maggiore.

Dal punto di vista dei fattori interni è ormai evidente che le sono materiali efficienti dal punto di vista tecnologico oltre che dal punto di vista della sostenibilità. Le analisi del ciclo di vita dimostrano che alcune bioplastiche sono in grado di ridurre significativamente le emissioni di CO₂ rispetto alle plastiche convenzionali.

Inoltre, il crescente utilizzo delle bioplastiche rappresenta un passo avanti verso un'economia circolare, cioè un sistema economico ideato per potersi rigenerare da solo garantendo dunque anche la propria eco sostenibilità. Oggi esiste una bioplastica alternativa quasi tutti i materiali plastici convenzionali. Le bioplastiche ormai non costituiscono più solo un mercato di nicchia ma si stanno sempre maggiormente radicando nel mercato globale di massa.

L'attuale mercato delle bioplastiche è caratterizzato da un tasso di crescita dinamico e da una forte diversificazione nella produzione. Anche se le bioplastiche rappresentano ancora meno dell'1% delle circa 367 milioni di tonnellate di plastica prodotte annualmente in tutto il mondo il mercato delle bioplastiche sta crescendo in modo molto dinamico. [European Bioplastics, report 2022].

Nel 2021 la produzione di bioplastiche è ammontata a 2,714 milioni di tonnellate e si prevede che nel 2026 la produzione raggiungerà la 7,593 di tonnellate [European Bioplastics, report 2022] (figura 3).

Con un numero crescente di materiali, applicazioni e prodotti, anche il numero di produttori, convertitori e utenti finali è in costante aumento.

Ingenti investimenti finanziari sono stati fatti nella produzione e commercializzazione per guidare e promuovere questo sviluppo.

Grandi aziende tra cui Danone, Coca-Cola, PepsiCo, Heinz, Tetra Pak, Unilever e L'Occitane si sono indirizzate all'uso di prodotti in bioplastica nell'ambito dell'imballaggio dei loro prodotti.

Nel settore automobilistico aziende come Ford, Mercedes, VW, Toyota hanno lanciato o integrato la produzione di alcune componenti utilizzando bioplastica.

La bioplastica, di conseguenza, utilizzata da marchi importanti che guidano lo sviluppo a livello mondiale, sta penetrando il mercato a ritmi sostenuti. [European Bioplastics, report 2022]

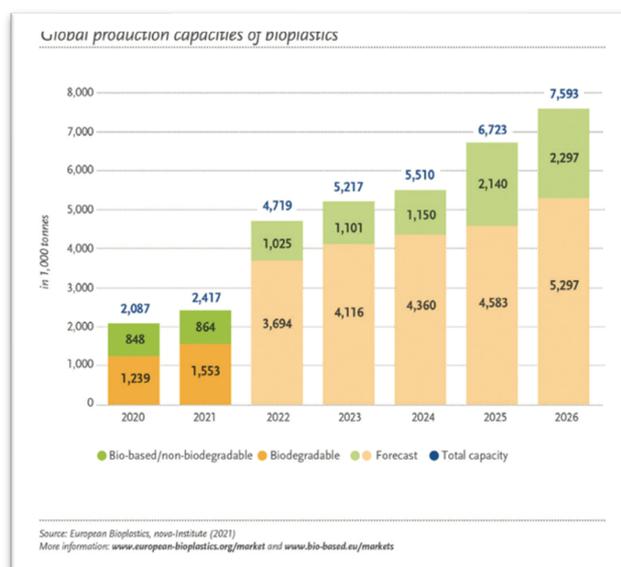


Figura 3 Produzione globale bioplastiche [European Bioplastics, report 2022]

Per quasi tutti i materiali plastici convenzionali esiste un'alternativa bioplastica disponibile che offre le stesse o in alcuni casi migliori proprietà e funzionalità.

Tutto ciò però non è sufficiente ma sono estremamente necessarie delle misure politiche o degli incentivi normativi per incoraggiare e promuovere l'ingresso delle bioplastiche sul mercato globale.

Un fattore che, sicuramente, non gioca a favore della diffusione delle bioplastiche è il prezzo poiché il costo di produzione è assai maggiore del costo di produzione delle plastiche convenzionali.

Tuttavia, è importante osservare che i prezzi in questi ultimi anni stanno diminuendo continuamente.

Poiché sempre più imprese stanno passando all'utilizzo di bioplastiche; molti sforzi sono stati fatti riguardo le capacità produttive; i processi di produzione stanno quindi diventando sempre più competitivi ed efficienti.

A seguito dell'aumento della domanda e dell'innovazione dei processi; del crescere del volume di produzione; del prezzo del petrolio, previsto nuovamente in rialzo, il costo delle bioplastiche sarà presto paragonabile a quello della plastica convenzionale. [European Bioplastics, report 2022].

Oggi le Bioplastiche vengono utilizzate principalmente nei seguenti settori di mercato.

- Packaging
- Servizi alimentari
- Agricoltura e orticoltura
- Elettronica di consumo
- Automotive e trasporti

- Beni di consumo ed elettrodomestici
- Edilizia
- Fibre

Secondo l'ultima analisi di European Bioplastics del 2021 circa il 48% delle bioplastiche prodotte viene utilizzato nel settore del packaging.

L'Agenzia tedesca per le risorse rinnovabili (FNR) e lo Straubing Center of Science (2009), indicano che i consumatori vogliono vedere più prodotti realizzati con bioplastiche sul mercato.

Tuttavia, i consumatori non sono sempre molto ben informati sulla natura e le caratteristiche delle bioplastiche. Questo porta ad alcuni fraintendimenti ed aspettative errate sulla natura e l'uso delle bioplastiche e di conseguenza rappresenta una sfida per la penetrazione delle bioplastiche nel mercato. Gli sforzi congiunti effettuati dall'industria e dai marchi delle bioplastiche volti a descrivere correttamente le caratteristiche dei materiali e dei prodotti bioplastici stanno tuttavia contribuendo a una maggiore consapevolezza e ad una migliore comprensione delle bioplastiche da parte dei consumatori.

2.3 STRATEGIE EUROPEE FAREVOLI ALLO SVILUPPO DELLE BIOPLASTICHE E LE CERTIFICAZIONI

Il 16 gennaio 2018 la Commissione Europea ha elaborato un piano di azione esposto nella "Strategia europea per la plastica verso un'economia circolare". Tale strategia rappresenta un passo ambizioso per rendere il sistema europeo, nell'ambito della produzione e dell'uso della plastica, più efficiente sotto il profilo delle risorse. Di conseguenza, si possono mettere le basi del passaggio da un'economia lineare ad un sistema di economia circolare.

Le bioplastiche costituiscono un punto cruciale per l'innovazione e lo sviluppo di un'economia sostenibile che si basa sull'impiego di materie prime alternative, derivanti da fonti di energia rinnovabili, e sull'offerta di una gamma più ampia di opzioni di fine vita per i prodotti in bioplastica.

Questi vantaggi sono stati riconosciuti nella comunicazione della Commissione Europea. Tuttavia, la proposta non suggerisce misure legislative concrete al fine di sfruttare questi vantaggi.

European Bioplastics (EUBP) invita il Parlamento europeo e il Consiglio Europeo ad ampliare l'approccio della Commissione introducendo azioni concrete per consentire alle bioplastiche di dispiegare tutto il loro potenziale, contribuendo così a un'economia della plastica in evoluzione.

Attualmente, non esiste una legislazione in vigore, a livello dell'UE, specificatamente concepita per il settore delle bioplastiche. Pertanto, le implicazioni del nuovo quadro politico per il settore delle bioplastiche saranno estremamente importanti.

Il sostegno Europeo alle bioplastiche può essere individuato all'interno di diverse strategie europee di massimo livello:

- EU Bioeconomy strategy (2018)
- EU plastic strategy (2018)
- EU green deal (2019)
- New Eu circular Economy Action Plan (2020)
- EU climate law (2021) & EU Taxonomy (2020)
- Waste Framework directive (review 2023).

Altre politiche di interesse rilevante

- Single-Use Plastic Directive (2019)
- Eu rules on recycled plastics for food-contact materials

La strategia Europea più importante è rappresentata dal Green Deal.

L'obiettivo del Green Deal è quello di arrivare nel 2050 alla neutralità climatica, cioè zero emissioni di gas serra.

Il piano prevede la revisione di ogni legge esistente e l'introduzione di nuove normative in materia di economia circolare, ristrutturazione, biodiversità, agricoltura e innovazione.

In questo quadro di iniziative sostenibili è presente anche un piano d'azione per quanto riguarda il settore della plastica, in particolare i prodotti sostenibili.

Tuttavia, secondo European Bioplastics la Commissione Europea dovrebbe concentrarsi maggiormente su percorsi innovativi che riguardano la progettazione di nuovi materiali che possono concretamente aiutare a raggiungere la neutralità climatica invece che soffermarsi solamente sulle disposizioni obbligatorie per il riciclaggio della plastica.

E' necessaria una maggiore attenzione e un più deciso sostegno nel promuovere l'utilizzo di materie prime sostenibili come per esempio l'uso di scarti alimentari nel processo di produzione delle bioplastiche. In tal modo sarà possibile ridurre la dipendenza dalle fonti di energia non rinnovabili ma anche valorizzare gli scarti biologici in quanto verranno riutilizzati.

[European Bioplastics, report 2022]

Per concludere, European Bioplastics ha identificato dei punti chiave che dovranno essere discussi, sia a livello politico che normativo, per permettere al settore delle bioplastiche di esprimere il suo pieno potenziale.

Questi punti chiave sono:

- a) Garantire l'accesso a materie prime agricole a prezzi competitivi in quantità e qualità sufficienti.
- b) Fornire supporto finanziario e politico attraverso meccanismi di mercato oppure programmi di investimento nazionali. L'Europa dovrebbe incoraggiare una maggiore progettazione e produzione di prodotti a base biologica.
- c) Sensibilizzare e informare i consumatori sull'importanza di una transizione verso un'economia circolare a base biologica e sui vantaggi e sul ruolo essenziale delle bioplastiche

Attualmente non esiste ancora un determinato valore soglia che definisce il contenuto minimo di carbonio a base biologica necessario per definire un materiale come bioplastica.

Non esiste ancora un accordo comune a causa delle diverse normative regionali in Europa.

In Giappone è stato stabilito il valore soglia del 25% di sostanza rinnovabile presente nel materiale.

Sebbene non esista un valore minimo di sostanza rinnovabile approvato a livello generale, gli organismi di standardizzazione hanno sviluppato degli standard specifici per quanto riguarda il settore delle bioplastiche allo scopo di contrastare la grande quantità di informazioni fuorvianti riguardo le cosiddette "plastiche verdi".

Gli standard sono un insieme di requisiti che un prodotto o un servizio deve soddisfare. Esistono due principali gruppi di standard:

- Specifiche standard: insieme di requisiti che un prodotto deve soddisfare utilizzando una determinata etichetta. La EN 13432 è un esempio di specifica standard per gli imballaggi compostabili. Per ottenere questo standard è necessario soddisfare diversi

requisiti molto specifici. Per esempio, in 180 giorni il 90% della massa del polimero deve trasformarsi in CO₂.

