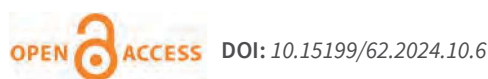


Use of waste materials and by-products from agriculture and industry in the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA). Literature review

Wykorzystanie materiałów odpadowych i produktów ubocznych z rolnictwa i przemysłu w procesie biosyntezy polihydroksyalkanianów (PHA). Przegląd literatury



A review, with 88 refs., of polyhydroxyalkanoates (PHAs) belonging to the class of biopolyesters, produced by microorganisms through fermentation and accumulated in the form of intracellular granules called carbosomes, which are an alternative to polymers derived from fossil sources. Their synthesis methods, properties and applications were discussed. Particular attention was paid to the high costs of producing PHAs limiting the com. use of this group of polymers. Strategies used in biosynthesis processes using low-cost carbon sources in the form of waste and by-products from industry and agriculture as substrates in PHAs biosynthesis were presented.

Keywords: polyhydroxyalkanoates (PHAs), bacterial fermentation, waste products, biodegradable biopolymers

Polihydroksyalkaniany (PHA) należą do klasy biopolimerów. Wytwarzane są przez mikroorganizmy w procesie fermentacji i gromadzone w postaci wewnątrzkomórkowych granulek zwanych karbosomami. Ze względu na swoje właściwości mechaniczne zbliżone do polimerów syntetycznych, odporność na promieniowanie UV, podatność na biodegradację i biogodność, PHA mogą stać się jedną z najciekawszych alternatyw dla tworzyw sztucznych otrzymywanych ze źródeł kopalnych. Jednym z głównych wyzwań, które powstrzymują komercyjną eksploatację tego biopolimeru są wysokie koszty produkcji. W celu obniżenia kosztów wytwarzania PHA zastosowano różne strategie, w tym wykorzystano w procesach biosyntezy szczepy modyfikowanych genetycznie mikroorganizmów, złożone rodzaje fermentacji i wydajne przetwarzanie produktu końcowego. Jednym z najskuteczniejszych podejść mającym na celu zwiększenie opłacalności produkcji PHA stanowi wykorzystanie tanich źródeł węgla w postaci odpadów i produktów ubocznych pochodzących z przemysłu oraz rolnictwa. Praca stanowi przegląd opublikowanych dotąd strategii produkcji PHA z wykorzystaniem tanich, powszechnie dostępnych surowców stanowiących substrat w procesie biosyntezy PHA.

Słowa kluczowe: polihydroksyalkaniany (PHA), fermentacja bakteryjna, produkty odpadowe, biopolimery biodegradowalne

Syntetyczne tworzywa polimerowe są obecnie powszechnie stosowane prawie we wszystkich dziedzinach życia. Światowa roczna produkcja tworzyw sztucznych w 2020 r. wynosiła 391 mln t, a największymi producentami

były Chiny (32%), kraje europejskie (28 krajów Unii Europejskiej oraz Norwegia, 15%) oraz kraje NAFTA (Północnoamerykański Układ Wolnego Handlu, 19%). W Europie największymi producentami plastiku są Niemcy (23,3% produkcji europejskiej), Włochy (14,1%) i Francja (9,3%). Polska wśród krajów europejskich zajmuje 4. miejsce pod względem wielkości produkcji tworzyw sztucznych, wytwarzając 7,5% ich rocznej ilości¹⁾.

Syntetyczne tworzywa sztuczne wytwarzane na bazie ropy naftowej są trudno podatne na rozkład, a ich obecność w środowisku powoduje istotne zagrożenie. Tworzywa te, m.in. w postaci mikro- i nanoplastiku, obecne są w wodach powierzchniowych, glebie, a nawet w wodzie przeznaczonej do spożycia^{2, 3)}. Szacuje się, że jeśli produkcja tworzyw sztucznych i niski poziom ich recyklingu wynoszący średnio w skali światowej ok. 15% utrzymają się na obecnym poziomie, to do 2050 r. na składowiskach lub w środowisku



Mgr Alicja MICHALCZYK (ORCID: 0000-0002-9766-3227) w roku 2005 ukończyła studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Pracuje jako główny specjalista w Grupie Badawczej Technologii Chemicznej i Biotechnologii w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Przemysłu Organicznego w Warszawie. Specjalność – mikrobiologia, biologia środowiskowa.

*** Adres do korespondencji:**

Grupa Badawcza Technologii Chemicznej i Biotechnologii, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Organicznego, ul. Annopol 6, 03-236 Warszawa, e-mail: alicja.michalczyk@ipo.lukasiewicz.gov.pl

naturalnym znajdzie się ok. 12 Gt odpadów z plastiku⁴). Rosnące zaniepokojenie negatywnymi skutkami dla środowiska, związanymi z użytkowaniem tworzyw sztucznych, stanowi impuls do poszukiwania alternatywnych biodegradowalnych biopolimerów.

Do tworzyw przyjaznych dla środowiska naturalnego zalicza się biotworzywa, wg European Bioplastics Association obejmujące rodzinę materiałów zarówno wytwarzanych ze źródeł odnawialnych, jak i materiałów biodegradowalnych pochodzących z biomasy roślinnej lub zwierzęcej⁴). Tego typu biotworzywa to głównie tworzywa na bazie poli(kwasu mlekowego) (PLA), estrów celulozy, skrobi termoplastycznej (TPS), jak również polihydroksyalkanianów (PHA)-(ko)-poliestrów alifatycznych pochodzenia bakteryjnego.

Ostatnio szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się polihydroksyalkaniany (PHA) wytwarzane przez mikroorganizmy w procesie fermentacji mikrobiologicznej i gromadzone w postaci wewnątrzkomórkowych granuliek zwanych karbosomami. Ze względu na właściwości mechaniczne zbliżone do właściwości polimerów syntetycznych, takie jak odporność na promieniowanie UV, podatność na biodegradację i biodegradację mogą stać się jedną z najciekawszych alternatyw dla tworzy sztucznych otrzymywanych ze źródeł kopalnych⁵). Zaznaczyć jednak należy, że potencjał rynkowy PHA będzie zależał od ich ceny, a także od wydajnych technologii przetwarzania tych biopolimerów. Obecnie produkcja PHA stanowi jedynie 1,2% globalnej produkcji bioplastiku⁶). Wiąże się to głównie z wysokimi kosztami ich wytwarzania, które wg dostępnych danych są 2–3-krotnie wyższe niż w przypadku konwencjonalnych tworzyw sztucznych⁷). Do najważniejszych czynników wpływających na opłacalność produkcji PHA należą: produktywność, zawartość PHA w biomacie, wydajność biosyntezy na zastosowanym medium hodowlanym oraz koszt surowców i metod odzyskiwania⁸).

Koszt źródła węgla do mikrobiologicznego procesu produkcji PHA może stanowić nawet do 30–50% kosztów całkowitych, o czym donoszą autorzy publikacji⁹). Jednym z rozwiązań obniżających koszty produkcji wydaje się być zastąpienie rafinowanych cukrów i lotnych kwasów tłuszczowych wykorzystywanych głównie w procesie biosyntezy PHA tanimi, łatwo dostępnymi źródłami węgla pochodzącymi z odpadów produkcji rolno-spożywczej i przemysłowej.

W ostatnich latach opublikowano wiele prac przeglądowych na temat PHA. Jednak większość z nich koncentruje się na wyborze mikroorganizmów jako potencjalnych producentów PHA^{10,11}), modyfikacjach genetycznych szczepów bakteryjnych zdolnych do wytwarzania PHA celem poprawy ich produktywności¹¹), identyfikacji PHA¹²), sposobach ich izolacji z biomasy bakteryjnej¹³), albo na możliwych zastosowaniach tego biopolimeru¹⁴).

Celem pracy było przedstawienie przeglądu opublikowanych strategii produkcji tańszych PHA, wykorzystujących odpady i produkty uboczne jako źródła węgla w procesie biosyntezy PHA.

