

# Usporedba održivosti biotehnoloških proizvoda proizvodnje polihidroksialkanoata mikrobnog podrijetla iz sekundarnih sirovina

---

Marošević, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:780165>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Matea Marošević**

7578/BT

**USPOREDBA ODRŽIVOSTI  
BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA  
PROIZVODNJE  
POLIHIDROKSIALKANOATA  
MIKROBNOG PODRIJETLA IZ  
SEKUNDARNIH SIROVINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 3

**Mentor:** Prof. dr. sc. *Tonči Rezić*

**Zagreb, 2020**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za Biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za Biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Usporedba održivosti biotehnoloških proizvoda proizvodnje polihidroksialkanoata mikrobnog podrijetla iz sekundarnih sirovina**

***Matea Marošević, 7578/BT***

**Sažetak:** U radu je prikazana proizvodnja polihidroksialkanoata (PHA) na tri razine bioprocasa: procesnoj razini, razini mikrobnih stanica i razini enzima odnosno molekularnoj razini. Također su opisane sirovine koje se koriste u industrijskoj proizvodnji PHA, te je dan pregled razvoja procesa proizvodnje PHA iz industrijski značajnih sekundarnih sirovina: otpada mliječne industrije (sirutke), otpadnih voda i otpada iz mesnoprerađivačke industrije, a istaknuti su i čimbenici koji doprinose održivosti proizvodnje. U zadnjem dijelu prikazani su postupci izdvajanja i pročišćavanja PHA iz mikrobne biomase, te je prikazan potencijal proizvodnje PHA iz sekundarnih sirovina u Republici Hrvatskoj.

**Ključne riječi:** *biopolimeri, industrija, održivost, polihidroksialkanoati, sekundarne sirovine*

**Rad sadrži:** 35 stranica, 6 slika, 5 tablica, 67 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor: Prof. dr. sc. Tonči Rezić**

**Datum obrane:** 01. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area: Biotechnical sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Polyhydroxyalkanoates of microbial origin - comparison of the sustainability of biotechnological production processes from secondary raw materials**

***Matea Marošević, 7578/BT***

**Abstract:** The thesis presents the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) at three levels of bioprocesses: process level, microbial cell level and enzyme level or molecular level. The raw materials used in the industrial production of PHA are also described, and an overview of the PHA production process from industrially significant secondary raw materials (whey waste, wastewater, and waste from the meat processing industry) is given. Although, the factors contributing to sustainable production are emphasised. In the last part, the procedures for the separation and purification of PHA from microbial biomass are presented, and the potential for the production of PHA from secondary raw materials in the Republic of Croatia are discussed.

**Key words:** *biopolymers, industry, polyhydroxyalkanoates, raw materials, sustainability*

**Thesis contains:** 35 pages, 6 figures, 5 tables, 67 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor: Prof. dr. sc. Tonči Rezić**

**Defence date:** September 1<sup>st</sup> 2020

## Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Opća svojstva polihidroksialkanoata .....</b>	<b>2</b>
2.1. Struktura i podjela.....	2
2.2. Svojstva PHA .....	3
2.2.1. Termalna svojstva .....	3
2.2.2. Kristaliničnost.....	3
2.2.3. Biokompatibilnost .....	4
<b>3. Metabolizam polihidroksialkanoata .....</b>	<b>5</b>
3.1. Sinteza monomera .....	5
3.2. PHA sintaze .....	7
3.3. Formulacija PHA granula.....	9
3.4. Depolimerizacija PHA.....	10
3.5. Regulacija .....	11
3.6. Mikroorganizmi producenti .....	11
<b>4. Proizvodnja PHA .....</b>	<b>13</b>
4.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata .....	13
4.2. Kontinuirani višestupanjski uzgoj .....	13
<b>5. Supstrati za proizvodnju PHA .....</b>	<b>15</b>
5.1. PHA iz ugljikohidrata .....	15
5.2. PHA iz triacilglicerola .....	16
5.3. PHA iz ugljikovodika .....	17
<b>6. Primjeri proizvodnje PHA iz sekundarnih sirovina .....</b>	<b>18</b>
6.1. PHARIO – Proizvodnja PHA iz aktivnog mulja tijekom biološke obrade otpadnih voda .....	18
6.2. WHEYPOL- Proizvodnja PHA iz sekundarnih sirovina mliječne industrije.....	19
6.3. ANIMPOL- Proizvodnja PHA korištenjem otpada mesoprerađivačke industrije ..	19
<b>7. Izolacija i pročišćavanje polihidroksiakanoata .....</b>	<b>23</b>
<b>8. Mogućnosti proizvodnje PHA u Republici Hrvatskoj .....</b>	<b>27</b>
<b>9. Zaključak .....</b>	<b>29</b>
<b>10. Popis literature .....</b>	<b>30</b>

## 1. Uvod

Unatoč naprednim svojstvima, troškovi proizvodnje polihidroksialkanoata su značajno viši od troškova proizvodnje plastičnih proizvoda sličnih svojstava dobivenih iz fosilnih izvora. Na troškove proizvodnje značajno utječe cijena korištene sirovine. Stoga je potrebno koristiti „jeftine sirovine“ koje nemaju uporabnu vrijednost i imaju nisku tržišnu cijenu, primjerice poljoprivredni ostaci, otpadna šumska biomasa, aktivni mulj nakon biološke obrade otpadnih voda i ostaci nakon proizvodnje hrane, biogoriva i biokemikalija. Uz sirovine, utjecaj imaju i drugi čimbenici na različitim razinama bioprocasa te se održivosti može doprinijeti na molekularnoj razini (korištenjem tehnika genetičkog i metaboličkog inženjerstva), na razini stanice mikroorganizama (korištenjem novih sojeva mikroorganizama) ili na razini bioprocasa (korištenjem vještina i znanja iz bioprocenog inženjerstva te odabirom učinkovite i efikasne metode izdvajanja i pročišćavanja proizvoda). Primjeri procesa proizvodnje PHA iz sekundarnih sirovina (aktivni mulj, surutka, ostaci mesnoprerađivačke industrije) razvijeni su na različitim mjerilima bioprocasa, te su određeni čimbenici koji značajno utječu na održivost bioprocasa (Narodoslawsky i sur., 2015), a to su:

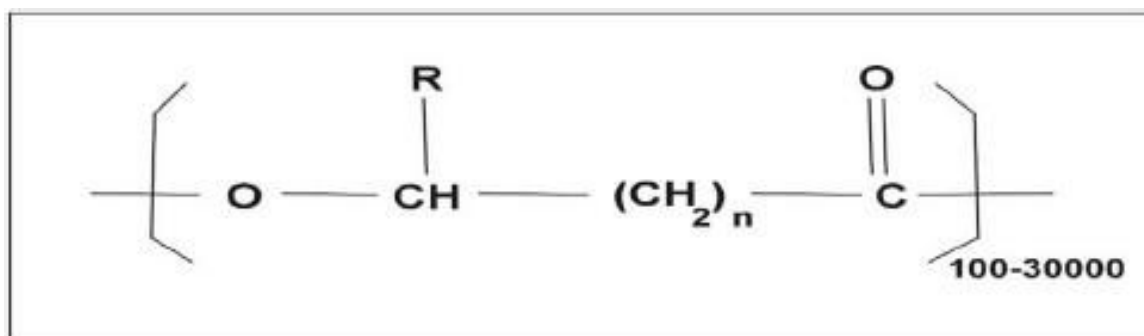
- Udaljenost postrojenja za proizvodnju i izdvajanje od izvora sirovina
- Složenost i broj koraka predtretmana prije procesa proizvodnje u bioreaktoru
- Zahtjevi vezani uz asepticnost i prirodno zaštićen proces
- Cijena i rasprostranjenost sirovine
- Reciklacija ostataka hranjive podloge nakon proizvodnje
- Ekološki čimbenici vezani uz postupak proizvodnje (korištenjen zelenih otapala i enzimsku hidrolizu kako bi se smanjio utjecaj na okoliš)
- Energetski učinkovitiji procesi (optimiranjem pojedinih faza proizvodnje ostvariti uštedu energije uz zadržavanje produktivnosti)
- Uz ekološke i tehnološke čimbenike potrebno je i iskoristiti subvencije za proizvodnju iz obnovljivih izvora (Shahzad i sur., 2013).

U ovom radu bit će prikazana proizvodnja polihidroksialkanoata (PHA) na tri razine bioprocasa: procesnoj razini, razini mikrobnih stanica i razini enzima odnosno molekularnoj razini. Nadalje, bit će opisane sirovine te pregled razvoja procesa proizvodnje PHA iz industrijski značajnih sirovina: otpadnih voda i otpada iz mesnoprerađivačke te mliječne industrije (surutka). Također će biti opisani čimbenici održivosti. U zadnjem dijelu bit će prikazani postupci izdvajanja i pročišćavanja PHA iz mikrobne biomase i potencijal proizvodnje PHA iz sekundarnih sirovina u Republici Hrvatskoj.

## 2. Opća svojstva polihidroksialkanoata

### 2.1. Struktura i podjela

Polihidroksialkanoati su prirodni polimeri, a proizvode ih i nakupljaju unutar stanica mnogi mikroorganizmi kao intracelularne rezerve energije i izvor ugljika. Strukturno su poliesteri u kojima su jedinice (monomeri hidroksikiselina) povezani esterskom vezom (Akaraonye i sur., 2010). Pripadajuće alkilne grupe u PHA mogu varirati od metilne (C1) do trideciline (C13) te je identificirano preko 150 različitih hidroksialkanoatnih jedinica s različitim R-alkilnim grupama. Lanac polimera može sadržavati između 100 i 30000 monomernih hidroksialkanoatnih jedinica koje su sve R (-) konfiguracije zahvaljujući stereospecifičnosti PHA sintaze. Broj metilenskih grupa u kosturu glavnom lancu može varirati od 1 do 4, dakle monomeri su u obliku 3, 4 ili 5 hidroksialkanoata (3-HA, 4-HA ili 5-HA) (Albuquerque i Malafia, 2018). Na Slici 1 prikazana je opća struktura polihidroksialkanoata. Monomeri se obzirom na duljinu bočnih lanaca mogu podijeliti u tri grupe: kratkolančani čiji se bočni lanac sastoji od 3- 5 atoma ugljika, srednjelančani koji u bočnom lancu sadrže 6 do 14 ugljikovih atoma te dugolančani s 15 ili više atoma ugljika u bočnom lancu (Zinn i sur., 2001). Fizikalna svojstva PHA polimera, a samim time i njihova konačna primjena ovisi o duljini bočnog lanca, pa su tako kratkolančani polimeri kristalini i kruti materijali, dok su srednjelančani meki, elastični pa čak i ljepljivi materijali. Mehanička svojstva biopolimera ovise o duljini lanca i molekulskoj masi. Molekulska masa-obično varira od  $0,2 \times 10^6$  do  $3 \times 10^6$  Da. Sama sinteza ovisi o vrsti mikroorganizma, uvjetima provođenja procesa i supstratu koji se koristi kao izvor ugljika.



Slika 1: Opća struktura polihidroksialkanoata (Ojumu i sur., 2004), gdje su u tablici 1 prikazani nazivi polimera hidroksialkanoata s različitim brojem atoma ugljika u glavnom monomernom lancu (n) i bočnom lancu označenim s (R).

Tablica 1. Nazivi polimera hidroksialkanoata s različitim brojem atoma ugljika u osnovnom monomernom lancu (n) i bočnom lancu označenim s (R).