- Metodi di prova, tecniche di valutazione. I metodi di prova descrivono in che modo realizzare i test e come validarli. Nella specifica standard è indicato il particolare metodo a cui fare riferimento per realizzare il test allo scopo di analizzare le specifiche caratteristiche di un prodotto compostabile.

La Germania rappresenta il primo paese ad avviare un sistema di certificazione delle plastiche biodegradabili. I più importanti sistemi di certificazione attualmente attivi in Europa sono gestiti da DIN CERTCO (membro dell'istituto di normazione tedesco DIN) e VINCOTTE. (Figura 4) Il sistema DIN CERTCO è adottato da Germania, Svizzera, Paesi Bassi, Regno Unito e Polonia. Il sistema VINCOTTE agisce a livello internazionale attraverso gli uffici in Belgio e in Italia. [European Bioplastics, report 2022] In Italia dal 2007 i certificati di prodotto compostabile sono rilasciati dal Comitato Italiano Compositori CIC, sulla base dei risultati della verifica dei requisiti effettuati dall'ente di certificazione Certiquality. Sia DIN CERTCO che VINCOTTE rilasciano il marchio prodotto compostabile (a forma di piantina = seedling) registrato da European Bioplastics e conferito a prodotti e materiali che soddisfano i requisiti previsti dalla certificazione [European Bioplastics, report 2022]

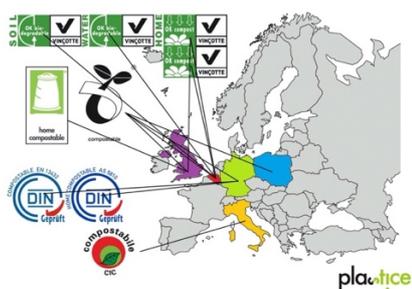


Figura 4 Sistemi di certificazione delle plastiche compostabili in Europa [European Bioplastics, report 2022],

Questo marchio garantisce che il prodotto è biodegradabile e compostabile a livello industriale, dunque può essere smaltito insieme ai rifiuti organici. Inoltre, VINCOTTE e DIN CERTCO hanno elaborato anche schemi di certificazione per il compostaggio domestico. Il compostaggio domestico è un processo più difficile e lento di quello industriale a seguito dei volumi più ridotti e delle temperature decisamente più basse e meno costanti. Questi schemi di certificazione “domestici” garantiscono la completa biodegradabilità del prodotto plastico nell’insieme del compost domestico (Figura 5).



Figura 5 Logo compostabilità DIN CERTCO, Vincottes OK COMPOST.

VINCOTTE ha messo a punto schemi di certificazione anche per la biodegradazione in acqua e nel suolo, i cui rispettivi marchi sono riportati in Figura 6



Figura 6 Marchi di certificazione per il compostaggio domestico.

2.4 CLASSIFICAZIONE BIOBASED POLYMER

I Biobased Polymers sono quindi dei polimeri prodotti a partire da risorse rinnovabili.

La prima generazione di biopolimeri scoperta è costituita dai biopolimeri ottenuti da substrati agricoli, ad esempio: mais, patate e altri tipi di carboidrati.

Negli ultimi anni la maggior parte delle ricerche si sono spostate verso il settore della biotecnologia.

Esistono tre vie principali per produrre polimeri a base biologica utilizzando le risorse rinnovabili (figura 7):

1. Produzione di polimeri a base biologica direttamente dai batteri.
All'interno di questa categoria troviamo:
i poliidrossialcanoati (PHA), una famiglia di poliesteri prodotti attraverso la via metabolica della fermentazione batterica.
Il poliidrossibutirrato (PHB), il PHA più semplice, fu scoperto nel 1926 da Maurice Lemoigne come costituente del *Bacillus megaterium*.
2. Produzione di polimeri a base biologica mediante l'utilizzo di biopolimeri naturali con modificazione parziale per soddisfare i requisiti richiesti.
Questo gruppo è costituito da polimeri presenti in natura come cellulosa, amido, chitina e vari polisaccaridi e proteine.
Questi materiali e i loro derivati offrono una vasta gamma di proprietà e applicazioni.
3. Produzione di biopolimeri mediante sintesi chimica partendo da monomeri naturali presenti in diversi carboidrati.
Attualmente l'acido polilattico (PLA) mostra il più alto potenziale per produrre materiali di imballaggio rinnovabili.
È possibile produrre l'acido polilattico partendo dall'amido presente nel mais.
Dall'acido lattico attraverso la polimerizzazione chimica si ottengono i PLA.
Utilizzando circa 1,7 kg di amido è possibile ottenere 1 kg di PLA.

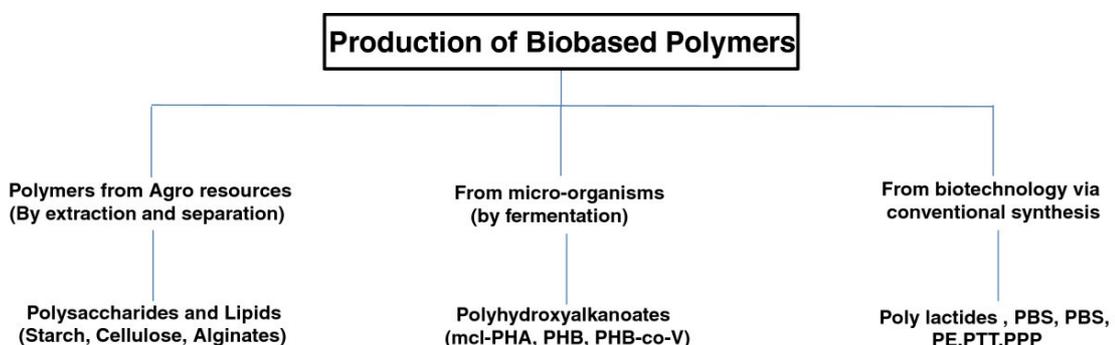


Figura 7 Classificazione biobased polymers

3.0 POLIIDROSSIALCANOATI

Una delle categorie di bioplastiche che secondo la comunità scientifica possiede un enorme potenziale è rappresentata dai poliidrossialcanoati (PHA), i biopolimeri più noti.

Nel 1926 il ricercatore francese Lemoigne scoprì il poliidrossibutirrato (PHB) come costituente del *Bacillus megaterium*.

Nel 1958, Macrae e Wilkinson furono in grado di dimostrare che i PHA nelle cellule batteriche svolgono il ruolo di accumulo di carbonio ed energia.

Questi poliidrossialcanoati sono sintetizzati da più di 90 specie batteriche e vengono prodotti in condizioni di assenza di micronutrienti e in stato di eccesso di carbonio.

Costituiscono una riserva energetica.

Nel 1959, nacquero diverse imprese che avevano lo scopo di produrre PHA utilizzati per ottenere bioplastiche indipendenti dalle fonti di energia non rinnovabili (Mozejko-Ciesielka e Kiewisz, 2016).

Attualmente il mercato dei PHA è molto ristretto.

I produttori però vedono un forte potenziale in questo biomateriale, affermando che i PHA rappresentano una nuova generazione di biopolimeri e il loro mercato necessita di tempo per svilupparsi ed espandersi (Aeschelmann e Carus, 2015).

Sono stati scoperti circa 150 monomeri di PHA. Questa elevata varietà consente la produzione di biopolimeri con proprietà diverse, adattati per applicazioni specifiche.

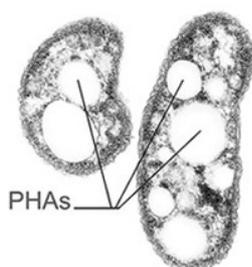


Figura 8 Micrografia elettronica di una sezione sottile di cellule di un batterio che contiene granuli di PHB.

La struttura dei poliidrossialcanoati è costituita da poliesteri lineari contenenti monomeri di idrossiacidi (HA) uniti tra loro da un legame estere. Figura

Questo legame si forma tra il gruppo carbossilico di un monomero e il gruppo idrossilico del monomero vicino (Philip et al., 2007).

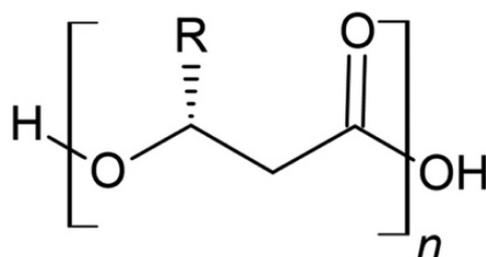


Figura 9 PHAs struttura generale.

A seconda del numero di atomi di carbonio presenti nei monomeri, i PHA possono essere classificati in tre gruppi:

1. Scl-PHAs contengono tra i 3 e 5 atomi di carbonio e sono sintetizzati da diversi batteri come *Cuprivadus nector*.
All'interno di questa categoria troviamo il poli(3-idrossibutirrato) e il poli(4-idrossibutirrato).
2. Mcl-PHAs contengono monomeri aventi dai 6 – 14 atomi di carbonio e sono sintetizzati principalmente dalla specie *Pseudomonas*.
3. Lcl-PHAs composti da monomeri con più di 14 atomi di carbonio.

I PHA naturali, da diverso tempo, stanno attirando l'attenzione in molti settori: imballaggi, alimentare, medico, chirurgico, agricolo, farmacologico e gestione dei rifiuti (Rydz et al., 2015; Philip et al., 2007).

Le cellule vegetali sono in grado di produrre solo una piccola quantità di PHA. Nei batteri, i PHA possono accumularsi al 90% del peso secco della cellula (Verlinden et al., 2007).

3.1 PROPRIETA' PHAs

I PHAs sono caratterizzati da una grande varietà di caratteristiche fisiche, possiamo osservare PHA fragili per poi arrivare a materiali morbidi ed appiccicosi.

Queste proprietà dipendono dalla lunghezza della catena alifatica laterale.

Tra le caratteristiche fondamentali sono incluse: insolubilità in acqua, resistenza, degradazione idrolitica, scarsa resistenza in ambienti acidi e basici.

La densità dei PHA consente loro di sprofondare in ambiente acquatico, facilitando la loro degradazione anaerobica in sedimenti bioattivi.

Una caratteristica molto importante che influisce a livello fisico e chimico del polimero è la cristallinità.

Le materie plastiche sono costituite da lunghe catene polimeriche; il grado di cristallinità nei materiali polimerici è maggiore se tali catene polimeriche sono lineari e non sono presenti gruppi funzionali stericamente ingombranti.

Il primo PHA scoperto fu il poli- β -idrossibutirrato (PHB).

La struttura del PHB consiste in uno scheletro carbonioso 3-C ed ospita un sostituente metilico in posizione 3. Esso è un polimero rigido. Il suo punto di fusione varia tra i 168°C e 182°C, la temperatura di transizione vetrosa è intorno ai 2-4°C (Bellini et al., 2022).

La temperatura di transizione vetrosa (T_g) rappresenta il valore di temperatura al di sotto del quale un materiale amorfo si comporta da solido vetroso.