Polihydroksyalkaniany – biosynteza, właściwości oraz zastosowanie

PHA to rodzina naturalnie występujących biopoliestrów syntetyzowanych przez różne mikroorganizmy. Pierwszym PHA, zidentyfikowanym przez Lemogine w 1926 r. był poli(3-hydroksymaślan) [P(3HB)] w komórkach *Bacillus megaterium*¹⁵). W kolejnym półwieczu Wallen i Rohwedder (1974 r.) wyizolowali PHA z różnymi jednostkami monomeru, 3-hydroksywalerianem (3HV) i 3-hydroksyheksanem (3HHx) z osadów ściekowych¹⁶). Polihydroksyalkaniany są syntetyzowane głównie przez eubakterie (rodzaj *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Ralstonia*), bakterie wiążące azot cząsteczkowy (rodzaj *Rhizobium*, *Azotobacter*), a także sinice (np. *Spirulina platensis*, *Synechocystis* sp. PCC 6803) i archeony, np. halofile¹²). Wśród nich są zarówno szczepy dzikie, jak i genetycznie modyfikowane. Wiele szczepów wytwarzających PHA jest dostępnych również w sprzedaży w kolekcjach krajowych lub zagranicznych. Najczęściej są one odpowiednio udokumentowane pod względem genetyki i biochemii. Dzięki tej wiedzy możliwe jest wytypowanie szczepu pod kątem docelowego źródła węgla jako substratu do biosyntezy PHA.

Mikroorganizmy gromadzą polimery PHA wewnątrzkomórkowo w postaci granuliek lipidowych, zwanych karbosomami, o wymiarach 200–500 nm, które działają jako rezerwa węglowa i energetyczna.

W zależności od warunków hodowli niezbędnych do otrzymania PHA, mikroorganizmy zdolne do tego procesu zostały podzielone na dwie grupy. Pierwszą grupą są drobnoustroje wymagające nadwyżki źródła węgla w pożywce oraz ograniczonego poziomu tlenu i źródeł azotu (tzw. warunki stresowe), np. *Cupriavidus necator* (syn., *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*), *Protomonas extorquens* i *Pseudomonas oleovorans*. Drugą grupę stanowią mikroorganizmy, które nie wymagają limitacji związków odżywczych, a PHA kumulują w fazie wykładniczego wzrostu, np. *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes vinelandii* oraz rekombinowana *Escherichia coli*⁷).

Cupriavidus necator jest jedną z najlepiej przebadanych bakterii wytwarzających PHA, której zdolność do gromadzenia tego biopolimeru wynosi do 90% całkowitej suchej masy (s.m.) komórek¹⁸). Do mikroorganizmów o potencjale komercyjnym, zdolnych do wytwarzania PHA na poziomie ok. 80% należą natomiast *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas* sp., *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Haloferax mediterranei*, *Saccharophagus degradans*, *Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Azohydromonas lata*, *Chromobacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Azotobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Zobellella denitrificans*, *Dechloromonas* sp., *Comamonas* sp., *Aeromonas* sp., *Erwinia* sp. oraz rekombinowana genetycznie *E. coli*⁹). W literaturze opisano również otrzymywanie PHA z wyko-

rzystaniem roślin transgenicznych, z wydajnością sięgającą ok. 20% s.m. w przypadku lnicznika siewnego (*Camelina sativa* L.)²⁰). Możliwa jest także chemiczna synteza PHA, metodami polikondensacji i polimeryzacji z otwarciem pierścienia monomerów β -laktonowych^{21, 22}).

Masa cząsteczkowa PHA zwykle mieści się w zakresie 100–1000 kDa i jest uzależniona od gatunku drobnoustroju syntetyzującego biopolimer, warunków hodowli, w tym pH, oraz rodzaju i stężenia źródła węgla²³). Cząsteczka PHA składa się zazwyczaj z 600–35000 jednostek monomeru (R)-hydroksykwasu tłuszczowego. Każda jednostka monomeru zawiera grupę R łańcucha bocznego, która zwykle jest nasyconą grupą alkilową (rysunek), ale może również przybierać postać nienasyconych grup alkilowych, rozgałęzionych grup alkilowych i podstawionych grup alkilowych, chociaż formy te są mniej powszechne²⁵). Do tej pory zidentyfikowano ok. 150 różnych monomerów PHA, a liczba ta stale rośnie wraz z wprowadzaniem nowych rodzajów PHA poprzez chemiczną lub fizyczną modyfikację naturalnie występujących PHA²⁶) lub poprzez wykorzystanie do tego celu organizmów zmodyfikowanych genetycznie (GMO)²⁷).

W zależności od całkowitej liczby atomów węgla w monomerze PHA można sklasyfikować jako PHA o krótkim łańcuchu (scl-PHA; 3–5 atomów węgla), PHA o średniej długości łańcucha (mcl-PHA; 6–14 atomów węgla) i PHA o długim łańcuchu (lcl-PHA; 15 lub więcej atomów węgla). Najczęściej wytwarzanymi PHA są scl-PHA, natomiast lcl-PHA występują stosunkowo rzadko i są najmniej zbadanymi materiałami spośród wszystkich rodzajów PHA.

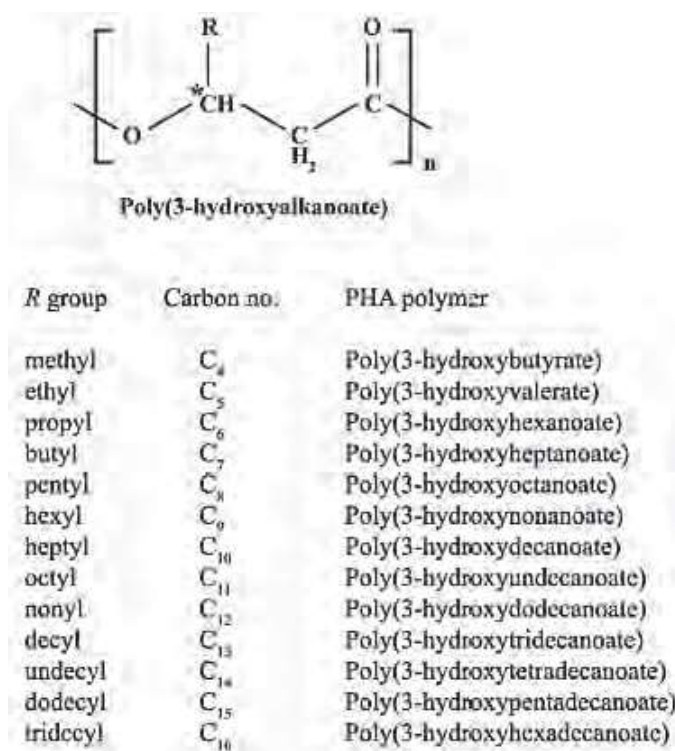


Figure. General structure of polyhydroxyalkanoates(PHAs)²⁴

Rysunek. Ogólna struktura polihydroksyalkanianów (PHA)²⁴

Większość scl-PHA, z wyjątkiem poli(4-hydroksymaślanu), jest krucha i sztywna oraz charakteryzuje się wysoką temperaturą topnienia i zeszklenia. Mcl-PHA są z natury wysoce elastomerowe, mają niską temperaturę topnienia i zeszklenia. PHA mogą być półkryształiczne (scl-PHA i większość mcl-PHA) lub całkowicie amorficzne (niektóre mcl-PHA). Różne PHA wykazują zatem specyficzne właściwości materiałowe, które zostały wykorzystane do określonych zastosowań.