N	R	Polihidroksialkanoat
1	vodik	Poli(3-hidroksipropionat)
1	Metil	Poli(3-hidroksibutirat)
1	Etil	Poli(3-hidroksivalerat)
1	Propil	Poli(3-hidroksiheksanoat)
1	Pentil	Poli(3-hidroksioktaonat)
1	Nonil	Poli(3-hidroksidodekanoat)
2	Vodik	Poli(4-hidroksibutirat)
3	Vodik	Poli(5-hidroksivalerat)

## 2.2. Svojstva PHA

Polihidroksialkanoati imaju termoplastična i mehanička svojstva (poput vlačne čvrstoće (40 MPa), Youngov modul (3,5 GPA)) slična poliesterima sintetskog podrijetla. Topivi su u kloroformu i drugim kloriranim ugljikovodicima, ali su netopivi u vodi. Netoksični su, što ih čini biokompatibilnim (Akinmulewo i Nwinyi, 2019).

### 2.2.1. Termalna svojstva

Polihidroksialkanoati su djelomično kristalinični polimeri, stoga se njihova termalna svojstva obično izražavaju kao temperatura staklenog prijelaza ( $T_g$ ) za amorfnu fazu i temperatura taljenja za kristaliničnu fazu ( $T_m$ ). (Grigore i sur., 2019). Pri temperaturama blizu  $T_m$ , polimer je potpuno amorfan i ljepljiv. Vrijednost temperature staklenog prijelaza pada povećanjem prosječne duljine bočne alkilne grupe zbog povećane mobilnosti polimernih lanaca (Wecker i sur., 2015). Struktura i termalna svojstva PHA mogu se prilagoditi korištenjem različitih supstrata tijekom proizvodnje iz različitih sirovina. Utjecaj supstrata na svojstva PHA bit će opisan u sljedećim poglavljima. (Sharma i sur., 2017).

### 2.2.2. Kristaliničnost

Povećanjem broja i vrste bočnih lanaca mijenja se sposobnost kristalizacije polimera. Tako su primjerice Rai i suradnici zamijetili da srednjelančani polimeri imaju manji stupanj kristaliničnosti u odnosu na kratkolančane (primjerice P(3HB) i P(3HB-co-3HV)) (Rai i sur., 2011). Prisutnost funkcionalnih grupa u ostalim srednjelančanim kopolimerima sprječavaju kristalizaciju. No, s druge strane, kratkolančani polimeri imaju relativno mali stupanj kristaliničnosti u odnosu na sintetske polimere. Homopolimeri P(3HB) su kruti i kruti te je



njihova primjena ograničena, stoga je potrebno razviti mikrobne bioprocese koji osiguravaju sintezu kopolimera P(3HB) i 3HV. Istraživanja su pokazala da kopolimeri P(3HB) i 3HV imaju bolja termalna i mehanička svojstva (Leong i sur., 2014). (Grigore i sur., 2019)

### 2.2.3. Biokompatibilnost

Struktura i sastav odnosno vrsta monomera određuje biokompatibilnost, a vezana je uz: svojstva površine kao što su oblik, površinska poroznost, električni naboj i hidrofilitnost. Za biokompatibilnost je zaslužna i činjenica da se neki monomeri uključeni u polimerni lanac prirodno pojavljuju u ljudskom tijelu. Primjerice, 3-hidroksibutirična kiselina je normalan metabolit koji se nalazi u krvi. Nakon provedenih istraživanja rezultati su pokazali da se polihidroksialkanoati mogu ugraditi u tkiva ljudskog organizma, ne uzrokujući negativan odgovor organizma. Zahvaljujući tome, upotreba P(4HB) je odobrena od FDA 2007. za primjenu u tkivnom inženjerstvu, farmaciji, nanotehnologiji te medicinskoj biotehnologiji (Grigore i sur., 2019).

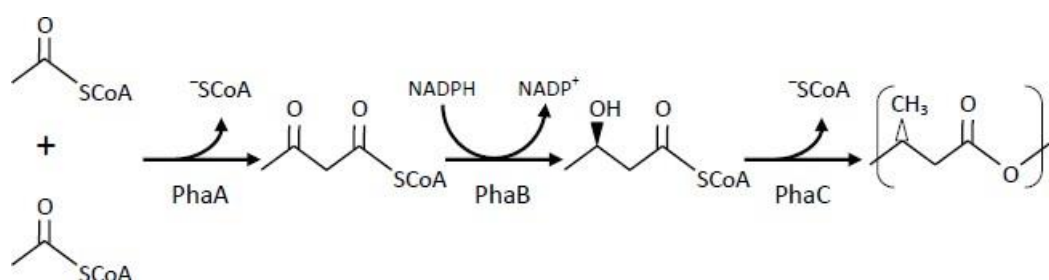
### 3. Metabolizam polihidroksialkanoata

#### 3.1. Sinteza monomera

Modelni organizam za istraživanje biosinteze PHA je Gram negativna bakterija iz roda *Betaproteobacteria*, *Ralstonia eutropha* H16. Kada se uzgaja na hranjivim podlogama bogatim ugljikom uz nedostatak drugih biogenih elementa *Ralstonia eutropha* H16 sintetizira i nakuplja visoke koncentracije polihidroksibutirata unutar stanica (>75% suhe tvari stanice). Sinteza polihidroksibutirata je katalizirana PHA sintazom koja može sintetizirati samo kratkolančane PHA. Polimerizacija je stereospecifična reakcija čiji su supstrati samo molekule (R)-3-hidroksiacil-CoA.

Prekursor PHB-a je (R)-3-hidroksibutiril-CoA (HB-CoA), koji se može sintetizirati iz centralnog metabolita acetil-CoA. Divlji tip soja *R. eutropha* H16 od šećera kao izvora ugljika koristi jedino fruktozu i *N*-acetilglukozamin. Fruktoza se katabolizira Entner-Duodoroffovim putem, gdje se piruvat prevodi u acetil-CoA i koristiti za proizvodnju energije u ciklusu limunske kiseline, a može koristiti i za proizvodnju PHB-a. Na slici 2 prikazana je sinteza PHB-a. PHB se sintetizira iz acetil-CoA u tri koraka:

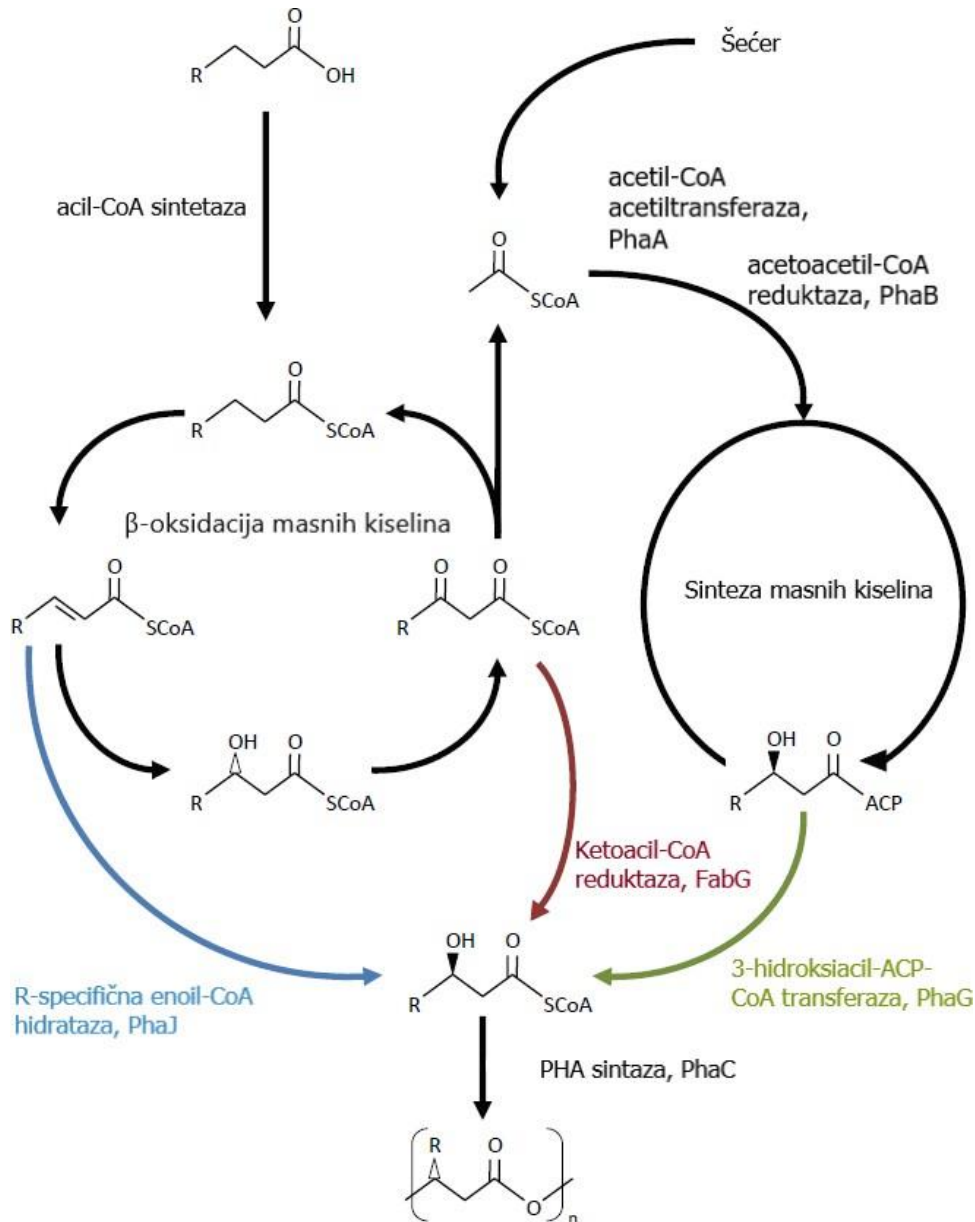
1. Kondenzacija dviju molekula acetil-CoA i formulacija acetoacetil-CoA. Reakcija je katalizirana enzimom acetil-CoA acetiltransferazom (PhaA);
2. redukcija acetoacetil-CoA u hidroksibutiril-CoA (HB-CoA). Reakciju katalizira enzim reduktaza (PhaB);
3. polimerizacija HB-CoA uz enzim PHA sintazu (PhaC ili tradicionalno  $\beta$ -ketotiolaza, korišteno u reverznoj reakciji).



Slika 2: Sinteza PHB-a iz acetil-CoA iz *R. eutropha* (Budde, 2010)

Geni koji kodiraju za enzime koji kataliziraju ove reakcije su organizirani u operonu (*phaC1-phaAphaB1*) (Peoples i Sinskey, 1989). Sinteza PHB ovisi o koncentraciji NADPH koji je elektron donor, budući da je PhaB NADPH ovisna reduktaza. Jedna molekula NADPH se generira Entner-Duodoroffovim putem, a druga se generira u ciklusu limunske kiseline u reakciji izocitrat dehidrogenaze (Wang i sur., 2003).