Il PHB presenta una densità di circa 1,18-1,26 g*cm³ (Georgios et al., 2016).

Grazie a queste caratteristiche può essere facilmente utilizzato in diversi settori. In particolare, il PHB è già diffuso nel settore dell'imballaggio, dove viene impiegato per realizzare sacchetti, posate usa e getta in bioplastica, nel packaging alimentare e anche per scopi biomedici (Bugnicourt et al., 2014).

Nonostante queste proprietà interessanti, il PHB è anche noto per avere un alto grado di cristallinità e per essere fragile e rigido (Chee et al., 2000).

Il PHB presenta una bassa duttilità e una capacità di lavorazione limitata.

La copolimerizzazione del PHB con PHA può essere un mezzo per diminuirne la cristallinità e migliorarne le proprietà meccaniche.

La copolimerizzazione di PHB con il 5-20 di unità di acido-3-idrossivalerico produce il PHBV, un copolimero che possiede delle caratteristiche meccaniche migliorate e resistenza alla trazione.

Tuttavia, il polimero PHBV dal punto di vista della fragilità non è migliorato.

La fragilità del PHB e del PHBV è causata da una combinazione di diversi fattori come la temperatura di transizione vetrosa e le caratteristiche microstrutturali.

Il PHB, oltre alla sua bassa duttilità e al contemporaneo costo elevato, è termicamente instabile e di conseguenza la massa molare e la viscosità diminuiscono durante la lavorazione. Diversi studi si stanno focalizzando sullo sviluppo di nuovi monomeri e nuove composizioni polimeriche. Lo scopo è quello di ottenere copolimeri più commerciali e con maggiori prestazioni per le applicazioni industriali (Demetres et al., 2021).

Per esempio, sono stati ottenuti diversi copolimeri a seguito dell'aggiunta di monomeri scl o mcl al PHB.

Inoltre, un nuovo mezzo che si sta sperimentando per cercare di produrre biopolimeri sempre più competitivi è l'utilizzo dell'ingegneria genetica cioè la modificazione a livello del DNA dei ceppi batterici produttori di PHA per far ottenere determinate caratteristiche al polimero.

In Figura 10, sono illustrate le principali caratteristiche dei PHA più comunemente utilizzati in confronto al polipropilene (Georgios et al., 2016; Verlinden et al., 2007).

| Parameters | Conventional plastic | Biopolymers | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-------------|-----|-------|-------|
| | PP | PHB | PHV | PHB4B | PHB4x |
| Melting temperature (°C) | 170 | 168-182 | 145 | 150 | 127 |
| Cristallinity (%) | 50-70 | 60 | 56 | 45 | 34 |
| Glass transition temperature (C°) | -10 | 2-4 | -1 | -7 | -1 |
| Extension to break (%) | 400 | 5 | 50 | 444 | 400 |
| Tensile strength (Mpa) | 38 | 43 | 20 | 26 | 21 |

Figura 9 Proprietà chimico fisiche PP a confronto ai PHAs

I PHA più comunemente commercializzati sono copolimeri di PHB e PHV combinati con plastificanti e additivi inorganici.

Sebbene questi PHA siano significativamente più costosi dei polimeri che si possono estrarre da biomassa, potrebbero portare importanti novità per l'abbattimento dei costi, attraverso la possibilità di utilizzare come fonti di carbonio scarti alimentari ricchi di materiale organico.

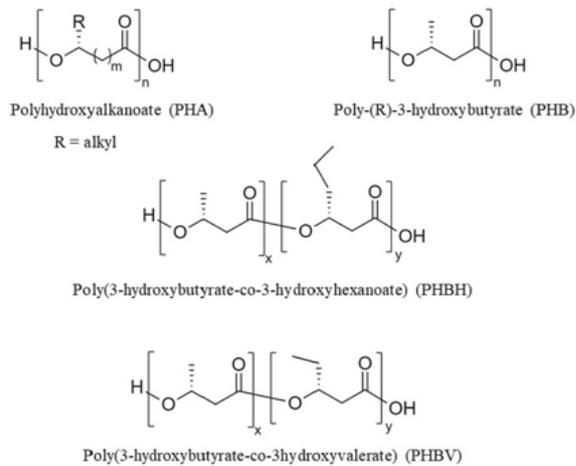


Figura 10 Principali PHAs.

3.2 SINTESI ED ESTRAZIONE PHAs

I PHA possono essere prodotti da diversi microrganismi. Si ottengono da batteri del genere *Azonacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, capaci di trasformare i substrati direttamente in plastica accumulandola al loro interno sotto forma di granuli citoplasmatici come materiale di riserva cellulare.

La via biosintetica dei PHA è comunemente collegata a tutte le vie metaboliche centrali del batterio, come glicolisi, ciclo di Krebs, ciclo di Calvin, β -ossidazione, e sintesi degli acidi grassi (Chen et al., 2015).

Le tre vie di biosintesi sono:

- Percorso dall'acetil-CoA a 3-idrossibutiril-CoA. Questo processo è costituito da una serie di reazioni. Inizialmente due molecole di acetil-CoA generate da uno zucchero oppure amminoacido vengono convertiti ad acetoacetil-CoA. Successivamente l'enzima acetoacetil-CoA reductasi produce l'idrossibutiril-CoA. Infine, l'enzima PHA sintasi agisce sull'idrossibutiril-CoA producendo il PHB. Questa via è tipicamente utilizzata da *Cupriavidus nector*. (Wang et al., 2018)
- Percorso attraverso la β -ossidazione. Questo processo utilizza i prodotti intermedi del ciclo della β -ossidazione per sintetizzare mcl-PHA utilizzando gli acidi grassi come fonte di carbonio. Questa via è tipicamente utilizzata da *Pseudomonas putida* (Chee., et al 2010)
- Percorso attraverso la via di sintesi degli acidi grassi tipicamente utilizzato da *Pseudomonas aeruginosa*.

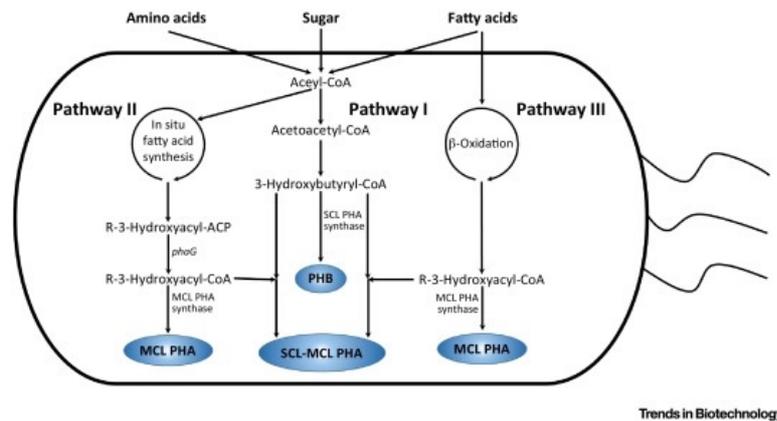


Figura 11 Principali meccanismi di sintesi dei PHAs.

Nel corso di questi ultimi anni di ricerche sono stati elaborati diversi processi che consistono nell'utilizzo di ceppi batterici per la produzione di PHA mediante la via metabolica della fermentazione e la successiva estrazione di questi composti attraverso metodo biologico o estrazione chimica.

3.2.1 SINTESI PHAs

La fase principale è costituita dall'inserimento di colture batteriche pure oppure colture batteriche miste all'interno di un reattore di fermentazione.

All'interno di questo recipiente di fermentazione è presente un terreno di coltura costituito da rifiuti organici, cellulosici, olii vegetali, rifiuti solidi e acidi grassi a seconda dello specifico PHA richiesto.

Una volta inserito il tutto si attende l'esaurimento delle sostanze nutritive e si attende fino a quando l'accumulo di PHA raggiunge il livello massimo.

Questo processo richiede circa 48 ore.

I PHA vengono sintetizzati e accumulati in condizioni di stress ed eccesso di carbonio.

I poliidrossialcanoati vengono accumulati a livello intracellulare sotto forma di granuli nel citoplasma delle cellule batteriche.

La fase successiva consiste nella concentrazione delle cellule e l'estrazione (Kathiraser et al., 2007).

3.2.2 ESTRAZIONE PHAs

L'estrazione consiste nel recuperare dal citoplasma batterico i PHA accumulati durante la fermentazione.

Pertanto, è essenziale rompere la parete cellulare per estrarre i PHA.

Un recupero efficace dei PHA dai componenti di biomassa può essere complicato e costoso.

Si stima che fino al 50% dei costi di produzione del polimero siano imputati al processo di estrazione (Fiorese et al., 2009).

Numerose tecnologie di estrazione/separazione sono state sviluppate su piccola scala e su scala industriale.

I metodi di estrazione chimica sperimentati sono:

- Estrazione con solvente chimico
- Digestione chimica
- Rottura del fluido super critico
- Trattamento enzimatico
- Detergenti
- Flottazione
- Irradiazione

La tabella 1 illustra i diversi metodi convenzionali di estrazione chimica, i ceppi batterici utilizzati, il processo e gli svantaggi (Boey et al., 2021).

Tabella 1 Metodi convenzionali di estrazione dei PHAs (Boey et al., 2021).

| Metodo di estrazione | Microrganismo utilizzato | Condizioni di estrazione | Svantaggi | Purezza PHAs (%) |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|---|------------------|
| Estrazione tramite solvente | <i>C.necator</i> | Cloroformio 1g:100mL Agitare per circa 5 giorni | -Consumo di elevati volumi di solventi tossici e volatili -processo non rispettoso per l'ambiente -processo lungo -alto costo | 95 |
| Digestione chimica | <i>E.coli (ricombinante)</i> | Ipoclorito di sodio 30°C per 1h | -Basso grado di purezza PHAs -elevato volume acque reflue -grave degradazione del polimero -necessario trattamento per rimuovere tensioattivo dalle acque reflue | 93 |
| Rottura fluido supercritico | <i>C.necator</i> | Fluido supercritico CO ₂ , 100min, 200 atm, 40°C e 0,2 ml di metanolo | -dipende dai parametri di processo -necessita di frequente pulizia -difficoltà nell'estrazione di analiti polari | 89 |
| Trattamento enzimatico | <i>Sinorhizobium meliloti</i> | <i>Microbispora</i> sp. E cloroformio | -elevato costo degli enzimi -processo complesso | 94 |
| Tecnica flottazione | <i>Zobellella denitrificans MW1</i> | Cloroformio, 30°C 72h, auto-flottazione della cellula | -elevato consumo di solventi tossici e volatili | 98 |
| Radiazioni gamma | <i>Bacillus flexus</i> | Radiazioni con intensità 10-40 kGy | -necessita di un tempo di irradiazione elevato -alto costo di investimento iniziale | |

Tra i metodi di recupero citati, l'estrazione con solvente mediante cloroformio è il metodo di estrazione preferito per i PHA.