Biopolimery mają szeroki zakres zastosowań w takich dziedzinach, jak medycyna, farmacja, przemysł i rolnictwo. Biodegradowalność oraz biokompatybilność z organizmem człowieka sprawiają, że PHA są dobrym materiałem stosowanym w bioinżynierii. Wykonuje się z nich nici chirurgiczne, implanty, wypełniacze tkanekowe i opatrunki. Do najczęściej wykorzystywanych w tym celu polimerów należą scl-PHA, mcl-PHA oraz ich kopolimery: PHBV, PHBHHx i PHO²⁸). Inną formą wykorzystania PHA jest tworzenie alternatywnych systemów podawania leków. Nanocząstki PHBHHx okazały się skuteczne w dostarczaniu substancji przeciwnowotworowych do zmienionych komórek²⁹), natomiast cząsteczki PHB w połączeniu ze specyficznym ligandem udało się pomyślnie wykorzystać przy opracowaniu celowanej terapii raka piersi³⁰).

Polihydroksyalkaniany, zwłaszcza PHB oraz jego kopolimery, głównie PHBV, cechuje mała przepuszczalność gazów. Dzięki tej właściwości są one dobrym tworzywem do powlekania kartonowych opakowań w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Przykładem takiego materiału jest tworzywo BIOPOL[®], będące kopolimerem 3HB i 3HV wyprodukowanym przez brytyjską firmę ICI, z którego wytwarzano jednorazowe naczynia, sztucce, opakowania, butelki na kosmetyki do włosów oraz plastikowe części jednorazowych maszynek do golenia³¹).

W rolnictwie wykorzystywane są głównie kopolimery scl-PHA i mcl-PHA, takie jak PHBV. PHB z domieszką mcl-PHA do produkcji folii rolniczych, których można używać jako osłony podczas stosowania nawozów mocznikowych, herbicydów i insektycydów. Z P(3HB-co-3HV) tworzy się dyspensery środków ochrony roślin. PHA można również dodawać do inokulantów bakteryjnych wspomagających wiązanie azotu w roślinach, w celu zwiększenia zawartość składników odżywczych niezbędnych do przetrwania mikroorganizmów³¹). PHA są obecnie produkowane przez firmy, takie jak Metabolix[®] (Woburn, MA, USA), Procter & Gamble Co., Ltd. (Cincinnati, OH, USA), Tianjin Green Bioscience Co., Ltd. (Tianjin, Chiny) oraz Biocycle PHB Industrial SA (Serrano, SP, Brazylia)³²).

Wytwarzanie PHA z tanich źródeł węgla

Stosowanie czystych substratów (cukrów, takich jak sacharoza, maltoza, laktoza, ksyloza i arabinoza; *n*-alkanów, takich jak heksan, oktan i dekan; kwasów *n*-alkanowych,

takich jak kwas octowy, propionowy, masłowy, waleriano-
wy, laurynowy i oleinowy; *n*-alkoholi, takich jak metanol,
etanol, oktanol i glicerol) wpływa korzystnie na jakość
syntezowanego PHA, aczkolwiek stanowi znaczne obciążenie
finansowe dla całego procesu produkcji. Konieczne jest
zatem zastąpienie drogich substratów węglowych wcho-
dzących w skład podłoży fermentacyjnych ich tańszymi
odpowiednikami.

Nowoczesne podejście do zagadnienia biotechnologicznej
produkcji PHA zakłada zastosowanie produktów
odpadowych generowanych przez różne gałęzie przemysłu,
głównie spożywczego, jak również produktów i odpadów
rolnych. Stosowane w tym celu surowce powinny być
przede wszystkim tanie, łatwo dostępne oraz charaktery-
zować się niskim stopniem zanieczyszczenia. Ważne jest
również, aby ich stosowanie pozwalało na szybką i wydajną
produkcję PHA, nie generowało produktów ubocznych,
a także aby ich przygotowanie do procesu fermentacji, czyli
hydroliza zawartych w nich złożonych źródeł węgla, nie
była zbyt kosztowna³³). Ponadto dla zrównoważonej pro-
dukcji istotne jest także możliwie jak najczęstsze wykorzy-
stanie źródeł węgla, które nie mogą znaleźć zastosowania
jako pożywienie dla ludzi lub zwierząt.

Do głównych produktów odpadowych pochodzących
z przemysłu i rolnictwa, wykorzystywanych jako źródło
węgla w procesie biosyntezy PHA i opisanych w literaturze
należą: melasa, serwatka, odpady z produkcji biopaliw,
tłuszcze, skrobia, lignoceluloza i pozostałości owoców.

Melasa

Zdaniem wielu autorów melasa z trzciny lub buraków
cukrowych, będąca produktem ubocznym przemysłu
cukrowniczego, może stanowić niedrogi źródło węgla
w procesie biosyntezy PHA. Melasa obok wysokiej
zawartości cukrów (33–50%), głównie sacharozy, rafino-
zy oraz cukru inwertowanego, zawiera związki azotu
(0,2–2,8%), witaminy (ryboflawinę, pirydoksynę, tia-
minę, kwas pantotenowy), a także pierwiastki śladowe,
które mogą korzystnie wpływać na przyrost biomasy
mikroorganizmów.

Nie wszystkie mikroorganizmy produkujące PHA zawie-
rają hydrolazy glikozylowe, zdolne do metabolizowania
disacharydu sacharozy i jej rozkładu do przyswajalnych
cukrów prostych, glukozy i fruktozy. Dlatego też melasa
przed wykorzystaniem jako substrat do procesów fermenta-
cji często musi zostać poddana hydrolizie chemicznej (kwa-
sowa, zasadowa) lub enzymatycznej (enzymy sacharaza,
inwertaza)³⁴). Możliwe jest także zastosowanie w procesach
biosyntezy PHA rekombinowanych szczepów, zdolnych
do jednoczesnego metabolizowania sacharozy zawartej
w melasie. Wykazano, że melasa może być stosowana
jako jedyne źródło węgla dla szczepu *Klebsiella aeroge-
nes*, zawierającego geny do syntezy PHB z *Alcaligenes
eutrophus*³⁵). W innej pracy opisano otrzymywanie rekombi-
nowanego szczepu *C. necator* H16, zawierającego geny

(CSC) *E. coli* W, odpowiadające za wykorzystanie sacharo-
zy. Maksymalna ilość uzyskanej biomasy tego szczepu
wynosiła ok. 113 g/L, a zawartość kopolimeru P(3HB-
co-3HHx) ok. 70–80%³⁶). Wykorzystanie z kolei szczepu
Ralstonia eutropha, zawierającego gen *sacC* z *Mannheimia
succiniciproducens* kodujący β -fruktofuranozydazę zdolną
do hydrolizy sacharozy do glukozy i fruktozy, pozwoliło
na syntezę kopolimeru P(3HB-co-LA) przy zawartości
polimeru 29,1%³⁷).

O konieczności zastosowania wstępnej obróbki melasy
jako źródła węgla do biosyntezy PHA świadczą badania
Ertana i współpr.³⁸). W hodowlach szczepu *C. necator*
ATCC 25207 oceniali oni przydatność melasy buraczanej
nietraktowanej i hydrolizowanej kwasem lub inwertazą
do produkcji PHB w różnych trybach uprawy. Podczas
hodowli wytrząsanych w kolbach z surową melasą stężenie
biomasy szczepu produkcyjnego wynosiło 2,1–3,9 g/L,
a zawartość polimerów 4,4–4,9%. Wartości te dla hydro-
lizowanej melasy były wyższe i wynosiły odpowiednio
5,5 g/L i 43,2%. Podczas hodowli bakterii w fermentorze
w trybie z okresowym zasilaniem stężenie biomasy i poli-
meru wzrosło natomiast do 29 g/L i 53%.