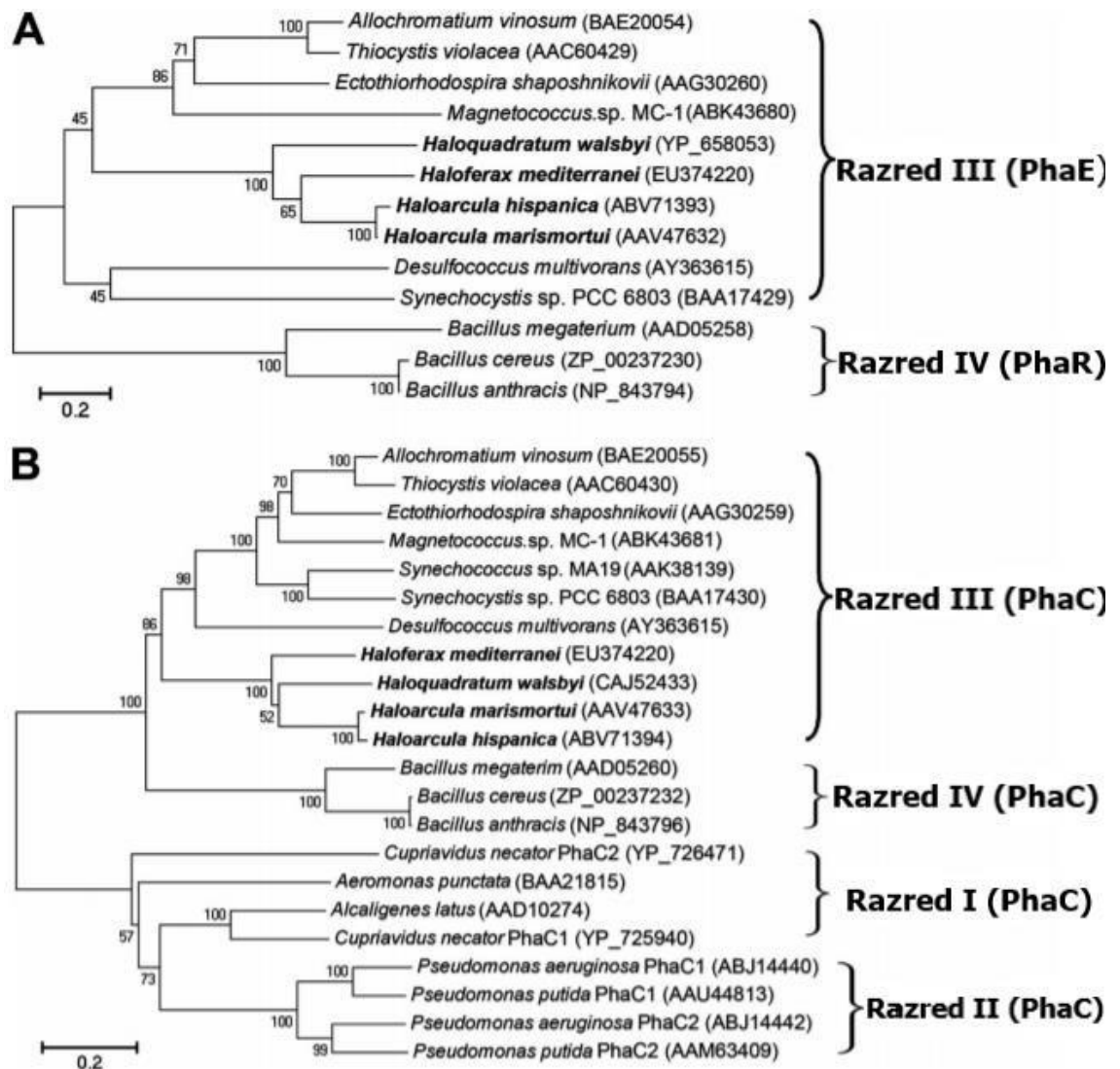
Istraživanja sinteze srednjelančanih PHA su provedena na bakterijama *Pseudomonas* i *Aeromonas*. Ove i ostale vrste koje imaju sposobnost akumulacije srednjelančanih PHA koriste enzim sintazu koja katalizira polimerizaciju srednjelančanih supstrata. Potencijalni metabolički putevi kojim se intermedijeri sinteze masnih kiselina mogu preusmjeriti u formiranje srednjelančanih 3-hidroksiacil-CoA molekule prikazani su na slici 3. Kako bi stvorile srednjelančane supstrate za PHA sintazu, ove vrste moraju posjedovati transferazu koja će prebaciti (R)-3-hidroksiacilnu grupu s ACP na CoA (PhaG), budući da u *de novo* sintezi masnih kiselina i njihovoj degradaciji jedan od intermedijera, (R)-3-hidroksiacil tioester je povezan na acil nosač protein (ACP) umjesto na CoA (Rehm i sur., 1998).  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina također osigurava prekursore za sintezu monomera. U procesu degradacije masnih kiselina, one se prvo aktiviraju ligacijom na CoA. Zatim se nizom reakcija razgrađuju na način da svaki krug  $\beta$ -oksidacije rezultira oslobađanjem 2 ugljika u obliku acetil- CoA. Na slici 3 prikazano jer preusmjeravanje intermedijera  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina u sintezu PHA. Jedan od intermedijera je (S) oblik 3-hidroksiacil-CoA koji se ne može polimerizirati. Predloženo je postojanje epimeraze, međutim ova enzimska reakcija nije istražena. Nadalje jedan od intermedijera je 3-ketoacil-CoA. Reakciju redukcije 3-ketoacil-CoA katalizira reduktaza FabG. Stoga je, zahvaljujući ekspresiji *fabG* gena u rekombinantnim sojevima došlo do povećane akumulacije srednjelančanih PHA (Nomura, 2005). Dokazano je da *Aeromonas caviae* nakuplja poli(3-hidroksibutirat-co-hidroksiheksanoat) kad se uzgaja na biljnom ulju ili masnim kiselinama (Doi i sur., 1995). Poslije je utvrđeno da bakterija ima gen koji kodira za (R)-specifičnu enoil-CoA hidratazu koja konvertira intermedijere  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina u supstrate za PHA sintazu. Odgovorni gen je *phaJ* i organiziran je u operonu s genima za PHA sintazu.



Slika 3: Intermedijeri β-oksidacije i sinteze masnih kiselina mogu se preusmjeriti u sintezu srednjelančanih PHA (Prilagođeno prema Budda, 2010)

### 3.2. PHA sintaze

PHA sintaze su enzimi koji konvertiraju topive monomere 3-hidroksiacil-CoA u netopive granule sastavljene od poliesteru velike molekulske mase. Geni koji kodiraju za ove sintaze su identificirani u brojnim vrstama bakterija (Rehm, 2003). PHA sintaze su podijeljene u 4 različita razreda, što je prikazano na Slici 4.



Slika 4: Filogenetska stabla 4 razreda PHA sintaza prokariota, uključujući bakterije i haloarheje (otisnuto masnim fontom). A: PhaE ili PhaR podjedinice; B: PhaC podjedinice. Konstruirano na temelju sekvenci aminokiselina svakog proteina. Korišten algoritam s MEGA softverom verzija 4.0. Mjerilo: 0,2 supstitucije po strani. (Prilagođeno prema Lu i sur., 2008.)

Za enzime iz razreda I i II aktivne sintaze su homodimeri koji se sastoje od jedne podjedinice (PhaC), a razlikuju se po supstratima. Sintaze iz razreda I proizvode samo jednolančane PHA, dok iz razreda II preferiraju supstrate za srednjelančane PHA. Međutim, postoje i sintaze koje kataliziraju reakciju sinteze jednolančanih i srednjelančanih kopolimera, kao što je PhaC iz *A. caviae*. Sintaze iz razreda III i IV zahtijevaju dvije podjedinice za punu aktivnost. Jedna od tih podjedinica je PhaC ista kao u razredima I i II, dok je druga (PhaE za razred III i PhaR za razred IV) potrebna za punu aktivnost, no njihove uloge su i dalje nerazjašnjene. Terminalna C skupina razreda I i II su jako hidrofobni i pretpostavlja se da

ova domena može reagirati s površinom hidrofobne granule PHA. PhaC podjedinice sintaza razreda III i IV nemaju C terminalni kraj, ali C terminalni krajevi iz podjedinica PhaE i PhaR mogu poslužiti istoj funkciji. Većina eksperimentalnih podataka prikupljenih u svrhu ispitivanja mehanizma PHA sintaze su iz eksperimenata provedenih koristeći PhaC iz bakterije *R. eutropha* i PhaEC bakterije *A. vinosum* izoliranog iz rekombinantne *E. coli* (Stubbe, 1994), (Muh i sur. 1998). Enimska aktivnost je mjerena diskontinuiranim testovima prateći oslobađanje CoA kad je enzim u kompleksu s hidroksibutiril-CoA. Ono što je značajno ubrzalo istraživanje je otkriće o mnogim sličnostima PHA sintaze s bakterijskim lipazama: obje pripadaju obitelji  $\alpha/\beta$  hidrolaza, sadrže dio tzv. „lipase box“ koji uključuje ključne katalitičke bočne ogranke aminokiselina (serin za lipaze, cistein za PHA sintaze) (Rehm, 2003). Simulacijom trodimenzionalnih modela sintaza i otkrićem sekvenci aminokiselina PHA sintaze omogućilo je podrobnija proučavanja uloge određenih katalitičkih bočnih ogranaka. Najbolje proučeni su cistein, histidin i aspartat u aktivnom mjestu enzima (C319, H508 i D480 u PhaC iz bakterije *R. eutropha*) (Stubbe i Tian, 2003). Mutacije u bilo kojem od ovih ostataka mogu prouzrokovati smanjenje aktivnosti enzima ispod 0,5% u divljem tipu enzima.

### 3.3. Formulacija PHA granula

Intracelularni PHA se nakuplja u obliku netopivih inkluzijskih tijela. Na površini granula nalaze se lipidi i proteini koji štite od međusobnog srastanja. Pretpostavlja se da se nalaze u obliku fosfolipidnog monosloja. Rezultati mjerenja korištenjem diferencijalne skenirajuće kalorimetrije je pokazala da su polimeri u granulama u amorfnom stanju *in vivo*, a kad se izoliraju iz kulture, brzo se kristaliziraju (Song i sur., 1998). Postoje dva modela koja predlažu formiranje granula *in vivo* (Stubbe i Tian, 2003):

1. Micelarni model: Sinteza PHA počinje u citoplazmi djelovanjem PHA-sintetaze, hidrofobi polimeri se agregiraju i formiraju početnu granulu. Ovaj model ne daje objašnjenje kako se lipidi povezuju s površinom granula.
2. Model pupanja: PHA sintaze su lokalizirane na unutrašnjoj strani citoplazme. Polimer se sintetizira u lipidnom dvosloju, gdje konačno formira malu granulu koja se na kraju procesa odvaja od membrane. Ovaj model objašnjava lipidni monosloj na površini.

Uz lipide, na površini PHA granula nalaze se još i mnogi proteini (Jendrossek, 2009). Pretpostavlja se da su svi enzimi potrebni za sintezu PHB iz acetyl-CoA povezani s PHA granulama u *R. eutropha* (Uchino i sur., 2007). Osim biosintetskih enzima, na površini

granula se također nalaze PHA depolimeraze, od kojih su neke čak prisutne i za vrijeme akumulacije.

Protein fazin PhaP stabilizira granule PHA i sprječava njihovo srastanje unutar stanica. Istraživanja Wieczoreka i suradnika dokazala su da delecija gena *phaP1* (najviše eksprimiran fazin) iz genoma bakterije *R. eutropha* rezultira formiranjem velikih granula u stanici, dok su rezultati ekspresije ovog gena bile brojne male granule (Wieczorek, 1995). Vjeruje se da PhaP ima još uloga u metabolizmu polihidroksialkanoata, npr. hidrofobni C terminalni kraj fazina ima ulogu domene za povezivanje granula i sudjeluje u lokalizaciji granula.