In questo processo di estrazione ci sono due fasi fondamentali, la prima consiste nel rompere la parete cellulare, mentre la seconda è costituita dall'estrazione del polimero (Fiorese et al., 2009).

L'estrazione con solvente non è complessa rispetto agli altri metodi ed è molto efficace per estrarre i granuli di PHB (Chee et al., 2010).

Tuttavia, ci sono diversi svantaggi dell'estrazione mediante solvente.

Questo processo comporta l'uso di grandi volumi di solvente tossico e volatile che serve a modificare la permeabilità della membrana cellulare (Ong et al., 2018).

Inoltre, l'elevata quantità di solvente che richiede questa estrazione incide fortemente sul costo del processo e quindi sul costo di produzione totale.

Un metodo alternativo di estrazione può essere rappresentato dal metodo di digestione chimica, cioè trattare la biomassa con ipoclorito di sodio a 30°C per un'ora.

Il metodo di digestione chimica presenta inconvenienti come la degradazione delle molecole di PHB, un grande volume di acque reflue e il trattamento necessario per rimuovere il tensioattivo dalle acque (Jacquel et al., 2008).

I metodi di estrazione chimica, ampiamente utilizzati per l'estrazione dei PHA nelle applicazioni industriali, causano un forte aumento dei costi di produzione, inoltre causano degradazione dei polimeri e problemi ambientali.

I ricercatori in questi ultimi anni, allo scopo di superare questi problemi, stanno focalizzando i loro studi nella sperimentazione dei metodi di estrazione biologica.

L'idea della bio-estrazione implica l'uso di organismi viventi atti ad estrarre il polimero dalle cellule.

Diversi approcci biologici sono stati studiati e moltissimi sono in studio tutt'ora. Ad esempio, un metodo consiste nel fornire agli animali ed insetti le cellule contenenti PHA come alimento. Il polimero non verrà digerito dagli animali e verrà secreto come pellet fecale (Murugan et al., 2016).

Attualmente sono in corso sperimentazioni che riguardano l'uso di ratti sprague Dawley oppure l'utilizzo di dei vermi della farina per l'estrazione dei PHA allo scopo di ridurre al minimo l'utilizzo di solventi chimici (Kunasudari et al., 2013).

È stato scoperto che i vermi della farina ingeriscono le cellule di *C. nector* contenenti PHA e successivamente queste cellule vengono espulse tramite le feci.

La purezza del PHA estratto biologicamente e successivamente lavato con acqua è di circa l'89%.

L'utilizzo dell'intestino di insetti, tra cui il verme della farina, come metodo biologico per purificare i PHB, ci può consentire di evitare la metodologia che prevede l'uso di solvente chimico (Murugan et al., 2016).

Questo metodo, se utilizzato in scala industriale, potrebbe ridurre il costo di produzione dei PHB a seguito del minore utilizzo dei solventi chimici.

Questa bio-estrazione è un approccio alternativo e sostenibile.

Il polimero PHB può essere ulteriormente purificato con un metodo ecologico, utilizzando acqua, idrossido di sodio o una bassa concentrazione di tensioattivi. A seguito delle sperimentazioni si è osservato che il peso molecolare del PHB, recuperato biologicamente, è paragonabile al PHB estratto con cloroformio. (Ong et al., 2018).

3.3 BIODERADAZIONE PHAs

Una delle proprietà più interessanti dei PHA è rappresentata dalla loro biodegradabilità e dalla natura non tossica dei prodotti di degradazione.

La biodegradazione è la degradazione di un composto attraverso processi enzimatici, in genere per azione di microrganismi quali batteri e funghi (Wang et al., 2018). Sono stati condotti studi sulla biodegradazione di PHB e P(HB-co-HHx) in un'ampia gamma di condizioni naturali e controllate come suolo, paludi di mangrovie, acque di fiume, acqua di mare, fanghi attivi, fanghi anaerobici e compost aerobico e anaerobico.

I PHAs sono in grado di degradarsi rapidamente in ambienti aerobici, anaerobici e salini.

Nel caso della biodegradazione in condizioni aerobiche, i prodotti finali di PHB e P(HB-co-HHx) sono anidride carbonica e acqua, mentre in condizioni anaerobiche i prodotti di degradazione sono metano, acqua e biomassa (Muhammadi et al., 2015).

La biodegradabilità dei PHA è influenzata da molti fattori:

- Fattori climatici (umidità e temperatura)
- Condizioni suolo (pH, disponibilità nutrienti e ossigeno)
- Consorzio batterico e fungino
- Proprietà chimico-fisiche del polimero (area superficiale, composizione chimica, peso e grado di cristallinità)

Precedenti studi hanno rivelato che la biodegradazione dei PHAs dipende dalla lunghezza della catena laterale.

I PHA con una catena laterale più lunga mostrano un alto tasso di biodegradazione rispetto ai PHA con catena corta (Li et al., 2007).

Inoltre, Mergaert e colleghi hanno dimostrato che i copolimeri di PHA possiedono un tasso di biodegradazione più elevato rispetto agli omopolimeri.

La biodegradazione dei PHA è catalizzata dalle PHA depolimerasi intracellulari ed extracellulari.

Le depolimerasi PHA intracellulari sono sintetizzate dai batteri produttori di PHA.

Invece le PHA depolimerasi extracellulari sono prodotte da altri microrganismi.

Questi microrganismi degradano il PHA che viene rilasciato dalle cellule a seguito della morte e lisi cellulare.

Si è scoperto che ceppi di batteri, funghi e alghe sono in grado di sintetizzare queste PHA depolimerasi extracellulari (Martínez, et al., 2015).

Diversi ricercatori hanno dimostrato che il PHB, essendo un'omopolimero, caratterizzato da una struttura regolare ed un'elevata cristallinità, possiede un tasso di biodegradazione minore rispetto agli altri PHAs e rispetto i copolimeri.

La degradazione microbica dei PHA avviene preferibilmente all'estremità amorfa del polimero piuttosto che nella regione cristallina.

L'aumento della regione amorfa e la diminuzione della cristallinità migliorano il tasso di biodegradazione del polimero.

Diversi studi hanno riportato il ruolo della composizione del suolo sulla biodegradazione dei PHA.

Kim et al. hanno riferito che il 98,9% dei PHB è stato degradato nel suolo a fanghi attivi in 25 giorni, mentre solo il 7,1% di PHB è stato degradato nel suolo forestale.

I ricercatori hanno riferito che per raggiungere una biodegradazione del 50% dei film di PHA sepolti nel suolo di mangrovie sono necessarie circa 4 settimane.

3.4 APPLICAZIONI PHAs

Le applicazioni industriali di questi PHA sono tutt'ora in notevole crescita.

I primi prodotti costituiti da PHA furono: imballaggi, articoli di uso quotidiano, come fiale, flaconi e contenitori. I prodotti a base di PHA sono stati ulteriormente ampliati in articoli usa e getta come utensili, prodotti per l'igiene e sacchetti compostabili. (Berret et al., 2021). I PHA mostrano buone proprietà di barriera nei confronti dell'ossigeno, dell'anidride carbonica e dell'umidità. Tali proprietà conferiscono un potenziale per essere utilizzati come packaging alimentare (Boey et al., 2021).

La struttura del PHB contribuisce alle proprietà di barriera ai gas.

In termini di proprietà meccaniche e termiche, la temperatura di fusione T_m , il grado di cristallinità e la temperatura di transizione vetrosa del PHB sono simili al PP, anche se più rigido e fragile.

La seguente tabella illustra le principali applicazioni industriali dei PHAs mettendo in evidenza i vantaggi e gli svantaggi (Boey et al., 2021).

Tabella 2 Principali applicazioni PHA. (Boey et al., 2021)

| N | Applicazione | Vantaggi | Svantaggi |
|---|---|---|--------------------------|
| 1 | Fiale, flaconi e contenitori | Biodegradabile sia nell'acqua marina che nel suolo | alto costo di produzione |
| 2 | Articoli usa e getta e articoli per la casa; utensili, prodotti per l'igiene e sacchetti compostabili | Biodegradabile | Alto costo di produzione |
| 3 | Microsfere di PHAs nei cosmetici e nei bagnoschiuma | Biodegradabile | Alto costo di produzione |
| 4 | Food packaging (PHAs) | Buone proprietà barriera nei confronti di ossigeno, anidride carbonica e umidità -biodegradabile | Alto costo di produzione |
| 5 | Food packaging (PHAs) | -La struttura lamellare del PHB contribuisce alle superiori proprietà di barriera al gas -biodegradabile | Alto costo di produzione |
| 6 | Food packaging (PHAs with organic or inorganic fillers) | -non tossico -biodegradabile -proprietà di barriera al vapore acqueo | Alto costo di produzione |
| 7 | Paperboard for food packaging (PHAs) | -non tossico -biodegradabile | Alto costo di produzione |

Come possiamo osservare, l'elevato costo di produzione rappresenta un punto critico nello sviluppo del mercato dei PHA.

Per questo motivo, molti ricercatori ed imprese stanno sperimentando processi che permettono di abbattere i costi di produzione.

Un possibile metodo che potrebbe permettere un forte abbassamento dei prezzi è costituito dall'utilizzo di scarti alimentari come materie prime (per esempio siero di latte).

4.0 VALORIZZAZIONE SCARTI ALIMENTARI PER PRODUZIONE BIOPLASTICHE

Per realizzare una produzione in scala industriale di poliidrossialcanoati (PHAs) è necessario analizzare una serie di fattori fondamentali: il costo del substrato, le colture microbiche produttrici di PHA, la lavorazione a valle e lo sviluppo dell'intero processo.

Man a mano che si raggiungono volumi di produzione elevati, la fonte di carbonio può arrivare a rappresentare il 50% del costo totale di produzione (Favaro et al., 2018).

Per raggiungere una convenienza economica nel processo di produzione di PHA in scala industriale è necessario lo sviluppo di processi biotecnologici efficienti e l'utilizzo di fonti di carbonio poco costose.

I sottoprodotti industriali possono rappresentare una possibilità per cercare di ridurre i costi di produzione.

L'uso dei sottoprodotti industriali offre il vantaggio di risparmiare sui costi di smaltimento e contemporaneamente produrre beni a valore aggiunto.

Inoltre questa via potrebbe portare ad una maggiore efficienza nell'utilizzazione delle risorse. Tuttavia, per ottenere una produzione industriale economicamente vantaggiosa di PHA, è ancora necessaria un'intensa attività di ricerca.

Le ricerche attuali si sono prefissate diversi obiettivi:

- La ricerca di nuovi ceppi naturali wild type che sono in grado di convertire in maniera più efficiente gli scarti alimentari in PHA
- La produzione di ceppi batterici ingegnerizzati in grado di produrre PHA in modo altamente efficace
- La produzione di ceppi batterici ingegnerizzati in grado di utilizzare fonti di carbonio semplici e complesse ma che non siano in grado di produrre PHA. (Favaro et al., 2018)

La selezione della materia prima adeguata alla sintesi del biopolimero è un compito estremamente importante.

Ci sono pochi casi dove l'utilizzo di una determinata materia prima crea una pressione ecologica negativa.