O możliwości wykorzystania hydrolizatów melasy
z trzciny cukrowej otrzymanych różnymi metodami
jako substratów do produkcji PHB informował także
Sen i współpr.³⁹). Zastosowanie melasy z trzciny cukro-
wej poddanej hydrolizie kwasowej ze wstępną obróbką
hydrotermalną w piecu zapewniło akumulację polimeru
na poziomie 27% w hodowli *C. necator*. Zdaniem auto-
rów sposób hydrolizy melasy miał wpływ na stosunek
powstającej fruktozy i glukozy, a duże stężenia fruktozy
korzystanie wpływały na przyrost biomasy komórko-
wej oraz produkcję PHB. Stwierdzono ponadto, że zbyt
wysoka temperatura stosowana podczas hydrolizy mela-
sy może sprzyjać powstawaniu produktów ubocznych,
takich jak 5-hydroksymetylofurfural (HMF), który jest
toksyczny dla wielu mikroorganizmów⁴⁰). Powyższą
koncepcję potwierdzają badania Bae i współpr.⁴¹), którzy
wykazali, że w hodowli *C. necator* DSM 545, przy zasto-
sowaniu melasy z trzciny cukrowej prehydrolizowanej
w wysokich temperaturach kwasem siarkowym, można
uzyskać zawartość polimeru wynoszącą zaledwie 13%.
Znacznie wyższą kumulację i wydajność PHA uzyskali
natomiast inni autorzy po zastosowaniu jako jedyne
źródła melasy poddanej hydrolizie kwasowej bez wstęp-
nej obróbki termicznej. Kingsly i współpr.⁴²), prowadząc
fermentację okresową z wykorzystaniem dzikiego szczepu
Enterobacter cloacae na podłożu zawierającym 4% kwa-
sowego hydrolizatu melasy z trzciny cukrowej, otrzymali
kumulację PHA na poziomie 48–56% przy maksymalnej
wydajności 4,13–4,98 g/L.

Serwatka

Serwatka stanowi główny produkt uboczny przemysłu
mleczarskiego. Jest otrzymywana przez wytrącanie i usu-

wanie kazeiny z mleka podczas procesów serowarskich i została szeroko przebadana pod kątem produkcji PHA. Rocznie na całym świecie produkuje się ok. 120 mln t serwatki, z czego tylko 50% jest wykorzystywane w żywieniu ludzi i zwierząt⁴³). Pozostałą serwatkę należy zutyliczować, co może stanowić zagrożenie dla środowiska ze względu na stosunkowo wysoką zawartość substancji organicznych. Serwatka składa się głównie z laktozy (39–60 g/L), tłuszczów (0,99–10,58 g/L), białek (27–60 g/L) oraz soli mineralnych (4,6–8 g/L)⁴⁴).

Wykazano, że większość z najlepiej opisanych gatunków drobnoustrojów wytwarzających PHA nie jest w stanie bezpośrednio wytwarzać PHA z serwatki. Na przykład *C. necator* H16 jest zdolny do gromadzenia PHA do 80% swojej s.m., gdy jego wzrost następuje na glukozie⁴⁵), ale nie jest w stanie wydajnie rosnąć, a co za tym idzie wytwarzać PHA na laktozie, głównym źródle węgla serwatki⁴⁶). Innym przykładem są halofilne bakterie *Haloferax mediterranei*, które mogą akumulować PHA do ok. 60% swojej s.m.⁴⁷). Niemniej jednak *H. mediterranei*, pomimo zdolności do pobierania laktozy, nie rośnie wydajnie i nie wytwarza PHA przy zastosowaniu tego źródła węgla⁴⁸). Wyjątek stanowi *Alcaligenes latus*, który jest znanym, wydajnym producentem PHA i może gromadzić PHA do 70% swojej s.m. z wykorzystaniem różnych źródeł cukru⁴⁹). Badania prowadzone przez Berwiga i współpracowników⁵⁰) wykazały, że *A. latus* jest w stanie przekształcić laktozę z serwatki w PHA z wydajnością 1,08 g/g, jednak uzyskane stężenia PHA nie są porównywalne ze stężeniami w hodowlach *A. latus* DSMZ 1123 na innych źródłach węgla. Zdolność do wytwarzania PHA wykazuje także szczep *Bacillus flexus* Azu-A2 izolowany ze środowiska wodnego, który po 72 h hodowli wytrząsanej jest w stanie wyprodukować maksymalnie 0,95 g/L PHA przy zawartości 20,96% w s.m.⁵¹).

Badania wykazały, że zastosowanie enzymatycznie lub chemicznie przekształconej laktozy serwatkowej w glukozę i galaktozę jako źródła węgla w procesie fermentacji znacznie zwiększa zdolność szczepów produkcyjnych do syntezy PHA. Według Kollera i współpracowników⁵²) hydrolizowany enzymatycznie permeat serwatki może być wykorzystany przez szczep *Pseudomonas hydrogenovora* DSM 1749 do produkcji PHB oraz kopoliestrów PHA zawierających jednostki 3-hydroksymaślanu (3HB) i 3-hydroksywalerianu (3HV), a uzyskane stężenia wynoszą odpowiednio 1,27 i 1,44 g/L. Znacznie wyższe wartości stężeń PHA z serwatki uzyskiwano, stosując jako szczepy produkcyjne mikroorganizmy modyfikowane genetycznie. Ahn i współpracownicy⁵³) wykazali, że w hodowlach okresowych z zasilaniem szczepu *E. coli* niesącego geny syntezy PHA z *A. latus*, stosując wysokie stężenie serwatki (260 g/L) oraz stopniowo zmniejszając DO od wartości początkowej 40% do wartości końcowej 15%, po 37 h można uzyskać stężenie P(3HB) na poziomie 96,2 g/L i produktywność szczepu wynoszącą 2,57 g/L/h.

Odpady po produkcji biopaliw

Biodiesel, czyli alternatywa dla oleju napędowego, wytwarzany jest z olejów roślinnych i tłuszczów zwierzęcych. W trakcie tego procesu generowane są również produkty odpadowe, których ok. 70% stanowi glicerol. Szacuje się, że na każde 10 t biodiesla powstaje ok. 1 t surowego glicerolu. Pozostałe substancje wchodzące w skład odpadów to metanol, mydło, oleje, sole i stałe materiały organiczne⁵⁴).

Spośród mikroorganizmów akumulujących PHA w komórkach niektóre wykazują zdolność do pobierania glicerolu ze środowiska i przy sprzyjających warunkach przekształcania go w biopolimer⁵⁵). O możliwości zastosowania płynnych odpadów z biodiesla (BLW) do syntezy scl-PHA i mcl-PHA przy udziale dzikiego szczepu *Pseudomonas mendocina* PSU świadczą badania Chanasit i współpracowników⁵⁶). Po wzbogaceniu odpadów w glicerol w ilości 20 g/L uzyskano stężenie biomasy i PHA wynoszące odpowiednio 3,65 i 2,6 g/L (77% s.m.) po 36 h procesu fermentacji. W skład otrzymanego polimeru wchodził 3-hydroksymaślan (3HB), 3-hydroksyoktanian (3HO) oraz 3-hydroksydekanian (3HD).

Badania Basnetta i współpracowników⁵⁷) wskazują na możliwość zastosowania surowego glicerolu jako jedyne źródła węgla do otrzymania kopolimeru P(3HHx-3HO-3HD-3HDD) przy udziale szczepu *Pseudomonas mendocina* CH50. Największe stężenie biomasy otrzymano po 48 h fermentacji przy zawartości biopolimeru wynoszącej 39,5%.

Również Poblete-Castro i współpracownicy⁵⁸) informują o możliwości wytwarzania mcl-PHA w hodowlach okresowych przez różne szczepy z rodzaju *Pseudomonas* za pomocą surowego glicerolu jako źródła węgla. Zdaniem autorów *Pseudomonas putida* KT2440 zgromadził największą ilość mcl-PHA w porównaniu z innymi testowanymi szczepami, która wynosiła 34% s.m. komórek. Modyfikacja genetyczna szczepu poprzez usunięcie genu *pha Z* odpowiedzialnego za depolimeryzację PHA powodowała zwiększenie stężenia PHA do ok. 47% uzyskanej biomasy.