### 3.4. Depolimerizacija PHA

U prirodi postoje dva načina depolimerizacije PHA: intracelularno korištenje polimera kod organizama koji sintetiziraju PHA te ekstracelularno pri čemu se PHA depolimerizira nakon oslobodanja u okoliš iz liziranih stanica. Kako su intracelularne granule sačinjene od amorfnih polimera, intracelularne PHA depolimeraze koriste polimer u ovom obliku kao supstrat. Suprotno tomu, ekstracelularni PHA brzo kristalizira, pa ekstracelularne depolimeraze djeluju na semi-kristalnim polimerima. Katalitičke domene sadrže tzv. „lipase box“ sa specifičnom sekvencom u kojoj je bočni ogranak serina ključni katalitički dio, suprotno od PHA sintaza kod kojih je cistein ključan. Sekvence aminokiselina svih ekstracelularnih depolimeraza sadrže strogo očuvane regije bočnih ogranaka serina, aspartata i histidina. Reakcije katalizirane ovim enzimima su stereospecifične te enzimi ne pokazuju nikakvu aktivnost u kontaktu sa sintetskim (S)-PHA. Za većinu ekstracelularnih depolimeraza vjeruje se da imaju i egzohidrolitičku i endohidrolitičku aktivnost. Produkti depolimerizacije ovise o samom enzimu, jedni oslobađaju samo HA oligomere, dok drugi degradiraju polimere do pojedinih monomernih jedinica. Manje se zna o intracelularnoj depolimerizaciji PHA. Većina istraživanja provedena je s modelnim organizmom *R. eutropha*. Kako se monomeri oslobođeni iz PHB u *R. eutropha* metaboliziraju još je uvijek nepoznanica. Pretpostavlja se da se slobodni hidroksibutirat prevodi u HB-CoA pomoću HB-CoA ligaze koristeći ATP, što aktivira molekulu za daljnju degradaciju. HB-CoA bi se mogao dalje konvertirati u acetil-CoA oksidacijom i tiolizom. Predložen je još jedan mogući put, kojim se acetoacetyl-CoA prevodi u (S)-HB-CoA, potom u krotonil-CoA. Međutim, još nije razjašnjeno zašto se ovaj put, očito reverzni ciklus  $\beta$ -oksidacije koristi u mikroorganizmu. Također je provedeno istraživanje sinteze HB-CoA i acetyl-CoA s dodatkom  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  i slobodnim CoA. Dodatak  $\text{NAD}^+$  rezultirao je povećanom koncentracijom acetyl-CoA, dok nije bilo razlike s dodatkom  $\text{NADP}^+$ . Ovi rezultati

ukazuju na činjenicu da su drugačiji kofaktori korišteni u sintezi i degradaciji PHB (Uchino i sur., 2007).

### 3.5. Regulacija

Jedno od ključnih pitanja vezano uz metabolizam PHB je regulacija sinteze i degradacije polimera. Mjerenjem aktivnosti enzima u bakteriji *R. eutropha* pretpostavljeno je da su geni za biosintezu PHB konstitutivno eksprimirani. Pretpostavka je potvrđena kvantificiranjem razine transkripcije pomoću RT-PCR (Lawrence i sur., 2005). Ovo istraživanje također je pokazalo da je i gen *phaZ1* za depolimerazu konstitutivan, što znači da su enzimi za sintezu i degradaciju PHB prisutni istovremeno u stanici. Budući da se transkripcija i translacija enzima za sintezu i degradaciju PHB ne mijenja značajno pod različitim uvjetima uzgoja, znači da se regulacija provodi na drugoj razini. Istraživanja su pokazala da slobodni CoA inhibira reakciju kondenzacije kataliziranu s PhaA. U brzorastućim stanicama acetil-CoA ulazi u ciklus limunske kiseline, što rezultira u oslobađanju CoA i inhibira sintezu acetoacetyl-CoA. Limitacijom supstrata sprječava se rast stanica, inhibira se citrat sintaza, što sprječava ulazak acetyl-CoA u ciklus limunske kiseline, a omogućava akumulaciju PHB. Aktivnost citrat sintaze je regulirana koncentracijom nikotinamida u stanici. Kada je spriječen normalan rast stanica *R. eutropha* limitacijom dušika, dolazi do povećanja koncentracije nikotinamida u stanicama. NADH značajno inhibira citrat sintazu, dok NADPH koji je nužan za sintezu HB-CoA ima manji inhibitorni učinak (Lee i sur., 1995). Koncentracije NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> nemaju učinka na aktivnost citrat sintaze. Koncentracije oksidiranih koenzima u *R. eutropha* bile su više tokom normalnog rasta nego tokom limitacije dušika, tako da bi ovo moglo predstavljati još jedan oblik regulacije, međutim potrebno je provesti dalja istraživanja. Ekspresija fazina PhaP1 u bakteriji *R. eutropha* je strogo regulirana. Istraživanja su pokazala da je transkripcija gena *phaP1* uzrokovana akumulacijom PHB i da je koncentracija proteina PhaP1 proporcionalna količini uskladištenog PHB (Lawrence i sur., 2005). Otkriveno je da je transkripcija gena *phaP1* kontrolirana regulatornim proteinom PhaR, u odsutnosti PHA, konstitutivno eksprimirani PhaR se veže uzvodno od gena *phaP1* i sprječava transkripciju (Potter i sur., 2005.). Kako se PHA sintetizira i formira granule, PhaR se vežu na površinu granula i tako je omogućena transkripcija gena *phaP1*.

### 3.6. Mikroorganizmi producenti

Bakterije koje se koriste za proizvodnju PHA podijeljene su u dvije glavne grupe obzirom na uvjete potrebne za sintezu PHA (Khanna i Srivastava, 2005). Prva grupa zahtijeva limitaciju dušikom, fosforom, magnezijem ili sumporom za sintezu PHA u suvišku izvora ugljika. Ovoj



grupi pripadaju *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens* i *Protomonas oleovorans*. Druga grupa bakterija ne zahtijeva limitaciju nutrijenta za sintezu PHA koji se akumulira tijekom faze rasta. Ova grupa uključuje *Alcaligenes latus*, mutanta *Azotobacter vinelandii* i rekombinantni soj *E. coli*. Od 300 različitih vrsta bakterija koje mogu sintetizirati i nakupljati PHA samo se nekoliko koristi za industrijsku proizvodnju, uključujući *R. eutropha* koja biosintetizira PHB, *Pseudomonas oleovorans* i *Pseudomonas putida* koje proizvode srednjelančane PHA. Svi njihovi funkcionalni geni za proizvodnju PHA su uspješno klonirani u bakteriju *E. coli*. Ova bakterija izabrana je jer može koristiti jeftine izvore ugljika i jednostavniji su procesi ekstrakcije i pročišćavanja. Nadalje, kako nema intracelularnu PHA depolimerazu sintetizirani polimeri se ne razgrađuju direktno. Također se mogu koristiti mješovite mikrobne kulture: Mješovite mikrobne kulture uobičajeno se koriste u obradi voda. Aktivni mulj, dobro poznata mješovita mikrobna kultura ima sposobnost akumuliranja PHA kao rezervnog izvora energije pod stresnim uvjetima.

Tijekom biološke obrade otpadnih voda dolazi do promjena uvjeta, te se mikroorganizmi moraju prilagoditi novim uvjetima. Istraživanja su pokazala da promjene pozitivno utječu na fiziološke promjene mikrobnih stanica aktivnog mulja vezanih uz akumulaciju PHA.

Aktivni mulj može akumulirati količine PHA do oko 20% suhe tvari u anaerobnim uvjetima u usporedbi s čistom kulturom koja može dosegnuti više od 88% suhe tvari stanice (Salehizadeh i Loosdrecht, 2004).

#### 4. Proizvodnja PHA

Proizvodnja PHA ovisi o prirodi radnog mikroorganizma. Općenito, uvjeti uzgoja trebaju biti prilagođeni sintezi i nakupljanju izvora ugljika u obliku PHA u mikrobnim stanicama, te je potrebno zaustaviti katabolizam PHA u stanicama radnog mikroorganizma i korištenje PHA za razmnožavanje stanica. U prvoj fazi treba prilagoditi uvjete uzgoja rastu i razmnožavanju stanica kako bi se povećala koncentracija stanica, nakon čega slijedi fazi limitacije određenim nutrijentima kako bi se potakla proizvodnja i nakupljanje PHA. Ovakve uvjete moguće je ostvariti šaržnim uzgojem s pritokom supstrata i višestupanjskim kontinuiranim uzgojem.

##### 4.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata

Glavno obilježje vođenja šaržnog uzgoja s pritokom supstrata je dodavanje svježeg supstrata kada njegova koncentracija padne ispod kritične vrijednosti, bez uklanjanja iskorištene hranjive podloge. U slučaju proizvodnje PHA, i izvori dušika i ugljika mogu se dodavati u određenim intervalima koji ovise o brzini rasta stanica i potrošnji supstrata. Prihranom s izvorom dušika može se regulirati pH vrijednost. U tu svrhu dodaje se amonijak, koji omogućava održavanje razine dušika i pH vrijednosti konstantnim bez potrebe za stalnim korekcijama. Kako bi se inicirao prijelaz s faze rasta na fazu proizvodnje PHA, prihrana se provodi s hranjivom podlogom obogaćenom izvorom ugljika i manjkom izvora dušika. Proces se prati računanjem specifične brzine nastajanja proizvoda (Koller, 2018). Također je potrebno mjeriti koncentraciju supstrata, kako bi se prihrana dodala u pravom trenutku. U tu svrhu se može koristiti povremeno uzimanje uzoraka i *ex situ* analiza supstrata ili moderni online senzori koji omogućavaju *in situ* mjerenje koncentracije supstrata. U proizvodnji PHA takvi online sustavi se primjenjuju kod korištenja glukoze ili metanola kao supstrata. Također se provode mjerenja koncentracije otopljenog kisika u hranjivoj podlozi ili razine CO<sub>2</sub> u plinovima koji se ispuštaju iz bioreaktora. Manjak izvora ugljika rezultira povećanjem vrijednosti pO<sub>2</sub> zbog smanjene metaboličke aktivnosti i smanjene razine CO<sub>2</sub> u izlaznim plinovima (Ienczak i sur., 2013). U idealnom slučaju, šaržni uzgoj s pritokom supstrata se zaustavlja kada se koncentracija ugljika približi vrijednosti nule kako bi se izbjegli nepotrebni gubici supstrata, a prije početka intracelularne degradacije.

##### 4.2. Kontinuirani višestupanjski uzgoj

Kontinuirani postupak uzgoja obilježava održavanje ustaljenog stanja. Ustaljeno stanje održava se kontinuiranim pritokom graničnog supstrata usklađenog sa specifičnom brzinom rasta stanica, pri čemu se mikrobne stanice nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta. Istovremeno se iz bioreaktora uklanja ekvivalentan dio iskorištene hranjive podloge. Prva

faza uzgoja provodi se na glukozi i suvišku dušika s ciljem postizanja visoke koncentracije stanica, koju prati druga faza s limitacijom biogenih elemenata (osim ugljika), kako bi došlo do akumulacije PHA unutar stanica. Brzina rasta i akumulacije PHA ovisi o brzini razrijeđenja i specifičnoj brzini rasta stanica (Braunegg i sur., 1998).