Ad esempio Koller et al. (2011) sostengono che la coltivazione del mais (materia prima per la sintesi del biopolimero) provoca impatti negativi sull'ambiente quali smog fotochimico e eutrofizzazione.

Una materia prima ideale dovrebbe possedere i seguenti requisiti:

- Essere una biomassa rinnovabile (per evitare impatti negativi sull'ambiente)
- Essere molto economica (per ridurre il costo di lavorazione della materia prima)
- Dovrebbe essere facilmente disponibile vicino all'ubicazione dell'impianto (per ridurre costi di trasporto)
- Dovrebbe essere biochimicamente ricca di carbonio (R. Yulesh Kannah et al., 2022).

Se la materia prima viene selezionata secondo i requisiti appena citati, il processo sarà più efficiente e senza alcun impatto negativo nell'ambiente.

Diverse fonti di rifiuti sono state utilizzate per produrre PHA con relativo successo (Marshall et al., 2013; Anjum et al., 2016; Koller et al., 2017), incluse acque reflue domestiche (Carucci et al. al., 2001); spreco alimentare (Rhu et al., 2003); melassa (Albuquerque et al., 2007; Carvalho et al., 2014); effluenti di frantoio (Dionisi et al., 2005); biomassa lignocellulosica (Bhatia et al., 2019); e siero di latte (Favaro et al., 2018).

4.1 PRODUZIONE DI POLIIDROSSIALCANOATI (PHA) DAL SIERO DI LATTE.

L'uso del siero di latte come fonte di carbonio per la produzione di PHA è stato esplorato da numerosi ricercatori.

Ogni anno si stima che vengano prodotte circa 120 milioni di tonnellate di siero di latte, di cui il 66% è prodotto nell'UE e il 25% in Nord America.

Il siero di latte rappresenta il principale sottoprodotto dell'industria lattiero-casearia.

Circa la metà del siero di latte viene utilizzato per produrre prodotti di valore come mangimi per animali e il resto viene trattato come rifiuto costituendo così un problema ambientale e di gestione.

È essenziale trovare un uso biotecnologico per sfruttare il siero di latte in particolare per l'elevata presenza di composti organici all'interno, come il lattosio. (Siso, 1996; Prazeres et al., 2012; Carvalho et al., 2014).

Il siero di latte si ottiene per precipitazione e rimozione della caseina dal latte durante i processi di caseificazione.

Il possibile utilizzo del siero di latte per la produzione di PHA comporterebbe una drastica riduzione dei costi di produzione e inoltre contemporaneamente si risolverebbe un problema ambientale.

4.1.1 MICRORGANISMI UTILIZZATI PER LA PRODUZIONE DI PHA DAL SIERO DI LATTE

Tutta via solo un limitato numero di microrganismi wild-type è in grado di utilizzare direttamente il lattosio come substrato e trasformarlo in PHA.

Molti ceppi batterici necessitano di un'idrolisi preliminare per ottenere glucosio e galattosio. Un *Methylobacterium* sp. è stato utilizzato per la produzione di PHA direttamente dal siero di latte, quindi utilizzando come substrato il lattosio.

L'ottimizzazione dell'apporto di azoto e l'utilizzo della modalità operativa in batch hanno consentito l'accumulo di poliidrossibutirrato (PHB) dal 44% al 67% della massa secca cellulare (CDM) (Favaro et al., 2018). La produzione di PHA dal lattosio è stata dimostrata anche con

Paracoccus denitrificans, *Sinorhizobium meliloti* e *Hydrogenophaga pseudoflava*.

In particolare, *Hydrogenophaga pseudoflava* ha mostrato caratteristiche promettenti per la conversione diretta del siero di latte in PHA. Il batterio *Alcaligenes latus* è un noto produttore efficiente di PHA ed è in grado di accumulare PHA fino al 70% del suo peso secco utilizzando diverse fonti di zucchero tra cui anche il lattosio (Yu et al., 1999; Gahlawat e Srivastava, 2017).

È possibile aumentare il numero di ceppi batterici che sono in grado di produrre PHA dal siero di latte attraverso l'utilizzo di pretrattamenti come l'idrolisi del lattosio in galattosio e glucosio prima della fermentazione. Quest'operazione però causerebbe una crescita notevole nei costi di produzione e quindi nel prezzo finale (Amaro et al., 2019). Questi pretrattamenti possono essere evitati attraverso l'utilizzo di tecniche di ingegneria genetica. Alcuni ceppi di produzione appropriati sono stati ingegnerizzati a livello del DNA con l'obiettivo di aumentare la concentrazione di PHA e la resa dal siero di latte. I ceppi di *Cupravidus nector* sono spesso utilizzati previa ingegnerizzazione genetica perché sono dei buoni produttori di PHA però non sono in grado di utilizzare direttamente il lattosio del siero come substrato. È stato possibile

rendere il *C. nector* in grado di idrolizzare il lattosio in galattosio e glucosio mediante l'inserimento dell'operone *lacZ* di *E.coli* (cioè quell'insieme di geni che codificano per l'enzima che si occupa di idrolizzare il lattosio) all'interno del genoma di *C. nector* (Favaro et al., 2019). L'ingegneria genetica rappresenta uno strumento estremamente versatile e promettente per migliorare la produzione di PHA dal siero di latte, però l'utilizzo di ceppi ingegnerizzati richiede impianti di produzione più controllati e costosi. Un'altra opzione per la produzione di PHA a partire dal siero di latte è l'utilizzo di colture microbiche miste (MMC) invece di colture pure (Colombo et al., 2016). Sebbene all'utilizzo di MMC siano state associate minori rese di produzione di PHA, esse però non richiedono condizioni di sterilità e sono in grado di adattarsi al cambiamento dei substrati complessi dei rifiuti industriali.

Nonostante la grande flessibilità e i vantaggi in termini economici, l'utilizzo di una comunità microbica sconosciuta, nella produzione di PHAs, può sollevare interrogativi riguardanti l'efficienza produttiva e riguardo le caratteristiche del polimero.

Inoltre, le ricerche si stanno concentrando anche sullo studio di pretrattamenti innovativi da eseguire prima della fermentazione (Amaro et al., 2019).

4.1.2 SIERO DI LATTE: PRETRATTAMENTI

Come discusso in precedenza, il siero di latte è un substrato che presenta numerose difficoltà per l'uso diretto nella produzione di PHA.

In primo luogo, è stato riportato che il siero di latte possiede un tasso C/N, che ostacola la produzione di PHA (Bosco e Chiampo, 2010). Inoltre, il siero di latte è un sottoprodotto complesso, non sterile, e quindi la sua applicazione diretta sia negli esperimenti in laboratorio sia in scala industriale provoca molte difficoltà.

Molti studi che riportano la produzione di PHA dal siero di latte sono stati effettuati su derivati del siero che avevano subito dei pretrattamenti.

La figura 13 illustra i possibili percorsi per la produzione di poliidrossialcanoati dal siero di latte. Il siero intero può essere utilizzato direttamente nella fermentazione oppure è possibile eseguire dei pretrattamenti per ottenere una produzione più efficiente di PHA.

La produzione di PHA può essere ottenuta utilizzando microorganismi wild type (anche se essi sono rarissimi), ceppi ingegnerizzati oppure attraverso colture microbiche miste.

Durante la produzione di PHA si generano flussi di scarto che possono essere utilizzati come additivi per nuove fermentazioni da siero o scotta.

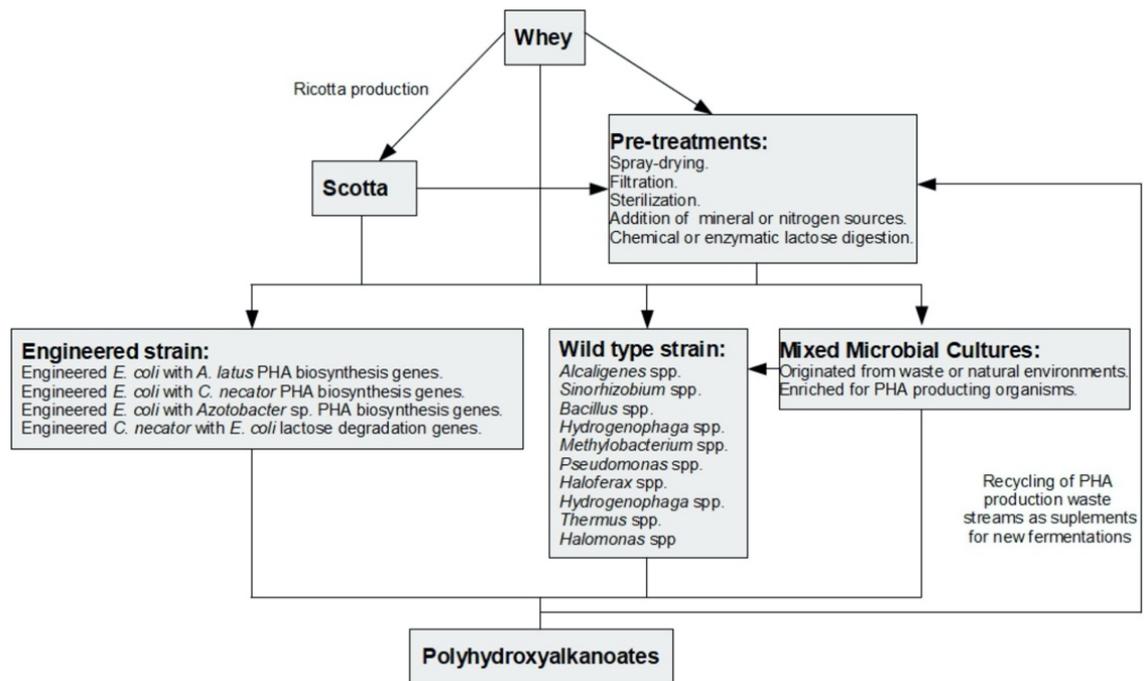


Figura 13 Diagramma dei possibili percorsi per la produzione di polioidrossialcanoati dal siero di latte (Amaro et al., 2019)

Un possibile derivato dal siero di latte è il siero di latte in polvere, normalmente prodotto mediante essiccazione spray-drying. Il siero di latte in polvere viene diluito in acqua per ottenere una specifica concentrazione di lattosio prima della fermentazione (Pisecky', 2005). Tuttavia, una fase di essiccazione tramite spray-drying causa l'aumento dei costi di produzione ed inoltre non è chiaro se le fermentazioni eseguite con il siero di latte in polvere siano paragonabili alle fermentazioni eseguite con il siero di latte. Un altro pretrattamento ampiamente utilizzato nel siero di latte è la rimozione della maggior parte delle proteine e dei solidi in sospensione attraverso l'ultrafiltrazione.