Surowy glicerol okazał się również korzystnym substratem do produkcji PHB przez szczep *Burkholderia cepacia* BPT1213⁵⁹). Po zoptymalizowaniu warunków procesu fermentacji (szybkość napowietrzania 1,5 vvm, szybkość mieszania 800 rpm, czas fermentacji 72 h) stężenie s.m. komórek wynosiło 5,08 g/L, a zawartość polimeru 66,07%.

Tłuszcze

Jedną z grup odpadów, którą można wykorzystać w biotechnologicznej produkcji PHA stanowią organiczne, bogate w lipidy pozostałości przemysłu spożywczego, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. Oleje roślinne jako substraty mają wiele zalet w porównaniu z bogatymi w cukry źródłami węgla, w tym konkurencyjność cenową i znacznie wyższą wydajność produkcji PHA.

Stosowanie olejów roślinnych do celów spożywczych generuje duże ilości odpadów tzw. oleju kuchennego (WCO). Szacuje się, że na całym świecie produkuje się

ponad 29 mln t WCO rocznie⁶⁰), co daje możliwości wykorzystania oleju kuchennego jako niedrogiego substratu węglowego do produkcji PHA. Według Songa i współpr.⁶¹) odpadowy olej roślinny można zastosować do syntezy różnych rodzajów mcl-PHA z wykorzystaniem szczepu *Pseudomonas* sp. DR 2 stanowiącego izolat pochodzący z pola ryżowego. Z kolei Rao i współpr.⁶²) wskazują na możliwość biosyntezy kopolimeru P(3HB-co-4HB) przez szczep *C. necator* z wykorzystaniem zużytego oleju palmowego po smażeniu jako głównego źródła węgla i dodatku prekursora w postaci 1,4 butanodiolu. Mozejko i współpr.⁶³) wykazali natomiast, że szczep *Pseudomonas* sp. G 101 ze zużytego oleju rzepakowego wytwarza głównie monomery kwasu 3-hydroksyoktanowego (3HO) i kwasu 3-hydroksydekanowego (3HD), zaś szczep G106 produkuje znaczne ilości monomerów 3-hydroksyheksanianu (3HHx). W innym badaniu ci sami autorzy wykazali, że stosując impulsowe podawanie odpadowego oleju rzepakowego do hodowli szczepu *Pseudomonas* sp. G101, po 41 h procesu można uzyskać mcl-PHA, którego stężenie w suchej biomacie wynosi do 44%⁶⁴). Do ciekawych wniosków doszedł również Kourmentza i współpr.⁶⁵), wskazując na możliwość współprodukcji polimerów P(3HB) wraz z surfaktantami z grupy ramnolipidów przez szczep *Burkholderia thailandensis* zdolny do biokonwersji WCO. Zdaniem tych autorów stężenie P(3HB) w s.m. komórek *B. thailandensis* wynosiło 60% przy jednoczesnym wytwarzaniu ramnolipidów na poziomie 2,2 g/L.

Oprócz WCO istnieją inne kategorie olejów roślinnych, które są niejadalne dla ludzi i zwierząt, lecz mogą stanowić potencjalny substrat do produkcji PHA. Jednym z przykładów jest olej z nasion krzewu jatrofa (*Jatropha curcas* L.), rosnącego na suchych terenach Azji, Afryki oraz Ameryki Łacińskiej. Wykazano, że wykorzystując olej jatrofowy, szczep *C. necator* H16 był w stanie zsyntezować homopolimery P(3HB) o analogicznych właściwościach fizykochemicznych z homopolimerami wytwarzanymi z oleju palmowego lub innych źródeł węgla. Należy również podkreślić, że chociaż olej jatrofowy jest toksyczny dla ludzi i zwierząt, to nie wpływał na zahamowanie wzrostu szczepu produkcyjnego⁶⁶). Zdaniem Zainab-L i współpr.⁶⁷) również olej elemi, z gorzkich jabłek, z daktylowca pustynnego (*Phoenix dactylifera*) oraz olej z *Amygdalus pedunculata* mogą być metabolizowane zarówno przez szczepy *C. necator* typu dzikiego, jak i ich modyfikacje, do homopolimeru P(3HB) i kopolimeru P(3HB-co-3HHx) o wysokiej masie cząsteczkowej (500–2400 kDa).

Odpadowe tłuszcze zwierzęce pochodzące z przetwórstwa spożywczego i uboju także mają ogromny potencjał jako źródło węgla do produkcji PHA. Jednakże ze względu na wysoką temperaturę topnienia i trudności z rozproszeniem w wodzie tłuszcze zwierzęce mogą stwarzać problemy podczas procesów fermentacji. Niektóre tłuszcze zwierzęce pozostają stałe przez cały proces fermentacji, dlatego bakterie mają problem z ich rozkładem i wykorzystaniem

jako źródła węgla do wzrostu i biosyntezy PHA⁶⁸). Według Riedela i współpr.⁶⁹) rekombinowany szczep *C. necator* Re2058/pCB113, skonstruowany w celu wytwarzania dużej frakcji 3-hydroksyheksanianu (3HHx) z odpadowych tłuszczów zwierzęcych (łój, smalec, sadło) poddanych wcześniejszej emulgacji, z powodzeniem zsyntezował 49–72% mas. P(3HB-co-3HHx), składającego się z 16–27% mol. 3HHx. Gutschmann i współpr.⁷⁰) donoszą natomiast, że zmodyfikowany szczep *R. eutropha* Re2058/pCB113 w hodowlach bioreaktorowych z emulsji tłuszczowo-białkowej (FPE), stanowiącej odpad z produkcji farmaceutycznej heparyny, może uzyskać 51 g/L s.m. komórek, w której PHA stanowi 71% mas.

Do produkcji PHA mogą być również wykorzystywane produkty uboczne, w tym oleje (WFO) generowane w dużej ilości przez przemysł rybny, które do niedawna były wyrzucane jako odpad do morza⁷¹). Badania Kaesavana⁷²) wykazały, że stosując zemulgowany gumą arabską odpadowy olej rybny jako źródło węgla w hodowlach *C. necator*, można uzyskać 4,85 g/L biomasy komórkowej, w której zawartość P(3HB) wynosi ok. 73%. Ponadto szczep *C. necator* H16 na pożywcę hodowlanej zawierającej olej rybny i dodatki różnych prekursorów (4-hydroksymaślan sodu, 1,4-butanodiol, γ -butyrolakton lub walerian sodu) jest także w stanie wytworzyć kopolimery P(3HB-co-4HB) i P(3HB-co-3HV), w których maksymalne zawartości monomerów 4HB i 3HV wynoszą odpowiednio 36% mol. i 64% mol. W innej pracy⁷³) stwierdzono, że dziki szczep *C. necator* B-10646 do produkcji PHA może wykorzystywać odpadowy olej rybny zawierający zestaw kwasów tłuszczowych o długości łańcucha C₁₄–C₂₄, który pochodzi z produkcji szprotu w puszcze⁷³). Szczep produkcyjny najchętniej metabolizował kwasy polienowe, a nie monoenuowe i nasycone, a wydajność uzyskanej biomasy bakteryjnej i wewnątrzkomórkowe stężenie polimeru wynosiły 6,5 g/L i 65% mas. Wykazano także, że zsyntezowane PHA były trójskładnikowymi kopolimerami z przewagą (97–98% mol.) monomerów 3-hydroksymaślanu oraz niewielkimi wtrąceniami 3-hydroksywalerianu i 3-hydroksyheksanianu, a stosunek monomerów zmieniał się nieznacznie w zależności od stężenia oleju szprotowego.