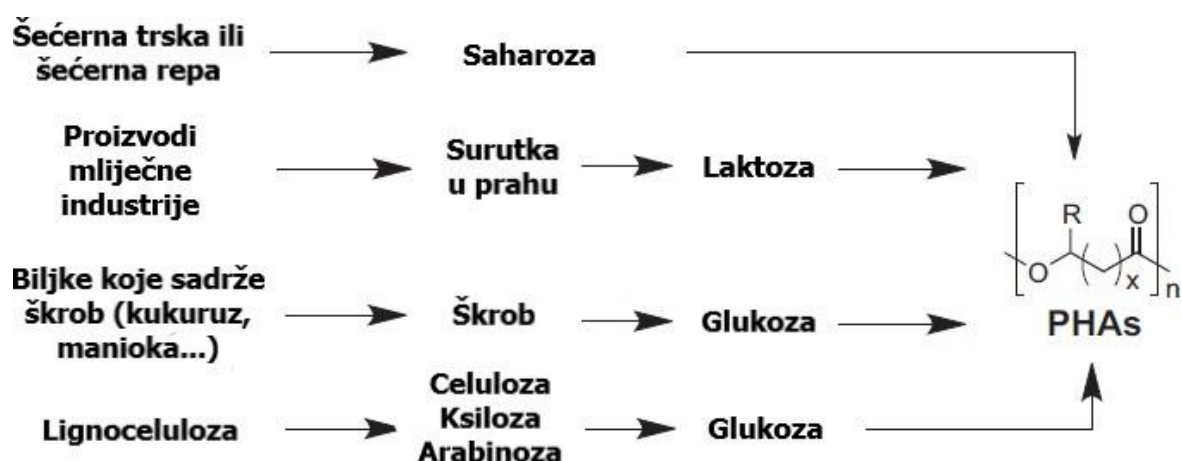
Tijekom proizvodnje srednjelančanih PHA kod *P. oleovorans* proveden je dvostupanjski kontinuirani uzgoj. U prvoj fazi brzina razrijeđenja je iznosila  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , a u drugoj  $0,16 \text{ h}^{-1}$  (Jung i sur., 2001). Ovaj tip proizvodnje sve se češće upotrebljava u proizvodnji PHA, budući da je ostvarena zadovoljavajuća stabilnost i povećana produktivnost proizvodnje PHA (Koller, 2018).

## 5. Supstrati za proizvodnju PHA

Supstrati za proizvodnju PHA mogu se klasificirati u tri razreda: jednostavni šećeri (ugljikohidrati, najviše monosaharidi), ugljikovodici i triacilgliceroli (Winnacker, 2019). Većina mikroorganizama koji proizvode PHA mogu koristiti monosaharide, dok ih najmanje koristi triacilglicerole. Nadalje, različite bakterije mogu proizvoditi različite polihidroksialkanoate iz istog supstrata. Primjerice, vrsta *Pseudomonas* koristi glukozu i druge jednostavne šećere za proizvodnju srednjelančanih PHA (npr. poli(3-hidroksiheksanoat)), dok bakterija *Ralstonia eutropha* sintetizira iz glukoze isključivo poli(3-hidroksibutirat). Konverzija različitih supstrata u PHA je rezultat selektivnosti enzima i njihove specifičnosti za supstrat.

### 5.1. PHA iz ugljikohidrata

Ugljikohidrati se dijele na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Polisaharidi su polimerni ugljikohidrati, primjerice škrob, celuloza i hemiceluloza. Hidrolizom ovih polimera dobiju se različiti monosaharidi i disaharidi koji se tijekom bioprocasa mogu konvertirati u PHA. Na slici 5 shematski su prikazani izvori ugljikohidrata za proizvodnju PHA.



Slika 5: Shematski prikaz izvora ugljikohidrata za bioprocac proizvodnje PHA (Prilagođeno prema Winnacker, 2019)

Mnogi bakterijski sojevi, na primjer *Azeobacter vinelandii* i *Alcaligenes latus*, mogu proizvoditi PHA iz saharoze, koja se dobije iz šećernih sirovina, kao što su šećerna trska i šećerna repa (Page, 1989).

Nusproizvod ekstrakcije i proizvodnje šećera je melasa. Melasa sadrži ugljikohidrate saharozu, glukozu, fruktozu, minerale željezo, magnezij, kalcij, kalij i vitamine potrebne za rast bakterijskih stanica, uključujući B7 (Raza i sur., 2018). Kada se koristi kao izvor ugljika, prinos PHA iznosi do 6.0 g/L (Santimano i sur. 2009). Koristeći propionsku kiselinu kao

prekursor tvrtka ICI je prva komercijalno proizvela PHA iz glukoze dobivene iz škroba pomoću bakterije *R. eutropha*.

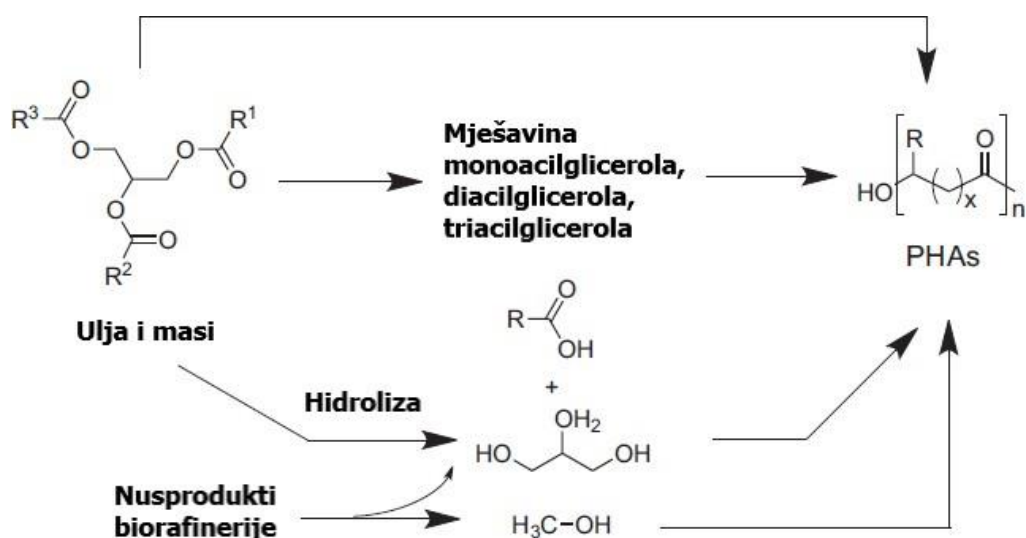
Laktozu, disaharid koji se sastoji iz galaktoze i glukoze, a nalazi se primjerice u surutki, mogu koristiti mnogi mikroorganizmi za proizvodnju PHA, npr. *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 ili rekombinantna *Escherichia coli* (Povolo i sur., 2013).

Pšenica se uzgaja diljem svijeta u velikim količinama. Mekinje su čvrsti vanjski sloj zrna pšenice koji se sastoji od perikarpa i aleurona. Sadrži proteine, ugljikohidrate i minerale te njihovo odlaganje predstavlja problem za okoliš. Bakterija *Halomonas boliviensis* proizvodi PHB na pšeničnim mekinjama kao izvoru ugljika. Prinos PHB iznosio je 1,08 g/L, a prinos biomase 3,19 g/L (Van-Thuoc i sur., 2008).

Tijekom uzgoja bakterije *Haloferax mediterranei*, ostvareni su prinosi do 140 g/L i akumulaciju PHA od 55,6% (w/w) kada se uzgoj provodio na hranjivim podlogama s dodatkom škroba iz kukuruza i riže (Huang i sur., 2006.)

## 5.2. PHA iz triacilglicerola

Triacilgliceroli, glavne komponente ulja i masti, su esteri tri masne kiseline i glicerola. Za uzgoj i proizvodnju PHA na hranjivoj podlozi s triacilglicerolom potrebne su bakterije s lipazama koje mogu katalizirati oslobađanje kiselina. Masne kiseline se tada transportiraju kroz membranu u stanice i transformiraju putem  $\beta$ -oksidacije u PHA monomere, te se zatim polimeriziraju. Na Slici 6 shematski je prikazana uporaba triacilglicerola kao supstrata za proizvodnju PHA.



Slika 6: Shematski prikaz uporabe triacilglicerola kao supstrata za proizvodnju PHA (Prilagođeno prema Winnacker, 2019)

Proizvodnja PHA iz triacilglicerola prvi puta je provedena na biljnom ulju pomoću bakterije *Aeromonas caviae*. Industrija brze hrane proizvodi velike količine otpadnog ulja koje treba prikladno odlagati. Kako mnogi sojevi bakterija proizvode PHA iz otpadnih ulja, ova sirovina se može iskoristiti za proizvodnju PHA. Naime, teoretski stupanj konverzije PHA iz ulja i masnih kiselina iznosi više od 0,65 g PHA/g izvora ugljika, dok je kod glukoze taj iznos 0,32-0,48 g PHA/g glukoze. Najuspješnija proizvodnja je bila pomoću bakterije *P. aeruginosa* 47T2, s prinosom PHA od 7,6 g/L i prinosom ramnolipida od 10 g/L (Haba i sur., 2007).

Istraživanja su provedena sa šest različitih sojeva i četiri izvora ugljika: otpadna ulja, dizel, ulje uljane repice i glukoza. Maksimalna akumulacija PHA od 53,2% (w/w) ostvarena je pomoću bakterije *P. aeruginosa* (KF270353) na otpadnim uljima, dok je na glukozu ostvareno 37,8%, a na ulju uljane repice 34,4% (Tufail i sur., 2017).

### 5.3. PHA iz ugljikovodika

Ovisno o supstratu, PHA se može proizvesti iz ugljikovodika koji sadrže alkilne grupe, od propilne do dodecilne. Nadalje, različiti aromatski ugljikovodici (npr. tereftalna kiselina iz PET-a) mogu se također koristiti kao supstrati za proizvodnju PHA pomoću različitih sojeva bakterije *Pseudomonas* (Ni i sur., 2010). Prednost korištenja ove bakterije pred drugim je njihova proizvodnja surfaktanata koji solubiliziraju i emulzificiraju ugljikovodike i tako olakšavaju njihov transport kroz staničnu stijenku. Budući da je produktivnost proizvodnje PHA iz ugljikovodika trenutno niska u usporedbi s drugim strategijama, potrebna su poboljšanja kako bi se uspostavila proizvodnja u većem mjerilu.

## 6. Primjeri proizvodnje PHA iz sekundarnih sirovina

Sekundarne sirovine koje se mogu koristiti za proizvodnju PHA su: otpadne vode, otpaci hrane, melase, otpadna biljna ulja, lignocelulozna biomasa, otpad iz različitih tvornica, uključujući postrojenja za proizvodnju biodizela, otpadna voda i mulj iz tvornica papira, otpaci kave i surutka.

### 6.1. PHARIO – Proizvodnja PHA iz aktivnog mulja tijekom biološke obrade otpadnih voda

Istraživanja su pokazala da mikrobna biomasa koja se koristi u biološkoj obradi otpadnih voda može akumulirati značajnu količinu PHA zadovoljavajuće kvalitete. U Nizozemskoj je pokrenut pilot projekt (PHARIO) tijekom kojeg je istražen potencijal aktivnog mulja za proizvodnju PHA (Mannina i sur., 2019). Anoksični uvjeti bioprocesa pogoduju proizvodnji PHA. Testiranja su provedena na 15 postrojenja te je mjerena udio PHA u mikrobnoj biomasi aktivnog mulja nakon procesa denitrifikacije. Na osnovu izmjerenih vrijednosti procijenjena je ukupna godišnja proizvodnja PHA iz istraženih postrojenja za obradu otpadnih voda u Nizozemskoj. Količina PHA koja bi se mogla proizvoditi iznosila bi 25 000 t PHA godišnje. Također je i određena vrsta kopolimera dobivena u biomasi aktivnog mulja nakon denitrifikacije te je istražen utjecaj promjene sastava otpadne vode na sastav proizvedenog PHA. Rezultati istraživanja su pokazali da je proizveden kopolimer poli-(3-hidroksibutirat-ko-3 hidroksivalerat, PHBV) i da sastav otpadne vode nije značajnije utjecao na promjenu udjela monomera i svojstva PHBV. Svojstva ovako proizvedenih kopolimera dodatno su istražena mjerenjem termostabilnosti i mehaničkih svojstava, te je provedena usporedba s PHA proizvedenima na kemijski definiranim podlogama. Nadalje, molekularna masa iznosila je 1500 kDa. Skladišteni na sobnoj temperaturi, PHA u osušenoj biomasi s oko 3% vlažnosti, bili su stabilni minimalno 3 godine. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da se mikrobna biomasa aktivnog mulja može koristiti za proizvodnju, ali je prethodno potrebno razmotriti te planirati:

- Udaljenost postrojenja za obradu otpadnih voda i postrojenja za izdvajanje PHA. Postrojenje za izdvajanje PHA trebalo bi biti projektirano u blizini postrojenja za obradu mulja.
- Također potrebno je aktivni mulj obraditi kako bi se inaktivirali štetni mikroorganizmi, te uklonile štetne tvari.