A seguito dell'ultrafiltrazione si ottiene un permeato di siero che trattiene la maggior parte del lattosio (Koller et., 2007b). Oltre all'ultrafiltrazione, è possibile ottenere la rimozione delle proteine del siero eseguendo un'acidificazione del siero fino ad un valore 4 di pH e successivamente eseguire un trattamento termico. A seguito del trattamento termico si procede con centrifugazione e filtrazione. Il risultato di questo processo è l'ottenimento di un surnatante del siero di latte. Questi permeati di siero di latte o surnatanti sono più facili da lavorare, in quanto sono soluzioni sterili omogenee e limpide. Tuttavia, il loro utilizzo aumenta fortemente i costi di produzione (Pantazaki et al., 2009).

Sono stati eseguiti diversi studi che hanno messo a confronto la produzione di PHA utilizzando direttamente il siero di latte e la produzione di PHA mediante surnatante del siero di latte.

I risultati hanno dimostrato che l'accumulo di PHA è differente se eseguito direttamente sul siero oppure sul surnatante. Per questo studio si è utilizzato il *Methylobacterium sp.ZP24* (Yellore e Desai, 1998). Il siero di latte intero dovrebbe essere utilizzato più ampiamente per studiare la produzione di PHA. Tuttavia, l'uso del siero di latte comporta importanti sfide sperimentali, compresi problemi di sterilizzazione. La criticità della sterilizzazione può essere superata attraverso l'utilizzo di colture batteriche miste (MMC) (Koller et al., 2011).

Eseguire la sterilizzazione attraverso trattamenti termici ad elevata temperatura è estremamente sconsigliata perché causerebbe la precipitazione di tutte le proteine del siero rendendo impossibile il processo di ultrafiltrazione. In sostituzione alla sterilizzazione un'alternativa potrebbe essere rappresentata dall'uso di una pastorizzazione a bassa

temperatura, ma normalmente comporta diversi cicli di trattamenti a caldo e a freddo che si traducono in processi di dispendiosi e costosi (Ghaly e Kamal, 2004). Inoltre, la pastorizzazione non assicura la completa sterilizzazione.

Diversi studi si stanno concentrando sulla ricerca di metodi di sterilizzazione alternativi.

Come metodi di sterilizzazione alternativi sono stati proposti l'uso delle radiazioni ultraviolette e una pastorizzazione ad elevata temperature per un brevissimo intervallo di tempo.

Un altro problema derivato dall'utilizzo del siero di latte non trattato e l'elevata concentrazione di lattosio. In uno studio sperimentale è stato dimostrato che l'elevata concentrazione di lattosio nel siero è cruciale per la quantità di PHAs prodotti da parte del *Bacillus megaterium* CCM 2037.

Utilizzando questo ceppo batterico e il surnatante del siero di latte (con una concentrazione di lattosio 40 g/l) la produzione di PHAs è di circa 0,5g/l.

Mentre utilizzando un surnatante del siero di latte con una concentrazione di lattosio minore (circa 20 g/l) La produzione di PHA è aumentata a circa 0,79 g/l (Obruca et al., 2011).

Sono state condotte diverse prove sulla produzione di PH utilizzando colture microbiche miste (MMC) e utilizzando come substrato l'uso di derivati in polvere del siero di latte.

Inoltre, sono state condotte prove anche con permeato del siero e con il surnatante del siero.

Il surnatante del siero prima dell'utilizzo è stato sottoposto a fermentazione in modo da idrolizzare il lattosio in glucosio e galattosio. Si è rilevata una maggiore produzione di PHA nel caso dove si è utilizzato come substrato il surnatante del siero di latte (Colombo et al., 2016).

Comunque, per confermare l'efficacia dell'utilizzo delle MCC sarebbe opportuno eseguire queste sperimentazioni utilizzando il siero di latte intero. Come affermato in precedenza, il siero di latte è un mezzo complesso che può creare ostacoli all'efficienza della fermentazione e ai metodi di estrazione dei PHAs. L'utilizzo dei pretrattamenti prima della fermentazione causano un aumento dei costi di produzione. Un metodo che consentirebbe di ridurre i costi e rappresentato dall'utilizzo del siero di latte in un diverso processo biotecnologico e successivamente utilizzare i residui del siero per la produzione di PHA. Il Siero intero è comunemente utilizzato nella produzione della ricotta, che genera un sottoprodotto chiamato siero di ricotta o scotta (Sansonetti et al., 2009; Berghamaschi e Bittante, 2018).

La maggior parte delle attuali conoscenze sull'utilizzo del siero di latte per la produzione di PHA si basa su studi che utilizzano derivati del siero di latte per garantire una maggiore facilità nel processo. Tuttavia, è fondamentale focalizzarsi sull'utilizzo del siero di latte intero in quanto ci permette di avere una visione completa dell'effettiva convenienza dell'utilizzo del siero di latte per la produzione di PHA (Amaro et al., 2019).

La scotta trattiene la maggior parte del lattosio, ma possiede un contenuto proteico molto ridotto, che potrebbe inizialmente inibire la crescita microbica ed interferire con i processi di estrazione dei PHA. In Italia ogni anno vengono prodotte circa un milione di tonnellate di scotta. L'utilizzo della scotta è già stato sperimentato per diversi processi biotecnologici, come la produzione di bioetanolo (Zoppellari e Bardi, 2013), Biodiesel (Maqueda et al., 2017) e acido lattico (Secchi et al., 2011).

È stato dimostrato che la scotta può eventualmente essere utilizzata per produrre PHA usando come produttori colture microbiche miste (MMC). Le MMC sono in grado di produrre PHA dalla scotta richiedendo come unico la filtrazione. Durante queste prove la produzione di PHA è stata di circa 1,65 g/l. Quindi, la produzione di scotta potrebbe rivelarsi una fase intermedia produttiva, anche se estremamente inesplorata, nella produzione di PHA dal siero di latte.

M. Koller (2015) verificò la fattibilità della produzione di PHA utilizzando come substrato flussi di rifiuti fermentati e come ceppo batterico *H. mediterranei*. A tale proposito è utile osservare lo studio di Koller. Il lavoro di Koller si focalizza sia sull'utilizzo del siero di latte per la

produzione di PHAs sia sul riciclaggio dei flussi di rifiuti derivanti dal processo di produzione del polimero stesso.

Per il suo studio, Koller utilizza il ceppo wild-type, *Halobacterium salinarum*, un alofilo estremo. Il suo carattere estremofilo, manifestato dall'elevato fabbisogno di sale per la crescita, consente la coltivazione esclusiva di questo ceppo, anche in condizioni non sterili, senza mettere in pericolo il lotto di fermentazione a causa della contaminazione microbica.

L'adattamento delle cellule di *H. salinarum*, ad alta salinità, offre la possibilità di eseguire tali processi a bassi costi operativi (nessun solvente è necessario per il recupero delle cellule di PHAs, grazie alla loro elevata pressione osmotica interna). Le stime dei costi riportano un prezzo di produzione inferiore a 3 € per Kg di PHA, utilizzando come materia prima il siero di latte (M.Koller, 2015).

In questo caso studio circa 200g di NaCl per Kg di brodo di fermentazione devono essere smaltite a fine del processo. Pertanto, il riciclaggio dei principali flussi di rifiuti dai lotti di produzione di PHA con *H. salinarum* è di grande interesse, non solo per ragioni economiche ma anche per la diminuzione dei rischi ecologici derivanti dagli enormi lotti di sale. Quando le cellule ricche di PHA di *H. salinarum* vengono separate dalla fase liquida del terreno di coltura, subiscono successivamente un processo di recupero.

Di conseguenza, i seguenti flussi di rifiuti dell'intero processo produttivo possono essere evidenziati come segue:

- surnatante salato del brodo di fermentazione ("SSF");
- detriti cellulari più i sali intracellulari ("SF", ottenuti essiccando insieme detriti cellulari più sali rilasciati dopo la rottura delle cellule e la separazione del PHA);
- detriti cellulari senza sale (ottenuti quando i detriti salini SF vengono lavati dopo la rottura e la separazione di PHA, "SD").

Lo scopo della ricerca di Koller fu la valutazione sperimentale di questi flussi di rifiuti da riutilizzare nei successivi lotti di fermentazione.

È stato studiato come SSF può agire per sostituire il mezzo di fermentazione salino fresco.

Le fasi principali dell'esperimento di Koller sono costituite da:

- 1) pretrattamento del siero latte: è stato utilizzato un siero di latte con una concentrazione di lattosio di circa 200 g/l. Il siero è stato sottoposto a degradazione enzimatica per ottenere glucosio e galattosio.
- 2) crescita microbica: è stato utilizzato il ceppo microbico *H. salinarum* DSM1411. Per quanto riguarda il terreno di coltura è stato utilizzato un agar solido (Con NaCl, MgCl₂, CaCl₂, KCl, MgSO₄, NaBr, estratto di lievito, siero di latte idrolizzato enzimaticamente).

Una volta che le cellule hanno raggiunto la fase esponenziale tardiva, avviene il trasferimento in 250ml di terreno di coltura fresco.

Dopo 48h di crescita, le cellule sono state aggiunte come inoculo a 7 litri di terreno di crescita non sterilizzato, in un bioreattore di 300l.

La fermentazione è stata eseguita come un processo fed-batch; la rialimentazione della fonte di carbonio è stata effettuata mediante alimentazione a impulsi di permeato di siero di latte idrolizzato enzimaticamente.

Ad intervalli di tempo regolari si eseguivano delle analisi su diversi campioni per monitorare densità ottica (OD), concentrazione di glucosio e di galattosio e concentrazione PHA intracellulare. La fermentazione è stata interrotta dopo 64,25 h e l'esaurimento della maggior parte degli zuccheri.

3) Recupero PHA: a seguito dell'arresto della fermentazione, Koller eseguì una pastorizzazione (70°C, 20min). Successivamente il volume del brodo di fermentazione è stato ridotto del 90% attraverso un separatore Wetsphalia.

Infine, si esegue una centrifugazione per ottenere i pellet di cellule solide e il surnatante salino esaurito (SSF). I pellet di cellule solide sono stati congelati ed essiccati mediante liofilizzazione. Utilizzando l'acqua per distruggere le cellule, l'elevata pressione osmotica intracellulare di *H. mediterranei* causa una sospensione dei granuli di PHA in una soluzione salata.

I granuli di PHA e i detriti cellulari sono stati separati sfruttando le diverse densità, mediante centrifugazione (centrifuga Superspeed refrigerata Sorvall RC-5B, 4.000 giri/min, 20 min), consentendo la comoda separazione dei granuli di PHA mediante semplice scrematura (M.koller, 2015).

Koller provò ad utilizzare il surnatante salino esaurito (SSF) come substrato per una successiva fermentazione e produzione di PHA, per verificare la possibilità del riciclo di questi substrati. Per questo esperimento è stato utilizzato un bioreattore da 10l.

Azoto e fosfati sono stati aggiunti integrando l'estratto di lievito. In questo modo è stato modificato un solo parametro rispetto alla fermentazione "originale" su scala 300 l.

La fonte di carbonio è stata fornita alle cellule mediante integrazione con permeato di siero di latte idrolizzato.

La temperatura (37°C) e il valore pH (7,0) sono stati regolati in proporzione all'esperimento originale su scala 300 l (M.koller, 2015).