Skrobia

Skrobia jest jednym z najczęściej stosowanych surowców naturalnych wykorzystywanych w produkcji PHA, co wiąże się z jej niską ceną oraz dużą dostępnością. Stosowane w badaniach materiały skrobiowe to przede wszystkim ziemniaki, pszenica, jęczmień, kukurydza, ryż, żyto i kassawa. Wiele szczepów bakteryjnych, zdolnych do syntezy PHA nie wytwarza α -amylazy, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za hydrolizę skrobi. Istnieje zatem konieczność poddania surowców skrobiowych wstępnej obróbce mającej na celu hydrolizę zawartej w nich skrobi do cukrów prostych.

Badania Haasa i współprac. ⁷⁴⁾ wykazały, że upłynniona i scukrzona skrobia, stanowiąca odpad ziemniaczany z produkcji chipsów, może stanowić doskonale źródło do syntezy PHA. W hodowli okresowej z zasilaniem szczepu *R. eutropha* NCIMB 11599 na pożywce zawierającej powyższy substrat uzyskano 179 g/L s.m. komórek przy zawartości 55% mas. PHA. W innym badaniu Chen i współprac. ⁷⁵⁾ odnotowali 50,8-proc. akumulację PHBV w komórkach *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 po zastosowaniu ekstrudowanej enzymatycznie skrobi kukurydzianej jako źródło węgla w hodowli półciągłej. Z kolei szczep *R. eutropha* w hodowli okresowej z zasilaniem na podłożu zawierającym hydrolizat skrobiowy z sago był w stanie wyprodukować PHA z wydajnością 76,54%, a stężenie polimeru wynosiło 3,72 g/L ⁷⁶⁾.

Niektórzy autorzy, aby uniknąć dodatkowych kosztów związanych z upłynnianiem i scukrzaniem skrobi, zalecają stosowanie szczepów mikroorganizmów zdolnych do produkcji PHA bezpośrednio ze skrobi. Przykładowo Kim ⁷⁷⁾ wykazał, że szczep *Azotobacter chroococcum* jest zdolny do produkcji P(3HB), wykorzystując skrobię rozpuszczalną. Maksymalne stężenie biopolimeru wynosiło 25 g/L, a zawartość w biomacie komórkowej 46%. Zdolność do konwersji skrobi i jednoczesnej biosyntezy PHA wykazuje także szczep *Bacillus cereus* CER06 izolowany z gleby i akumulujący PHA na poziomie 36–60% ⁷⁸⁾.

Według dostępnych danych pierwszy komercyjny PHA został wyprodukowany w Wielkiej Brytanii przez Imperial Chemical Industries (ICI) za pomocą glukozy pochodzącej ze skrobi, z wykorzystaniem szczepu *R. eutropha* ⁷⁹⁾. Technologia ICI wymaga zastosowania kwasu propionowego jako współsubstratu do wytworzenia pożądanego kopolimeru; w przeciwnym razie jest wytwarzany tylko homopolimer P(3HB). Komercyjna produkcja P(3HB) za pomocą *A. latus* przez Chemie Linz również wykorzystywała skrobię jako substrat wyjściowy ⁸⁰⁾.

Lignoceluloza

Obiecującym substratem węglowym do produkcji PHA są lignocelulozowe odpady rolnicze, powstałe w procesie produkcji rolnej, do których należą lignocelulozowe pozostałości poźniwne, w skład których wchodzi celuloza, hemiceluloza i ligniny ⁸¹⁾. Głównym źródłem pozostałości poźniwnych są liście, słoma oraz inne lignocelulozowe części roślin spożywczych. Pozostałości te wymagają hydrolizy do cukrów redukujących w celu ich wykorzystania jako substratu do syntezy PHA. Badania Getache i Woldesenbet ⁸²⁾ wykazały, że izolat ściekowy (AWW), zidentyfikowany jako *Bacillus* sp., był w stanie zgromadzić 51,6% PHB, wykorzystując jako jedyne źródło węgla zhydrolizowane kolby kukurydzy (kaczany). Zdaniem Cesário i współprac. ⁸³⁾ również hydrolizaty słomy pszennej, bogate w pentozy i heksozy, po wzbogaceniu dodatkiem prekursora w postaci γ -butyrolaktonu mogą stanowić obiecujący substrat do

syntezy P(3HB) przez szczep *Burkholderia sacchari*, którego produktywność wynosi 0,5 g/L/h. Heng i współprac. ⁸⁴⁾ wykazali z kolei, że stosując jako substrat hydrolizaty z łusek ryżu, można uzyskać w hodowlach wytrząsanych szczepu *Burkholderia cepacia* USM (JCM 15050) ok. 4,9 g/L s.m. komórek, z czego PHA stanowi 40%, a w hodowlach bioreaktorowych 7,8 g/L biomasy przy zawartości biopolimeru 50%. Ponadto wykazano, że szczep *B. cepacia* USM (JCM 15050) jest w stanie metabolizować związki fenolowe powstałe w wyniku zasadowej hydrolizy surowców lignocelulozowych, które w stosunku do innych szczepów mogą wykazywać działanie toksyczne.

Pozostałości owoców

Pozostałości owoców powstają głównie z przetwarzania owoców i są to skórki lub łupiny, łądygi, nasiona, miąższ i wytloki. Mają one większą zawartość dostępnych cukrów fermentowanych w porównaniu z resztkami roślin uzyskanymi z przemysłu spożywczego. Według niektórych autorów hydrolizat ze skórki ananasa może być z sukcesem stosowany do produkcji PHV przez szczep *R. eutropha* ATCC 17697, przy zawartości biopolimeru na poziomie 60% lub wyższej ⁸⁵⁾. Z kolei stosując hydrolizat z rdzenia ananasa, za pomocą szczepu *C. necator* A-04 można uzyskać 5,88 g/L s.m. komórek przy zawartości PHB wynoszącej 35,6 % ⁸⁶⁾. Badania te dowodzą również, że szczep *C. necator* A-04 wykazuje tolerancję na kwas lewulinowy i 5- hydroksymetylofurfural zawarte w wykorzystywanym hydrolizacie. Zdaniem Guzmana Lagunesa i Winterburna ⁸⁷⁾ z hydrolizatów odpadów powstałych po wyciskaniu soku z pomarańczy możliwe jest uzyskanie 9,58 g/L PHB przy jego zawartości w s.m. wynoszącej 81,4%. Z kolei skórki bananów mogą stanowić nie tylko źródło węgla do syntezy PHA, ale także źródło witamin i pierwiastków śladowych. Maity i współprac. ⁸⁸⁾, stosując skórki bananów jako substrat węglowy do produkcji PHB z wykorzystaniem szczepu *Zobellella taiwanensis* DD 5, uzyskali 1,13 g/L polimeru przy jego zawartości 47,3% w s.m.

Wydajna produkcja PHA oparta na kompleksowym wykorzystaniu pozostałości owocowych może stanowić cenny kierunek badań. Trzeba jednak pamiętać, że rodzaj owoców, środowisko wzrostu, sezon zbiorów wpływają istotnie na skład chemiczny pozostałości owoców, co może mieć wpływ na niestabilność wytwarzania PHA z tego rodzaju odpadu.

Podsumowanie

W artykule omówiono właściwości polihydroksyalkanianów (PHA), biopolimerów o ogromnym potencjale zastosowań praktycznych. PHA wykazują wiele zalet, takich jak biokompatybilność (brak toksyczności dla organizmu), biodegradowalność oraz właściwości termoplastyczne zbliżone do właściwości tworzyw sztucznych. Niestety, pomimo tych zalet PHA nie są powszechnie stosowane ze względu na

wysokie koszty ich otrzymywania i oczyszczania. Dlatego, w celu zmniejszenia kosztów, podejmowane są wysiłki mające m.in. na celu zastąpienie tradycyjnych źródeł węgla w hodowlach mikroorganizmów tańszymi materiałami odpadowymi. Dostępne dane literaturowe wskazują, że stosowane metody biotechnologicznej produkcji PHA ze źródeł odnawialnych wykazują niewątpliwie wiele zalet. Jednakże jest jeszcze wiele problemów do pokonania, aby mogła się ona odbywać na masową skalę i była opłacalna ekonomicznie.