Vezano uz napisano proizvodi oblikovani od PHA iz biomase mikrobnog mulja ne mogu se koristiti u medicini ili prehrambenoj industriji. Za takvu primjenu u potrebno je provesti dodatne postupke pročišćavanja pri čemu se značajno podiže konačna cijena proizvoda.

## 6.2. WHEYPOL- Proizvodnja PHA iz sekundarnih sirovina mliječne industrije

Tijekom WHEYPOL projekta istražen je utjecaj hidroliziranog ili nehidroliziranog filtrata surutke kao izvora ugljika. Istraživanje je provedeno na više različitih vrsta gram-negativnih bakterija sa sposobnošću proizvodnje i nakupljanja PHA. Bakterija *Haloferox mediterranei* pokazala je brz rast biomase, visoku produktivnost i stabilnost tijekom dugotrajne kultivacije u različitim uvjetima. Također, proizvedeni kopolimeri 3HB i 3HV imali su bolja mehanička svojstva od homopolimera PHB proizvedenih na šećernim sirovinama.

*H. mediterranei* koristi više metaboličkih puteva za sintezu propionil-CoA, koji je prekursor 3HV (Han i sur., 2008). Kako bi se dobili valjani podaci za procjenu ekonomičnosti procesa, uzgoj je proveden u pilot postrojenju s bioreaktorom volumena 200 l. Troškovi uzgoja *H. mediterranei* na filtratu hidrolizata surutke iznosili su manje od 3 € po kg proizvedenog PHBHV. Na povoljnu cijenu proizvodnje PHA utjecali su sljedeći čimbenici:

- prirodno zaštićen proces u nesterilnim uvjetima, zbog visokog saliniteta hranjive podloge (oko 200 g/L NaCl).
- sirovina se smatra otpadom, tako da ne uzrokuje dodatne troškove.
- PHA granule se mogu izolirati iz biomase pogodnom metodom koja ne koristi organska otapala.
- ostaci stanica i hranjive podloge mogu se reciklirati i koristiti kao nutrijenti u hranjivoj podlozi tijekom sljedećeg uzgoja. Reciklacijom se izbjegavaju nepotrebni troškovi i smanjuju troškovi obrade otpadnih voda
- Tijekom WHEYPOL projekta korištena je enzimaska hidroliza za pripremu hranjive podloge budući da je samo jedan enzim koji djeluje pri blagim uvjetima temperature i pH vrijednosti potreban za potpunu razgradnju laktoze u monosaharide. (Koller i sur., 2016).

## 6.3. ANIMPOL- Proizvodnja PHA korištenjem otpada mesnoprerađivačke industrije

Tijekom ANIMPOL projekta, kao supstrat za uzgoj *C. necator* pod kontroliranim uvjetima temperature, pH vrijednosti i aeracije korišteni su esteri zasićenih masnih kiselina animalnog podrijetla.

Kao izvor dušika u hranjivu podlogu korištene su amonijeve soli. Maksimalna specifična brzina rasta iznosila je 0,17 l/h, što je na razini uzgoja provedenih na glukozi. Nakon 23 sata uzgoja koncentracija biomase bila je 7 g/L, a stupanj konverzije bio je 0,6 g biomase/g supstrata (za razliku od 0,48 kod uzgoja na glukozi) (Koller i Braunegg, 2015).



Povećanje prinosa biomase može se objasniti razmatranjem metabolizma ovih supstrata. Supstratima poput šećera ili glicerola prinos biomase je ograničen 2-keto-dezoksi-fosfoglukonatnim putem i/ili glikolizom, kojim se generira piruvat koji se oksidativnom dekarboksilacijom konvertira u acetyl-CoA. Za razliku od šećera, masne kiseline se konvertiraju u onoliko jedinica acetyl-CoA koliko je dug lanac masne kiseline direktno putem  $\beta$ -oksidacije, čime se ne gubi nijedan atom ugljika budući da nema oksidativne dekarboksilacije. Limitacija dušikom pokreće sintezu PHA. U procesu je nastalo oko 28.0 g/L PHA (0,8 g PHA/g biomase). Volumetrijska produktivnost iznosila je 0,94 g/L h. Analiza monomernog sastava pokazala je da se kopoliester sastojao uglavnom od 3HB monomera s manjim udjelom 3HV. Vjeruje se da je upravo 3HV odgovoran za smanjenje krutosti, kristaliničnosti i temperature taljenja materijala, te doprinosi boljim svojstvima i olakšanoj proizvodnji iz polimera ovakvih karakteristika. DSC analizom izmjerene su vrijednosti karakteristične za srednjelančane PHA, dok je razlika bila u stupnju kristaliničnosti. Cilj daljnjih istraživanja bio je postizanje većeg udjela 3HV monomera povećanjem udjela spojeva koji imaju neparan broj ugljikovih atoma. Naime, na kraju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina s neparnim brojem ugljikovih atoma dobije se molekula propionil-CoA. Kondenzacijom propionil-CoA i acetyl-CoA dobije se 3-hidroksivaleril-CoA koji je prekursor 3HV. Stoga su esteri nezasićenih masnih kiselina dobiveni transesterifikacijom lipida otpada mesoprerađivačke industrije reducirani su u odgovarajuće alkohole pomoću natrija. Posljedično se ovi alkoholi konvertiraju u odgovarajuće alkene katalitičkom reakcijom s aluminijskim oksidom, te se alkeni konačno podvrgavaju oksidativnoj ozonolizi, generirajući supstrate bogate karboksilnim kiselinama s velikim brojem ugljikovih atoma (C9-C17) koje se koriste za uzgoj bakterije *C. necator*. Korištenjem ovog supstrata proizvedeni su kopoliesteri s boljim svojstvima (Koller i sur., 2014). Prethodno opisan proces ponovljen je na glicerolu kao supstratu. Nakon 23 h uzgoja maksimalna specifična brzina rasta iznosila je 0,11 l/h, a produktivnost 0,16 g/g h. Nakon 30 h uzgoja stupanj konverzije supstrata u biomasu bio je 0,65 g PHA/g suhe tvari biomase i volumetrijska produktivnost za PHA od 0,98 g/L h. Stupanj konverzije glicerola u biomasu je bio nešto niži, 0,29 g/g, u odnosu na estere zasićenih masnih kiselina (Koller i Braunegg, 2015).

Tablica 2: Usporedba podataka o svojstvima PHA proizvedenih na različitim supstratima dobivenih DSC analizom; EZMK-estri zasićenih masnih kiselina,  $T_m$ -temperatura taljenja,  $T_g$ -temperatura staklenog prijelaza,  $P_i$ -indeks polidisperziteta,  $M$ -molarna masa (Koller i Braunegg, 2015, Koller i sur., 2014)

Mikroorg. Producent	Supstrat	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	Kristaliničnost (%)	P <sub>i</sub>	M (kDa)
<i>C. necator</i>	EZMK	169	4,6	30,8	1,5	204
<i>C. necator</i>	(C9-C17) karboksilne kiseline	159		22,5	1,6	
<i>C. necator</i>	Glicerol	173	5,6	71,2	1,28	296

Korištenjem matematičkih modela izračunata je optimalna koncentracija supstrata koja bi se trebala konstantno održavati tokom fermentacije i iznosila je 10-12 g/L (Špoljarić i sur., 2013).

U sklopu projekta ANIMPOL uzgajane su i bakterije *P. citronellolis* te *P. chlororaphis* na metilnim esterima zasićenih masnih kiselina s ciljem sinteze srednjelančanih PHA (Muhr i sur., 2013a, 2013b). Proizvedeni PHA pokazali su karakteristike visoko amorfni smola male kristaliničnosti.

Tablica 3: Usporedba (redom) specifične maksimalne brzine rasta mikroorganizma, volumetrijske produktivnosti i masenog udjela PHA u biomasi kod različitih vrsta bakterije roda *Pseudomonas* na MEMK-metilni esteri masnih kiselina (Muhr i sur., 2013a, 2013b)

Mikroorganizam producent	$\mu_{max}$ (1/h)	V <sub>p</sub> (g/(L h))	w (g/g)
<i>P. citronellolis</i> (1. paralela)	0,1	0,036	0,2
<i>P. citronellolis</i> (2. paralela)	0,08	0,05	0,27
<i>P. chlororaphis</i>	0,13	0,14	0,23

Tablica 4: Usporedba podataka o svojstvima PHA proizvedenih pomoću različitih vrsta bakterije roda *Pseudomonas* dobivenih termoanalizom; MEMK-metilni esteri masnih kiselina, T<sub>m</sub>-temperatura taljenja, T<sub>g</sub>-temperatura staklenog prijelaza, P<sub>i</sub>-indeks polidisperziteta, M- molarna masa (Muhr i sur., 2013a, 2013b)

Mikroorg. Producent	Supstrat	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	Kristaliničnost (%)	P <sub>i</sub>	M (kDa)
<i>P. citronellolis</i> (1. paralela)	MEMK	48,6	-46,9	12,3	1,9	35
<i>P. citronellolis</i> (2. paralela)	MEMK	53,6	-43,5	10,4	2,5	196
<i>P. chlororaphis</i>	MEMK	/	-47	/	1,93	38

Na kraju ANIMPOL projekta, Riedel i suradnici primijenili su animalne lipide iz nativnog industrijskog otpada bez prethodne konverzije u estere. Koristili su dva soja bakterije: *C. necator* DSM 428 i mutantni soj *C. necator* Re2058/Pcb113, koji je sadržavao gene za PHA sintazu kratkolančanih i srednjelančanih PHA iz bakterije *Rhodococcus aetherivorans*. Napravili su usporedbu kultivacija na animalnim lipidima i na loju i otpadnom ulju za prženje. Na lipidima divlji tip *C. necator* DSM 428 sintetizirao je PHB homopoliestere u visokom masenom udjelu (0,79-0,82 g PHB/g suhe tvari). Na loju koncentracija PHB iznosila je 24 g/L, a volumetrijska produktivnost iznosila je 0,3 g/(L h). Ovisno o otpadu koji se koristio kao supstrat, koristeći rekombinantni mikroorganizam moglo se dobiti od 0,49-0,72 g PHA/g suhe tvari stanica. Molarni udio 3HHx u kopolijesteru 3HB i 3HHx iznosio je 0,16-0,27 mol/mol. Zatim je uzgoj rekombinantnog soja proveden u laboratorijskom bioreaktoru u kontroliranim uvjetima koristeći animalne lipide lošije kvalitete. Molarni udio 3HHx u kopolimeru 3HB i 3HHx je iznosio 0,19 mol/mol. S prinosom od 0,6 do 0,7 g PHA/g lipida (triacilglicerida), teoretski bi se godišnje od dostupnih  $5 \times 10^5$  tona animalnih lipida iz otpada prerađivačke industrije u Europi moglo proizvesti oko  $3 \times 10^5$  tona PHA (Riedel i sur., 2015). Narodoslowsky i suradnici proučavali su faktore kojim ANIMPOL proces utječe na okoliš. Učinak je izražen indeksom održivosti (SPI). Zaključili su da biotehnoška proizvodnja PHA kao i drugih biopolimera ne pokazuje značajno veće pokazatelje održivosti od proizvodnje iz fosilnih izvora. Međutim, naglasili su da biotehnoška proizvodnja PHA može postati ekološki superiorna, ako se optimiziraju svi koraci procesa, a to su selekcija i predobrada sirovina, bioinženjerstvo, downstream procesi (Narodoslowsky i sur., 2015). Tek su nedavno Shahzad i suradnici napravili sveobuhvatnu ekonomsku analizu koncepta ANIMPOL biorafinerije za slučaj korištenja estera zasićenih masnih kiselina (biodizel loše kvalitete) kao glavnog supstrata i hidroliziranih iznutrica kao kompleksnog izvora dušika. Troškovi proizvodnje PHA variraju između 1,41 €/kg i 1,64 €/kg (Shahzad i sur., 2013).