La Figura 14 illustra la strategia di fermentazione "ideale" proposta per la produzione di PHA, utilizzando *H. mediterranei* e siero di latte come fonte di carbonio.

Il surnatante salino SSF dovrebbe essere utilizzato per sostituire parzialmente i composti minerali nei successivi processi di fermentazione, mentre i detriti cellulari salati (SF) o senza sale (SD) dovrebbero essere utilizzati come fonte di azoto e fosfato per ridurre la quantità richiesta di estratto di lievito.

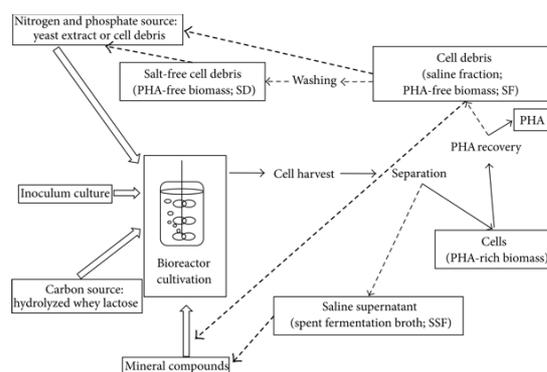


Figura 14 Sistema di riciclaggio chiuso per il riutilizzo dei flussi di scarto del processo di produzione di PHA fermentativo da parte di *H. mediterranei*, basato sul siero di latte.

Questo esperimento studia il possibile riciclaggio delle enormi quantità di sali rimanenti nel surnatante SSF, che costituiscono la principale frazione salina che si accumula a fine del processo.

I risultati più significativi, relativi all'esperienza di riciclaggio rispetto alla fermentazione "originale", sono raccolti nella Tabella 3.

La concentrazione finale di PHA nell'esperienza di riciclaggio ammonta a 2,28 g/l.

La fermentazione "originale" nella scala da 300 litri ha raggiunto 7,2 g/l dopo lo stesso tempo (64,25 ore) e 11,86 dopo l'interruzione dell'esperienza a $t = 80$ ore.

In entrambe le configurazioni di fermentazione, i copoliesteri prodotti hanno mostrato frazioni di massa di circa 0,9 g/g per 3HB e 0,1 g/g per 3HV come tipico per il ceppo di produzione applicato (M.koller, 2015).

Tabella 3 Confronto risultati della fermentazione di H. mediterranei DSM 1411 su surnatante salato riciclato (scala 10 L) e la coltivazione originale su scala 300 L. (M.koller, 2015).

| | Fermentazione bioreattore 300l | Fermentazione bioreattore 10l (SSF) | Fermentazione 10l/fermentazione 300l |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Tasso di crescita (1/h) | 0,18 | 0,08 | 0,44 |
| Durata fase esponenziale (h) | 17 | 21 | 1,24 |
| Concentrazione PHA (g/l) | 7,20 | 2,28 | 0,32 |
| Biomassa PHA (%) | 66 | 62,7 | 1,06 |
| Frazione 3HV/PHA (g/g) | 0,1 | 0,1 | 1,00 |

In conclusione, è stato dimostrato che il surnatante salino esaurito (SSF) può fungere da terreno salino per le successive coltivazioni di H. mediterranei.

Tuttavia, in questo caso sono state osservate produttività e tassi di crescita inferiori rispetto all'impostazione originale su terreno fresco.

4.1.3 ANALISI TECNICO-ECONOMICA DELLA PRODUZIONE DI PHA DAL SIERO DI LATTE

L'analisi tecnico-economica è uno strumento chiave per valutare le sfide tecniche ed economiche della lavorazione di materie prime per la produzione di un prodotto economicamente vantaggioso (Kannah et al., 2021b).

Per la maggior parte delle tecniche "waste to bioproducts" l'analisi tecnico economica viene eseguita per identificare la risorsa migliore.

Chalermthai et al. (2020) hanno condotto un'analisi tecnico economica della produzione di PHA utilizzando il siero di latte.

Nel loro studio hanno preso in considerazione due scenari per valutare il costo totale del processo, il profitto annuo, il periodo di recupero dell'investimento (PBP) e il ritorno sull'investimento (ROI).

Nel caso studio 1 la materia prima utilizzata è costituita da 100 tonnellate di siero di latte. Il costo di investimento è stato di circa 33,6 milioni di dollari e il costo di produzione è stato di circa 3850 dollari per tonnellata. Il profitto annuo ottenuto da questo processo è stato stimato di circa 22,5 milioni di dollari e il ricavo da ogni unità di produzione circa 7010 dollari per tonnellata. Quasi il 66,7% dell'investimento viene realizzato annualmente come profitto.

Mentre nel caso studio 2 la materia prima di partenza è costituita da una tonnellata di proteine del siero di latte concentrate. In questo processo, il costo d'investimento è stato di 19,13 milioni di dollari e il costo di produzione è stato di circa 3680 dollari per tonnellata.

Il profitto annuale raggiunto in questo scenario è stato di 22,6 milioni di dollari e il ricavo per unità di produzione è stato di circa 7000 dollari per tonnellata.

Il profilo del profitto annuo e dei ricavi dei due casi studio sembrano assomigliarsi molto. Tuttavia, il PBP e il ROI sono differenti per ciascun scenario.

Il tempo necessario a recuperare l'investimento (PBP) nello scenario 2 è di 2,37 anni mentre il PBP dello scenario 1 è 3,69 anni.

Il capitale investito dello scenario 2 verrebbe recuperato in tempo minore.

Inoltre, un altro indicatore molto importante è il ROI (Return on Investment) cioè il tasso di rendimento sul totale degli investimenti.

Il ROI dello scenario 1 è del 27,7% mentre 42,2% quello relativo allo scenario 2 quindi il calcolo di questo indice conferma la maggiore convenienza economica del secondo caso studio.

Koller et al. (2007) hanno analizzato la variazione del costo di produzione dei PHA e la sua resa utilizzando tre diversi ceppi batterici *Haloferax Mediterranei*, *Hydrogenophaga pseudoflava* e *Pseudomonas hydrogenovora* utilizzando il siero come substrato.

H. mediterranei riuscì a produrre 5,5 g/l di PHA mentre *H. pseudoflava* 2,7 g/l di PHA e *P. hydrogenovora* circa 1,3 g/l.

Il costo di produzione più basso pari a 2,82 euro per kg è stato ottenuto con l'uso del ceppo batterico *H. mediterranei*. Invece i costi di produzione relativi all'utilizzo del *H. pseudoflava* sono stati circa di 7 euro per kg di PHA e circa 10 euro per kg di PHA per *P. hydrogenovora*.

Questi risultati dimostrano che *H. mediterranei* è il ceppo più efficiente sia in termini di resa e di convenienza economica.

4.1.4 ANALISI LCA (LIFE CICLE ASSESSMENT)

L'analisi del ciclo di vita (Life-cycle-assessment) è un potente strumento per valutare l'impatto nell'ambiente dell'intero ciclo di vita di un prodotto. Il metodo LCA è una procedura standardizzata che utilizza diversi criteri di valutazione per definire l'influenza sull'ambiente di un dato prodotto. Vengono prese in considerazione tutte le fasi del ciclo di vita di quel prodotto, a partire dall'approvvigionamento delle risorse per produrlo fino al suo smaltimento o riciclo.

Il metodo analizza la potenziale influenza sull'ambiente di ogni processo del ciclo di vita basandosi su dati quantitativi, raggruppati per categorie di impatto quali: gli effetti sulla salute, la qualità dell'eco-sistema, il consumo di risorse. Potenziali impatti ambientali sono determinati da: fattori cancerogeni, emissione di composti organici ed inorganici, cambiamenti climatici, radiazioni, danni allo strato dell'ozono, eco-tossicità, acidificazione/eutrofizzazione, uso del terreno, consumo di risorse naturali e di combustibili fossili.

L'analisi LCA relativa alla produzione di PHA utilizzando il siero di latte è stata eseguita da Koller et al. (2013). Nel loro studio, inizialmente è stato utilizzato un bioreattore da 10 L per stimare la resa di PHA. Successivamente sono passati ad un bioreattore di 300 L e hanno raggiunto una resa di 0,188kg di PHA per kg di lattosio proveniente dal siero di latte. La resa di PHA ottenuta nel bioreattore da 300 L è stata maggiore. L'impronta ecologica dell'impianto da 10 L è stata di circa di 4785.95 m²a/kg mentre nell'impianto da 300l è stata di circa 10,432.92 m²a/kg. Wendt et al. (2016) hanno constatato che l'emissione di GHG si è drasticamente ridotta dell'83%. La produzione di PHA dal siero di latte porta ad una emissione di gas serra pari a 4.4 MTCO₂/anno. Inoltre, l'implementazione della bio-raffineria integrata per la produzione di PHA da rifiuti del siero di latte riduce drasticamente le emissioni a meno di 1 MTCO₂/anno.

5.0 CONCLUSIONI

Gli studi che ho analizzato nascono dalla necessità di sperimentare una produzione di bioplastiche che miri ad essere sostenibile sia dal punto di vista ambientale che da quello economico. La transizione, verso una produzione di bioplastica in sostituzione alla produzione di plastiche tradizionali, risponde all'urgente necessità di risolvere i problemi ambientali che derivano dalla produzione e dall'accumulo di plastica convenzionale.

I biopolimeri non solo hanno il potenziale che permette loro di sostituire l'uso di plastiche convenzionali ma possiedono anche la versatilità di applicazione in diversi campi, tra i quali i settori di alta tecnologia come quello alimentare e biomedico.

Nel contesto della produzione di bioplastiche, i PHAs potrebbero svolgere un ruolo molto importante perché hanno le proprietà desiderate dal mercato e perché possono essere prodotti biologicamente da substrati di scarto poco costosi, come il siero di latte.

In questo ambito, molti progressi sono stati conseguiti percorrendo vari percorsi di indagine e ricerca scientifica. Sono stati attuati numerosi studi, nel campo dell'ingegneria genetica, che si prefiggevano come scopo la produzione di PHAs e l'utilizzo della biomassa ubiquitaria come materia prima di carbonio.

I materiali di biomassa a basso costo sono attualmente sfruttati non solo su scala di laboratorio ma anche su scala commerciale per la produzione sostenibile di PHA.

Il recupero di prodotti, di alto valore aggiunto, provenienti da diversi flussi di rifiuti industriali, ha creato nuove opportunità di studio per i ricercatori e le industrie.

La produzione di biopolimeri (PHA), da flussi di rifiuti industriali, potrebbe essere un percorso redditizio per ridurre i costi di smaltimento dei rifiuti e per aprire la strada alla "Bioeconomia Circolare".

Ho analizzato studi molto significativi che forniscono indicazioni chiare sulla possibilità di produrre, attraverso varie strategie, PHAs dal siero di latte.

In questo lavoro sono stati esaminati alcuni studi che descrivono la produzione di PHAs dal siero di latte con particolare attenzione ai pretrattamenti del siero e alla scelta dei microrganismi produttori.

Questi pretrattamenti possono essere efficaci però causano un aumento del costo di produzione totale.