Praca powstała w ramach dotacji subwencyjnej finansowanej ze środków MNiSW nr decyzji DIR-WNO.905.6.19.2022. IK oraz DIR-WNO.905.11.2023.ACK.

Otrzymano: 12-08-2024

Zrecenzowano: 26-08-2024

Zaakceptowano: 02-09-2024

Opublikowano 21-10-2024

LITERATURA

- [1] <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>.
- [2] Plastics-The Facts 2018, raport, Plastics Europe, <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2018-Plastics-the-facts.pdf>.
- [3] W. Nocoń, K. Moraczewska-Majkut, E. Wiśniowska, M. Pałka, *Technol. Wody* 2018, **60**, nr 4, 24.
- [4] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, *Sci. Adv.* 2017, **3**, e1700782.
- [5] D.K. Bedade, C.B. Edson, R.A. Gross, *Molecules* 2021, **26**, nr 11, 3463; <https://doi.org/10.3390/molecules26113463>.
- [6] P. Costa, M. Basaglia, S. Casella, L. Favaro, *Polymers* 2022, **14**, 5529, <https://doi.org/10.3390/polym14245529>.
- [7] A.A. Alves, E.C. Siqueira, M.P.S. Barros, P.E.C. Silva, L.M. Houllou, *Int. J. Eng. Sci. Technol. (IJEST)* 2023, **20**, 3409, <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04213-9>.
- [8] J. Choi, S.Y. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, **51**, 13, <https://doi.org/10.1007/s002530051357>.
- [9] T. Nguyenhuynh, L.W. Yoon, Y.H. Chow, A.S.M. Chua, *Chem. Eng. J.* 2021, **420**, nr 3, 130488, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130488>.
- [10] A.B. Akinmulewo, O.C. Nwinyi, *J. Phys. Conf. Ser. (JPCS)* 2019, **1378**, 042007, DOI: 10.1088/1742-6596/1378/4/042007.
- [11] P.K. Obulisamy, S. Mehariya, *Bioresources* 2021, **325**, 124653, DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124653.
- [12] G.-Y.A. Tan, C.-L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I.M.N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.-Y. Wang, *Polymers* 2014, **6**, 706, <https://doi.org/10.3390/polym6030706>.
- [13] G. Pagliano, P. Galletti, Ch. Samorì, T.C. Zaghini, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, **9**, 624021, DOI: 10.3389/fbioe.2021.624021.
- [14] A. Pandey, N. Adama, K. Adjallé, J.-F. Blais, *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, **221**, 1184, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.098>.
- [15] M. Kumar, R. Rathour, R. Singh, Y. Sun, A. Pandey, E. Gnansounou, D.C.W. Tsang, I.S. Thakur, *J. Clean. Prod.* 2020, **263**, 1, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>.
- [16] L.L. Wallen, W.K. Rohwedder, *Environ. Sci. Technol.* 1974, **8**, 576.
- [17] A. Khardenavis, P.K. Guha, M.S. Kumar, S.N. Mudliar, T. Chakrabarti, *Environ. Technol.* 2005, **26**, 545, DOI: 10.1080/09593332608618536.
- [18] L. Favaro, M. Basaglia, S. Casella, *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 2019, **13**, 208, <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>.
- [19] A. Anjum, M. Zuber, K.M. Zia, A. Noreen, M.N. Anjum, S. Tabasum, *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, **89**, 161, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
- [20] M.N. Somleva, O.P. Peoples, K.D. Snell, *Plant Biotechnol. J.* 2013, **11**, 233, <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.1203>.
- [21] U.D. Lengweiler, M.G. Fritz, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* 1996, **79**, 670, <http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19960790311>.
- [22] Z. Jedliński, M. Kowalczyk, P. Kurcok, *Makromol. Chemie Macromol. Symp.* 1986, **3**, 277, <http://dx.doi.org/10.1002/masy.19860030121>.
- [23] A.J. Anderson, D.R. Williams, B. Taidi, E.A. Dawes, D.F. Ewing, *Microbiol. Rev.* 1992, **103**, 93, DOI:10.1016/0378-1097(92)90298-3.
- [24] S. Mohammadi, M. Afzal, S. Hameed, *Green Chem. Lett. Rev. (GCLR)* 2015, **8**, nr 3-4, 56, DOI:10.1080/17518253.2015.1109715.
- [25] J. Lu, R.C. Tappel, C.T. Nomura, *Polym. Rev.* 2009, **49**, 226, DOI: 10.3390/molecules25235539.
- [26] M. Zinn, R. Hany, *Adv. Eng. Mater.* 2005, **7**, 408, <https://doi.org/10.1002/adem.200500053>.
- [27] I.F. Escapa, V. Morales, V.P. Martino, E. Pollet, L. Avérous, J.L. García, M.A. Prieto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, **89**, 1583, DOI: 10.1007/s00253-011-3099-4.
- [28] G.Q. Chen, Q. Wu, *Biomaterials* 2005, **26**, 6565, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>.
- [29] A.M. Gumel, M.S.M. Annuar, Y.J. Chisti, *Polym. Environ.* 2013, **21**, 580, <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0527-1>.
- [30] J. Lee, S.-G. Jung, Ch.-S. Park, H.-Y. Kim, C.A. Batt, Y.-R. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, **21**, 2941, DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.03.058.
- [31] S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy, *J. Chem. Technol. Biotechnol. (JCTB)* 2007, **83**, nr 3, 233, <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>.
- [32] G.Q. Chen, *Chem. Soc. Rev.* 2009, **38**, 2434, DOI: 10.1039/b812677c.
- [33] K. Arora, P. Kaur, P. Kumar, A. Singh, S.K.S. Patel, X. Li, Y.-H. Yang, S.K. Bhatia, S. Kulshrestha, *Front. Energy Res.* 2021, **9**, 646571, <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.646571>.
- [34] E.G. Kiselev, A.V. Demidenko, N.O. Zhila, E.I. Shishatskaya, T.G. Volova, *Bioengineering* 2022, **9**, 154, <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040154>.
- [35] H. Zhang, V. Obias, K. Gonyer, D. Dennis, *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, **60**, 1198, DOI: 10.1128/aem.60.4.1198-1205.1994.
- [36] H. Arikawa, K. Matsumoto, T. Fujiki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, **101**, 7497, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8470-7>.
- [37] S.Y. Jo, Y.J. Sohn, S.Y. Park, J. Son, J.I. Yoo, K.A. Baritugo, Y. David, K.H. Kang, H. Kim, J. Choi, i in., *Korean J. Chem. Eng.* 2021, **38**, 1452, <https://doi.org/10.1007/s11814-021-0783-7>.
- [38] F. Ertan, B. Keskinler, A. Tanriseven, *J. Polym. Environ.* 2021, **29**, 2111, <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02020-2>.
- [39] K.Y. Sen, M.H. Hussin, S. Baidurah, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, **17**, 51, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>.
- [40] A. Aramvash, Z.A. Shahabi, S.D. Aghjeh, M.D. Ghafari, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2015, **12**, 2307, DOI: 10.1007/s13762-015-0768-3.
- [41] M.S. Baei, G.D. Najafpour, H. Younesi, F. Tabandeh, H. Issazadeh, M. Khodabandeh, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 2011, **17**, 1.
- [42] J.S. Kingsly, N. Chathalingath, S.A. Parthiban, D. Sivakumar, S. Sabtharishi, V. Senniyappan, V.S. Duraisamy V.S. Jasmine, A. Gunaseka, *Energy Nexus* 2022, **6**, 100071, <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100071>.
- [43] T.M.M.M. Amaro, D. Rosa, G. Comi, L. Iacumin, *Front Microbiol.* 2019, **9**, nr 10, 992, DOI: 10.3389/fmicb.2019.00992.
- [44] B. Colombo, T.P. Sciarria, M. Reis, B. Scaglia, F. Adani, *Bioresour. Technol.* 2016, **218**, 692, DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.024.
- [45] F. Reinecke, A. Steinbüchel, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2008, **16**, 91, DOI: 10.1159/000142897.
- [46] S. Povolo, S. Casella, *Bioresour. Technol.* 2010, **101**, nr 20, 7902, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.029.
- [47] J. Quillaguamán, H. Guzmán, D. Van-Thuoc, R. Hatti-Kaul, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, **85**, 1687, DOI: 10.1007/s00253-009-2397-6 47.
- [48] M. Koller, P. Hesse, R. Bona, C. Kutschera, A. Atlić, G. Braunegg, *Macromol. Biosci.* 2007, **7**, 218, DOI: 10.1002/mabi.200600211.
- [49] G. Gahlawat, A.K. Srivastava, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017, **183**, 530, DOI: 10.1007/s12010-017-2482-8.
- [50] K.H. Berwig, C. Baldasso, A. Dettmer, *Bioresour. Technol.* 2016, **218**, 31, DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.067.
- [51] A.M. Khattab, M.E. Esmael, A.A. Farrag M.I.A. Ibrahim, *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, **190**, 319, DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.090.
- [52] M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, E.G. Fernandes, P. Horvat, C. Kutschera, P. Hesse, G. Braunegg, *Bioresour. Technol.* 2008, **99**, 4854, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.049>.
- [53] W.S. Ahn, S.J. Park, J.S. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, **66**, 3624.
- [54] S.K. Karmee, D. Linardi, J. Lee, C.S.K. Lin, *Waste Manag.* 2015, **41**, 169, DOI: 10.1016/j.wasman.2015.03.025.