## 7. Izolacija i pročišćavanje polihidroksiakanoata

Održivost procesa proizvodnje polihidroksialkanoata značajno ovisi o odabiru procesa tijekom izolacije i pročišćavanja i redosljedu operacija nakon bioprocesa u bioreaktoru. Stoga se tijekom izolacije i pročišćavanja PHA koriste različite fizikalno-kemijske i biološke metode. Općenito ove metode se mogu podijeliti u pet koraka, prema redosljedu postupaka koji se provode nakon procesa u bioreaktoru: 1) izdvajanje bakterijske biomase iz iskorištene hranjive podloge; 2) sušenje biomase i uklanjanje vode; 3) predtretman koji uključuje razbijanje stanične stijenke i pripremu za ekstrakciju PHA; 4) ekstrakcija, precipitacija i izdvajanje granula PHA te 5) njihovo pročišćavanje i sušenje.

### 7.1. Izdvajanje biomase iz iskorištene hranjive podloge

Nakon bioprocesa u bioreaktoru provodi se centrifugiranjem i filtracijom. Ovaj korak je nužan kako bi se uklonila voda (koncentrirala bakterijska biomasa) i pripremila za sušenje. Flotacija stanica se također može koristiti kao alternativa filtraciji ili centrifugiranju kao i bioflokulacija. Bioflokulacija označava sposobnost određenih mikroorganizama da se agregiraju, formirajući tako kompaktne flokule stanica, što olakšava izolaciju. Delecija *etf* operona koji kodira za dvije podjedinice elektron transportnog flavoproteina u lancu elektronskog transporta u bakteriji *Halomonas campaniensis* LS21 rezultira samo-flokulacijom. Većina stanica se brzo flokulira i istaloži na dnu bioreaktora 1 minutu nakon prestanka aeracije i miješanja. Preostala podloga može se iskoristiti u sljedećem uzgoju bez potrebe za sterilizacijom i bez stvaranja dodatnog otpada. (Ling i sur., 2019).

### 7.2. Sušenje biomase i priprema za ekstrakciju PHA

Provodi se korištenjem topline, a također su istraženi postupci liofilizacije. Kako je PHA intracelularni polimer potrebno je razbiti (ukloniti) staničnu stijenku i osloboditi granule PHA. S ciljem oslobađanja granula koristi se mljevenje, te kemijske i biološke metode koje će biti opisane u nastavku poglavlja, također se koristi i kombinacija metoda kako bi se osigurala bolja efikasnost uz manji utrošak energije. Sljedeći korak je otapanje granula PHA u organskim otapalima i precipitacija dodatkom alkohola. Ovako pročišćeni PHA dodatno se pročišćava uklanjanjem preostalih nečistoća, te se suši (Mannina i sur., 2019).

Sušenje i predtretman biomase prije ekstrakcije PHA provodi se s ciljem uklanjanja vode i smanjenja čvrstoće stanične stijenke. Istraživanja liofilizacije biomase pokazala su dobre rezultate uz značajan utrošak energije stoga su provedena i istraživanja korištenjem NaClO, te su postignuti dobri rezultati, ali uz značajno smanjenje molekulske mase polimera. Budući da je sam proces egzoterman, kada se provodi u velikom mjerilu proces mora biti strogo

kontroliran. Prednost je visok stupanj pročišćavanja, ušteda vremena i energije budući da se stanice ne moraju sušiti prije procesa. Nedostatak digestije s NaClO je uklanjanje dijela PHA i smanjenje prinosa. Dodatkom NaCl u iskorištenu hranjivu podlogu dolazi do promjene osmotskog tlaka unutar stanica i slabljenja stanične membrane i dehidracije stanica-Lužine uzrokuju saponifikaciju lipida stanične stijenke mikroorganizma, dok kiseline razaraju peptidoglikane. Rezultat je povećana permeabilnost membrane, što olakšava oslobađanje PHA, proteina i drugih staničnih sastojaka (Yu i Chen, 2006)

Djelovanjem surfaktanata dolazi do razaranja stanične membrane i oslobađanje PHA granula iz bakterijskih stanica. Naime, surfaktanti se ugrađuju u dvoslojnu lipidnu membranu povećavajući volumen stanične ovojnice uzrokujući konačno razaranje stanica. Rezultat je oslobađanje granula PHA u otopinu sa ostacima stanica. Surfaktanti također mogu otopiti i denaturirati proteine i druge stanične sadržaje. Najčešće se koriste natrijev dodecil sulfat (SDS) i Triton X-100. Često se s njima kombiniraju male količine kompleksirajućih agenasa, s ciljem poboljšanja izolacije i povećanja stupnja pročišćavanja. Glavni nedostatak korištenja surfaktanata je velika količina koja je potrebna za uspješnu ekstrakciju, što ju čini skupom metodom te zahtijeva zbrinjavanje otpada (Mannina i sur., 2019)

Enzimski predtretman bakterijskih stanica tijekom izdvajanja PHA sastoji se od tri koraka: denaturacija staničnih komponenti povišenjem temperature i inicijacija stanične lize, enzimsko razaranje te otapanje ostataka biomase surfaktantima. Prednosti uporabe enzima su dobar prinos, visok stupanj pročišćavanja i očuvana kvaliteta PHA zbog visoke specifičnosti enzima. Međutim, proces je skup zbog visoke cijene enzima i kompleksnosti procesa ekstrakcije (Kapritchkoff i sur., 2006).

Najčešće korištene metode su mehaničko razbijanje stanica u kugličnom mlinu i homogenizacija pod visokim tlakom. Općenito, mehaničko razaranje se preferira jer ima mali učinak na produkt i okoliš obzirom na to da ne uključuje uporabu kemikalija. Nedostaci metode su dugo trajanje, visoki troškovi i prijenos u veće mjerilo. Budući da se u procesu generira toplina, treba osigurati hlađenje. Najčešće se koristi u kombinacijama s drugim metodama uz korištenje organskih otapala ili surfaktanata (Kunasundari and Sudesh, 2011).

Nakon razbijanja stanica oslobađa se velika količina DNA te se povećava viskoznost. Za smanjenje viskoznosti može se koristiti ili tretman toplinom ili tretman nukleazama. Ekspresijom gena za nukleazu iz bakterije *Staphylococcus aureus* u stanicama *C. necator* DSM 545 značajno se umanjila viskoznost lizata kulture bez učinka na proizvodnju PHA (Rodriguez i sur., 2018).

Fizikalne metode predtretmana također uključuju i korištenje topline i ultrazvuka, te je istražen utjecaj promjene temperature, snage ultrazvuka i vremena zadržavanja na efikasnost i svojstva PHA nakon predtretmana. Povećanjem temperature dolazi do denaturacije proteina i slabljenja stanične stijenke. Djelovanjem ultrazvuka dolazi do implozije mikromjehura zbog razlika u gradijentu tlaka unutar mjehura i njegovoj okolini, pri imploziji se oslobađa značajna količina energije koja narušava strukturu staničnih stijenki stanica i pogoduje oslobađanju polimera iz citosola. Prednost ultrazvuka je u smanjenju broja koraka (nije potrebno provesti sušenje biomase), te je moguće provesti istovremeno i ekstrakciju iz iskorištene hranjive podloge. Ipak za odabir metode predtretmana potrebno je razmotriti i usporediti utrošak energije tijekom predtretmana te ga usporediti s učincima predtretmana na biomasu (kako na učinak vezan uz uspješnu pripremu biomase za ekstrakciju, tako i za povećanje energetske učinkovitosti i manji utrošak energije). Redukcija broja koraka predtretmana je jedna od strategija pri kojoj se pokušava predtretman provesti bez sušenja i liofilizacije odnosno predtretman se provodi na mokroj biomasi (uklanjanje vode i sušenje biomase je skup i energetski zahtjevan proces). Na odabir metode predtretmana utječe više čimbenika: svojstva biomase, svojstva iskorištene hranjive podloge, buduća primjena PHA; stoga je potrebno svaki proces proizvodnje PHA zasebno promotriti kako bi se odabrale najbolje metode i zadovoljili kriterij ekonomske, ekološke i tehnološke održivosti (Koller i sur., 2013).

### 7.3. Ekstrakcija PHA

PHA su netopivi u vodi, ali topivi u nekim organskim otapalima: kloroformu, 1,2-diklormetanu i metil kloridu propilenu i etilenu. Također topiv je i u azeotropnim mješavinama kao što je trikloretan i voda ili kloroform s etanolom, metanolom, heksanom ili acetonom. Otapala djeluju u dva koraka: prvo modificiraju permeabilnost stanične membrane otapajući lipide te zatim otapaju i ekstrahiraju granule PHA. Nakon ekstrakcije, otopljeni biopolimer se uparava ili taloži dodatkom „protuotapala“, obično niskomolekulskog alkohola (metanol ili etanol) ili vode. Istaloženi biopolimer se zatim separira centrifugiranjem ili filtracijom (Raza i sur., 2018) Taloženje se može potaknuti i promjenom temperature ili pH vrijednosti. Prednosti ove metode u odnosu na ostale su visok stupanj pročišćavanja i neznatan utjecaj na svojstva PHA. Također, na ovaj način mogu se ukloniti različiti endotoksini, što omogućava primjenu biopolimera u medicinske svrhe. Međutim, takav postupak nije ekološki prihvatljiv, a velike količine otapala i energije koje se moraju uložiti za uspješno provođenje procesa čine ga

skupim. Zbog toga je sve češća uporaba dimetil karbonata (DCM) koji je zbog mogućnosti recikliranja ekološki prihvatljiviji (Braunegg, 2002)

Također je istražena metoda ekstrakcije PHA u superkritičnom CO<sub>2</sub>. Nakon ekstrakcije CO<sub>2</sub> u potpunosti isparava, čime se izbjegava sušenje proizvoda. Tijekom ekstrakcije superkritični CO<sub>2</sub> uspješno otapa lipide i druge hidrofobne komponente bakterijskih stanica, a PHA ostaje nepromijenjen u čvrstom stanju. Ekstrakcija s superkritičnim CO<sub>2</sub> također se može koristiti za razaranje stanica i uklanjanje lipidnih nečistoća prije ekstrakcije otapalima (Raza i sur., 2018).

## 8. Mogućnosti proizvodnje PHA u Republici Hrvatskoj

Republika Hrvatska ima značajan potencijal u proizvodnji biokemikalija i biogoriva iz sekundarnih sirovina. U nastavku poglavlja dani su podaci vezani uz godišnje količine sekundarnih sirovine koje se nakupljaju u Republici Hrvatskoj kao otpad iz: biološke obrade otpadnih voda, mliječne i mesnoprerađivačke industrije. Ove sirovine imaju dobar potencijal za proizvodnju polihidroksialkanoata prema procesima opisanim u ovom radu (poglavlje 6). Također u nastavku poglavlja izračunati su potencijalni prinosi polihidroksialkanoata koji bi se mogli proizvesti iz ovih sirovina tijekom jedne godine, a izračunati su korištenjem podataka iz ovog rada i podataka Državnog ureda za statistiku (Tablica 5).