H. mediterranei si è confermato uno dei ceppi batterici più efficaci per la produzione dei PHAs dal siero di latte sia dal punto del riciclo dei flussi di rifiuti e sia dal punto di vista economico.

Per quanto riguarda tale produzione un altro campo di ricerca su cui molti ricercatori si stanno cimentando studia l'utilizzo delle tecniche proprie dell'ingegneria genetica.

L'esistenza di batteri in grado di produrre naturalmente PHA e di batteri ottenuti attraverso tecniche di DNA ricombinate, indica chiaramente che c'è la possibilità che molti altri organismi, con proprietà desiderabili, possano essere sfruttati in futuro per produrre PHA da siero di latte.

Si ipotizza che, grazie al progresso tecnologico e alla fattibilità economica, ci sarà un aumento del deposito di brevetti.

Si può prevedere inoltre che più settori industriali commercializzeranno i biopolimeri adatti ad applicazioni di imballaggio alimentare.

BIBLIOGRAFIA

Amaro, T. M. M. M., Rosa, D., Comi, G., & Iacumin, L. (2019). Prospects for the Use of Whey for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00992>

Aeschelmann, F., & Carus, M. (2015). Biobased Building Blocks and Polymers in the World: Capacities, Production, and Applications—Status Quo and Trends Towards 2020. *Industrial Biotechnology*, *11*(3), 154–159. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.28999.fae>

Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>

Bellini, S., Tommasi, T., & Fino, D. (2022). Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Cupriavidus necator*: A review on waste substrates utilization for a circular economy approach. *Bioresource Technology Reports*, *17*, 100985. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100985>

Bhatia, S. K., Gurav, R., Choi, T.-R., Jung, H.-R., Yang, S.-Y., Moon, Y.-M., Song, H.-S., Jeon, J.-M., Choi, K.-Y., & Yang, Y.-H. (2019). Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119. *Bioresource Technology*, *271*, 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.122>

Boey, J. Y., Mohamad, L., Khok, Y. S., Tay, G. S., & Baidurah, S. (2021). A Review of the Applications and Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates and Poly(lactic acid) and Its Composites. *Polymers*, *13*(10), 1544. <https://doi.org/10.3390/polym13101544>

Bosco, F., & Chiampo, F. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *109*(4), 418–421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.012>

Briassoulis, D., Tserotas, P., & Athanasoulia, I.-G. (2021). Alternative optimization routes for improving the performance of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based plastics. *Journal of Cleaner Production*, *318*, 128555. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128555>

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*(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>

Carucci, A., Dionisi, D., Majone, M., Rolle, E., & Smurra, P. (2001). Aerobic storage by activated sludge on real wastewater. *Water Research*, *35*(16), 3833–3844. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00108-7](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00108-7)

- Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M. G. E., & Reis, M. A. M. (2014). The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *New Biotechnology*, 31(4), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.010>
- Chalermthai, B., Ashraf, M. T., Bastidas-Oyanedel, J.-R., Olsen, B. D., Schmidt, J. E., & Taher, H. (2020). Techno-Economic Assessment of Whey Protein-Based Plastic Production from a Co-Polymerization Process. *Polymers*, 12(4), 847. <https://doi.org/10.3390/polym12040847>
- Chee, Jiun Yee & Yoga, S. & Lau, Nyok-Sean & Ling, S. & Abed, Raeid & Sudesh, Kumar. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastic
- Chen, G.-Q., Hajnal, I., Wu, H., Lv, L., & Ye, J. (2015). Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology*, 33(10), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.007>
- Colombo, B., Pepè Sciarria, T., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, 218, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.024>
- Dionisi, D., Carucci, G., Papini, M. P., Riccardi, C., Majone, M., & Carrasco, F. (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Research*, 39(10), 2076–2084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.011>
- European Bioplastics report 2022
https://docs.europeanbioplastics.org/publications/EUBP_FAQ_on_bioplastics.pdf
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., & Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, 9(12), Artigo e111913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>
- Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2018). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(1), 208–227. <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>
- Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., de Aragão, G. M. F., & Reis, M. A. M. (2009). Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 454–461. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900034>
- Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. (2017). Model-Based Nutrient Feeding Strategies for the Increased Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(2), 530–542. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2482-8>

- Ghaly, A. E., & Kamal, M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 38(3), 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.019>
- Gutschmann, B., Huang, B., Santolin, L., Thiele, I., Neubauer, P., & Riedel, S. L. (2022). Native feedstock options for the polyhydroxyalkanoate industry in Europe: A review. *Microbiological Research*, 264, 127177. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127177>
- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S., & Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>
- Kathiraser, Y., Aroua, M. K., Ramachndran, K. B., & Tan, I. K. P. (2007). Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(9), 847–855. <https://doi.org/10.1002/jctb.1751>
- Kim, M.-N., Lee, A.-R., Yoon, J.-S., & Chin, I.-J. (2000). Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. *European Polymer Journal*, 36(8), 1677–1685. [https://doi.org/10.1016/s0014-3057\(99\)00219-0](https://doi.org/10.1016/s0014-3057(99)00219-0)
- Koronis, Georgios & Silva, Arlindo & Furtado, Samuel. (2016). Applications of Green Composite Materials. 10.1002/9781118911068.ch10.
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, 37, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Koller, M., Gasser, I., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Engineering in Life Sciences*, 11(3), 222–237. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000190>
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlić, A., & Braunegg, G. (2007). Potential of Various Archae- and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey. *Macromolecular Bioscience*, 7(2), 218–226. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600211>
- Koller, M. (2015). Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Haloferax mediterraneus* Whey. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/370164>
- Kunasundari, B., Murugaiyah, V., Kaur, G., Maurer, F. H. J., & Sudesh, K. (2013). Revisiting the Single Cell Protein Application of *Cupriavidus necator* H16 and Recovering Bioplastic Granules Simultaneously. *PLoS ONE*, 8(10), Article e78528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078528>

- Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., & Narodoslowsky, M. (2013). Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey. *Resources, Conservation and Recycling*, 73, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.01.017>
- Li, R., Zhang, H., & Qi, Q. (2007). The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 98(12), 2313–2320. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.014>
- Maqueda, C., Undabeytia, T., Villaverde, J., & Morillo, E. (2017). Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 593-594, 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.202>
- Martínez, V., de Santos, P. G., García-Hidalgo, J., Hormigo, D., Prieto, M. A., Arroyo, M., & de la Mata, I. (2015). Novel extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus* K10 DSMZ 41693: a promising biocatalyst for the efficient degradation of natural and functionalized mcl-PHAs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9605–9615. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6780-1>
- Marshall, C. W., LaBelle, E. V., & May, H. D. (2013). Production of fuels and chemicals from waste by microbiomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.016>
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., & Swings, J. (1993). Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3233–3238. <https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3233-3238.1993>
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Murugan, P., Han, L., Gan, C.-Y., Maurer, F. H. J., & Sudesh, K. (2016). A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor*. *Journal of Biotechnology*, 239, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.012>
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56–77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
- Obruca, S., Marova, I., Melusova, S., & Mravcova, L. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of Microbiology*, 61(4), 947–953. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0218-5>

- Ong, S. Y., Zainab-L, I., Pyary, S., & Sudesh, K. (2018). A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2117–2127. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8788-9>
- Pantazaki, A. A., Papaneophytou, C. P., Pritsa, A. G., Liakopoulou-Kyriakides, M., & Kyriakidis, D. A. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*, 44(8), 847–853. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.002>
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(3), 233–247. <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>
- Písecký, J. (2005). Spray drying in the cheese industry. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.010>
- Peng, J., Wang, J., & Cai, L. (2017). Current understanding of microplastics in the environment: Occurrence, fate, risks, and what we should do. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 476–482. <https://doi.org/10.1002/ieam.1912>
- PlasticsEurope, 2018. Plastics - the facts 2018: an analysis of European plastics production, demand and waste data. Retrieved from https://www.plasticseurope.org/download_file/force/2387/319.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Rhu, D. H., Lee, W. H., Kim, J. Y., and Choi, E. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Sci. Technol.* 48, 221–228. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0472>
- Rydz, J., Sikorska, W., Kyulavska, M., & Christova, D. (2014). Polyester-Based (Bio)degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 564–596. <https://doi.org/10.3390/ijms16010564>
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, 33(12), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.002>
- Secchi, N., Giunta, D., Pretti, L., García, M. R., Roggio, T., Mannazzu, I., & Catzeddu, P. (2011). Bioconversion of ovine scotta into lactic acid with pure and mixed cultures of lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(1), 175–181. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1013-9>
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)

Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., & vom Saal, F. S. (2009). Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1973–1976. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054>

Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>

Wang, Q., Tappel, R. C., Zhu, C., & Nomura, C. T. (2011). Development of a New Strategy for Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by Recombinant *Escherichia coli* via Inexpensive Non-Fatty Acid Feedstocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 519–527. <https://doi.org/10.1128/aem.07020-11>

Wang, S., Lydon, K. A., White, E. M., Grubbs, J. B., Lipp, E. K., Locklin, J., & Jambeck, J. R. (2018). Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Plastic under Anaerobic Sludge and Aerobic Seawater Conditions: Gas Evolution and Microbial Diversity. *Environmental Science & Technology*, 52(10), 5700–5709. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06688>

Wendt, C., Ellis, C., Guillen, D.P., Feris, K., Coats, E.R., McDonald, A., 2016. Reduction of GHG Emissions through the Conversion of Dairy Waste to Value-Added Materials and Products BT - Energy Technology 2016: Carbon Dioxide Management and Other Technologies, in: Li, L., Guillen, D.P., Neelameggham, N.R., Zhang, L., Zhu, J., Liu, X., Basu, S.N., Haque, N., Wang, T., Verhulst, D.E., Pandey, A. (Eds.), . Springer International Publishing, Cham, pp. 109–116.

10.1002/9781118797914.ch13. (2000). *CrossRef Listing of Deleted DOIs*, 1. <https://doi.org/10.1002/9781118797914.ch13xxx>

Yellore & Desai. (1998). Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Letters in Applied Microbiology*, 26(6), 391–394. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1998.00362.x>

Yukesh Kannah, R., Kavitha, S., Preethi, Parthiba Karthikeyan, O., Kumar, G., Dai-Viet, N. V., & Rajesh Banu, J. (2021). Techno-economic assessment of various hydrogen production methods – A review. *Bioresource Technology*, 319, 124175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124175>

Yukesh Kannah, R., Dinesh Kumar, M., Kavitha, S., Rajesh Banu, J., Kumar Tyagi, V., Rajaguru, P., & Kumar, G. (2022). Production and recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from waste streams- A review. *Bioresource Technology*, 128203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128203>

Yu, P. H., Chua, H., Huang, A.-L., & Ho, K.-P. (1999). Conversion of Industrial Food Wastes by *Alcaligenes Latus* into Polyhydroxyalkanoates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 78(1-3), 445–454. <https://doi.org/10.1385/abab:78:1-3:445>

Zoppellari, F., & Bardi, L. (2013). Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New Biotechnology*, 30(6), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.017>