- [55] M. Koller, S. Obruca, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2022, **42**, 102333, DOI:10.1016/j.bcab.2022.102333.
- [56] W. Chanasit, B. Hodgson, K. Sudesh, K. Umsakul, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016, **80**, nr 7, 1440, DOI: 10.1080/09168451.2016.1158628.
- [57] P. Basnett, E. Marcello, B. Lukaszewicz, B. Panchal, R. Nigmatullin, J.C. Knowles, I. Roy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018, **29**, 179, DOI: 10.1007/s10856-018-6183-9.
- [58] I. Poblete-Castro, D. Binger, R. Oehlert, M. Rohde, *BMC Biotechnol.* 2014, **14**, 962, <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0110-z>.
- [59] N.F. Mohd Zain, M. Paramasivam, J.S. Tan, V. Lim, C.K. Lee, *Biotechnol. Prog.* 2021, **37**, nr 1, e3077, DOI: 10.1002/btpr.3077.
- [60] G.L. Maddikeri, A.B. Pandit, P.R. Gogate, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012, **51**, 14610, DOI: 10.1021/ie301675j.
- [61] J.H. Song, C.O. Jeon, M.H. Choi, S.C. Yoon, W. Park, *Microbiol. Biotechnol.* 2008, **18**, 1408.
- [62] U. Rao, R. Sridhar, P.K. Sehgal, *Biochem. Eng. J.* 2010, **49**, 13, DOI: 10.1016/j.bej.2009.11.005.
- [63] J. Mozejko, G. Przybyłek, S. Ciesielski, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, **113**, 1550, doi: 10.1002/ejlt.201100148.
- [64] Mozejko, J.S. Ciesielski, *Biotechnol. Prog.* 2014, **30**, 1243, DOI: 10.1002/btpr.1914.
- [65] C. Kourmentza, J. Costa, Z. Azevedo, C. Servin, C. Grandfils, V. de Freitas i in., *Bioresour. Technol.* 2018, **247**, 829, DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.138.
- [66] K.-S. Ng, W.-Y. Ooi, L.-K. Goh, R. Shenbagarathai, K. Sudesh, *Polym. Degrad. Stabil.* 2010 **95**, 1365, DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.021.
- [67] I. Zainab-L, H. Uyama, C. Li, Y. Shen, K. Sudesh, K. Clean, *Soil Air Water* 2018, **46**, 1700542, DOI: 10.1002/clen.201700542.
- [68] R.D. Ashby, D.K. Solaiman, T.A. Foglia, [w:] *Polymers from renewable resources* (red. C. Scholz, R.A. Gross), American Chemical Society, Washington, DC 2001.
- [69] S.L. Riedel, S. Jahns, S. Koenig, M.C. Bock, C.J. Brigham, J. Bader, U. Stahl, *J. Biotechnol.* 2015, **214**, 119, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.09.002.
- [70] B. Gutschmann, T. Högl, B. Huang, M.M. Simões, S. Junne, P. Neubauer, T. Grimm, S.L. Riedel, *Microbial Biotechnol.* 2023, **16**, 286, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14150>.
- [71] P. García-Moreno, R. Pérez-Gálvez, *Ref. Module Food Sci.* 2017, **5**, 21241, DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21241-9.
- [72] P. Kaesavan, *Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) using waste fish oil by Cupriavidus necator*, Msc. thesis, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia 2014.
- [73] N.O. Zhila, K.Y. Sapozhnikova, E.G. Kiselev, E.I. Shishatskaya, T.G. Volova, *Processes* 2023, **11**, 2113, <https://doi.org/10.3390/pr1107211335>.
- [74] R. Haas, B. Jin, F.T. Zepf, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, **72**, 53, <https://doi.org/10.1271/bbb.70503>.
- [75] C.W. Chen, T.-M. Don, H.-F. Yen, *Process Biochem.* 2006, **41**, 2289, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.026>.
- [76] K. Syamsu, A.M. Fauzi, L. Hartoto, A. Suryani, N. Atifah, Proc. of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology 2006, Putrajaya, Malaysia, 24–25 July 2006, 153.
- [77] B.S Kim, *Enzyme Microb. Technol.* 2000 **27**, 774, [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00299-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00299-4).
- [78] P.M. Halami, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, **24**, 805.
- [79] D. Byrom, *FEMS Microbiol. Rev.* 1992, **103**, 247, doi: 10.1016/0378-1097(92)90316-G.
- [80] U.J Hanggi, *Pilot scale production of PHB with alcaligenes latus*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1990.
- [81] J. Wang, S. Liu, J. Huang, Z. Qu, *Bioresour. Technol.* 2021, **342**, 126008, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>.
- [82] A. Getache, F. Woldesenbet, *BMC Res. Notes* 2016, **9**, nr 1, 1, DOI: 10.1186/s13104-016-2321-y.
- [83] M.T. Cesário, R.S. Raposo, M.C.M. de Almeida, F. Van Keulen, B.S. Ferreira, J.P. Telo, M.M.R. da Fonseca, *Int. J. Biol. Macromol.* 2014, **71**, 59, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054.
- [84] K.-S. Heng, R. Hatti-Kaul, F. Adam, T. Fukui, T. Sudesh, *J. Chem. Technol. Biot.* 2017, **92**, nr 1, 100, <https://doi.org/10.1002/jctb.4993>.
- [85] O. Vega-Castro, J. Contreras-Calderon, E. León A. Segura, M. Arias, L. Pérez, P.J Sobral, *J. Biotechnol.* 2016, **231**, 232, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018>.
- [86] V. Sukruansuwan, S.C. Naphorn, *Biotechnol. Biofuels* 2018, **11**, nr 1, 1, <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1207-8> 86.
- [87] F. Guzman Lagunes, J.B. Winterburn, *Bioresour. Technol.* 2016, **221**, 336, DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.045.
- [88] S. Maity, S. Das, S. Mohapatra, S. Tripathi, A.D. Akthar, J. Pati S. Pattnaik, D.P. Samantaray, *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, **153**, 461, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.004>.