### Proizvodnja PHA iz aktivnog mulja tijekom biološke obrade otpadnih voda

- Hrvatska godišnje proizvede 21 366 tona suhe tvari mulja
- Polovica otpada na organske tvari, a 25% toga otprilike čine lipidi (Đurđević i sur., 2015)
- Dakle, masa otpadnih lipida iznosi 2670,75 tona
- Obzirom na stupanj konverzije supstrata u proizvod ( $Y_{P/S}$ ) koji iznosi 0,8, moguće je proizvesti 2136,6 tona PHA iz suhe tvari mulja pomoću mješovite mikrobne kulture.

### Proizvodnja PHA iz sekundarnih sirovina mliječne industrije

- 2019. godine je Hrvatska proizvela 43 800 tona surutke (Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske)
- 30% od toga završi kao otpad, što za Hrvatsku iznosi 13 140 tona
- Laktoza, koja je supstrat za dobivanje polihidroksialkanoata čini 70% mase otpadne surutke (Koller i Braunegg, 2018), dakle 9198 tona
- Korištenjem bakterije *Hydrogenophaga pseudoflava* stupanj konverzije supstrata u proizvod iznosi 0,2 g PHA/g laktoze (Koller i sur., 2007)
- Prema tome, iz surutke kao sekundarne sirovine u Republici Hrvatskoj godišnje se može proizvesti 1839,6 tona PHA.

### Proizvodnja PHA korištenjem otpada mesnoprerađivačke industrije

- Hrvatska godišnje generira 125 000 tona otpada iz mesnoprerađivačke industrije (Krička i sur., 2014)
- Uzevši u obzir da je prosječan udio lipida u otpadu 5,65% (Alao i sur., 2017), u Hrvatskoj se godišnje generira 7062,5 tona otpadnih lipida



- Stupanj konverzije supstrata u proizvod prosječno iznosi 0,65 g PHA/g lipida ako se koristi mutantni soj bakterije *C. necator* Re2058/Pcb113
- Stoga bi godišnja proizvodnja PHA iz otpada mesnoprerađivačke industrije mogla iznositi 4590,625 tona.

Tablica 5: Usporedba potencijalne proizvodnje PHA u RH

Mikroorganizam	Sirovina/supstrat	$Y_{P/S}$ (g/g)	$m_{\text{godišnje}}$ (t)
<i>C. necator</i>	Otpad mesnoprerađivačke industrije/lipidi	0,6	4237,5
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	Surutka/laktoza	0,2	1839,6
Mješovita mikrobna kultura	Otpadne vode/lipidi	0,8	2136,6

## 9. Zaključak

Na temelju do sada prikazanih podataka i spoznaja vezanih uz proizvodnju polihidroksialkanoata iz sekundarnih sirovina, proces proizvodnje polihidroksialkanoata iz otpada mesnoprerađivačke industrije pomoću mutantnog soja bakterije *C. necator* bio bi najodrživiji za Republiku Hrvatsku. Čimbenici koji su utjecali na ovakav odabir vezani su uz sljedeće:

- Može se ostvariti visoki stupanj konverzije supstrata u proizvod
- Proces se provodi bez dodatnih predtretmana sirovine što značajno umanjuje cijenu proizvodnje u industrijskom mjerilu
- Ukupna količina supstrata koja se može prevesti u PHA veća je u ostacima iz mesnoprerađivačke industrije u usporedbi s sirutkom (5,65% otpada mesnoprerađivačke industrije; 4,2% surutke)
- U usporedbi s korištenjem otpadnih voda i mješovite mikrobne kulture za proizvodnju PHA, prednost korištenja otpada mesnoprerađivačke industrije obuhvaća povoljnije downstream procesi i veću čistoću PHA, što stvara i više mogućnosti za širu primjenu proizvedenih PHA.

## 10. Popis literature

1. Acuña J., Bielecka A., Häussler S., Schobert M., Jahn M., Wittmann C., Jahn D., Poblete-Castro I. (2014) Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microb. Cell Factories*. 13, 88.
2. Akaraonye E., Keshavarz T., and Roy I. (2010) Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85,no. 6, p. 732–743.
3. Akinmulewo A.B. and Nwinyi O.C. (2019) Polyhydroxyalkanoate: a biodegradable polymer (a mini review). *J. Phys.: Conf. Ser.* 1378 042007
4. Alao B.O., Falowo A.B., Chulayo A., Muchenje V. (2017) The Potential of Animal By-Products in Food Systems: Production, Prospects and Challenges. *Sustainability*, 9, 1089
5. Albuquerque P.B.S., and Malafaia C.B. (2018) Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, no. PartA, p. 615–625.
6. Braunegg G. (2002) Sustainable Poly(Hydroxyalkanoate) (PHA) Production, in Degradable Polymers. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 235–293.
7. Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.F. (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J Biotechnol.*;65(2-3):127-161.
8. Budde C.F. (2010) Production of Polyhydroxyalkanoate Copolymers from Plant Oil, 31-33.
9. Doi Y., Kitamura S., and Abe H. (1995) Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* 28:4822-4828.
10. DZS (2015) – Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, < <https://www.dzs.hr/>>, Pristupljeno 21.08.2020.
11. Đurđević D., Blečić P., Jurić Ž. (2019) Energy Recovery from Sewage Sludge: The Case Study of Croatia. *Energies*, 12, 1927.
12. Grigore M.E., Grigorescu R.M., Iancu L., Ion R.M., Zaharia C., and Andrei E.R. (2019) Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30:9, 695-712
13. Haba E., Vidal Mas J., Bassas M., Espuny M.J., Llorens J., Manresa A. (2007) Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2

- (NCBIM 40044): effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. *Biochem. Eng. J.* 35, 99–106
14. Huang T.Y., Duan K.J., Huang S.Y., Chen C.W. (2006) Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33,701–706.
  15. Ienczak J.L., Schmidell W., de Aragão G.M.F. (2013) High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: A review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 275–286
  16. Jendrossek D. (2009) Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *J. Bacteriol.* 191:3195-3202.
  17. Jung K., Hazenberg W., Prieto M., Witholt B. (2001) Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnology & Bioengineering*; 72(1):19-24.
  18. Kapritchkoff F.M., Viotti A.P., Alli R.C.P., Zuccolo M., Pradella J.G.C., Maiorano A.E., Miranda E.A., and Bonomi A. (2006) Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, v. 122, no. 4, p. 453–462.
  19. Khanna S., Srivastava A. K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*; 40(2):607-619.
  20. Koller M. (2018) A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation*: 4, 30.
  21. Koller M., Braunegg G. (2015) Biomediated production of structurally diverse poly(hydroxyalkanoates) from surplus streams of the animal processing industry. *Polimery*;60:298-308
  22. Koller M., Hesse P., Bona R., Kutschera C., Atlíć A., Braunegg G. (2007) Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromol Biosci.*;7(2):218-226.
  23. Koller M., Puppi D., Chiellini F., Braunegg G. (2016) Comparing chemical and enzymatic Hydrolysis of whey lactose to generate feedstocks for haloarchaeal poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biosynthesis. *Int J Pharm Sci Res*; 3(1).
  24. Koller M., Salerno A., Strohmeier K., Schober S., Mittelbach M., Illieva V., Chiellini E., Braunegg G. (2014) Novel precursors for production of 3-hydroxyvalerate-containing poly[(R)-hydroxyalkanoate]s. *BiocatBiotrans.*; 32: 161-167.

25. Krička T., Toth I., Kalambura S., and Jovičić N. (2014) Efficiency of Alkaline Hydrolysis Method in Environment Protection. *Collegium antropologicum*, 38 (2), 487-492.
26. Kunasundari B. and Sudesh K. (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, v. 5, no. 7, p. 620–634.
27. Lawrence, A., J. Schoenheit, A. He, J. Tian, P. Liu, J. Stubbe, and A. Sinskey (2005) Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:663-672.
28. Lee I. Y., Kim M.K., Chang H.N., and Park Y..H. (1995) Regulation of poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:35-39
29. Leong Y. K., Show P. L., Ooi C. W., et al (2014) Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant *E. coli*. *J Biotechnol.*;180: 52-65.
30. Li P., Chakraborty S., and Stubbe J. (2009) Detection of Covalent and Noncovalent Intermediates in the Polymerization Reaction Catalyzed by a C149S Class III Polyhydroxybutyrate Synthase. *Biochemistry* 48:9202-9211.
31. Ling C., Qiao G.Q., Shuai B.W., Song K.N., Yao W.X., Jiang X.R., Chen G.Q. (2019) Engineering self-flocculating *Halomonas campaniensis* for wastewaterless open and continuous fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 805–815.
32. Lu Q., Han J., Zhou L., Zhou J., Xiang H. (2008) Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *J Bacteriol.*;190(12):4173-4180.
33. Mannina G., Presti D., Montiel-Jarillo G., Carrera J., Suárez-Ojeda M.E., (2019) Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*
34. Muh U., Sinskey A.J., Kirby D.P., Lane W.S., and Stubbe J. (1998) PHA Synthase from *Chromatium vinosum*: Cysteine 149 Is Involved in Covalent Catalysis. *Biochemistry* 38:826-837.
35. Muhr A., Rechberger E.M., Salerno A., Reiterer A., Malli K., Strohmeier K., Schober S., Mittelbach M., Koller M. (2013) Novel description of mcl- PHA biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from animal-derived waste. *J Biotechnol.*; 165: 45-51.
36. Muhr A., Rechberger E.M., Salerno A., Reiterer A., Schiller M., Kwiecien M., Adamus G., Kowalczyk M., Strohmeier K., Schober S., Mittelbach M., Koller M. (2013)

- Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated by *Ps. citronellolis*. *React Funct Polym.*; 73: 1391-1398.
37. Narodoslawsky M., Shahzad K., Kollmann R., Schnitzer H. (2015) LCA of PHA production—identifying the ecological potential of bio-plastic. *Chem Biochem Eng Q.*; 29: 299-305.
  38. Ni Y.-Y., Kim D.Y., Chung M.G., Lee S.H., Park H.-Y., Rhee Y-H (2010) Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16, *Bioresour. Technol.* 101, 8485.
  39. Nomura C.T., Taguchi K., Gan Z., Kuwabara K., Tanaka T., Takase K., Doi Y. (2005) Expression of 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase (fabG) Genes Enhances Production of Polyhydroxyalkanoate Copolymer from Glucose in Recombinant *Escherichia coli* JM109. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4297-43.
  40. Ojumu T., Yu J., Solomon B. (2004) Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 18–24.
  41. Page W.J. (1989) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31,329.
  42. Peoples O.P., and Sinskey A.J. (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J. Biol. Chem.* 264:15298-15303.
  43. Peoples O.P., and Sinskey A.J. (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 264:15293-15297.
  44. Potter M., Muller H., and Steinbuchel A. (2005) Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 151:825-833.
  45. Povolò S., Romanelli M.G., Basaglia M., Ilieva V.I., Corti A., Morelli A., Chiellini E., Casella S. (2013) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM1034 from structurally unrelated carbon sources. *New Biotechnol.*, 30,629.
  46. Rai R., Keshavarz T., Roether J., et al. (2011) Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater Sci Eng R Rep.*;72: 29–47.
  47. Raza Z.A., Abida S., and Banatb I.M. (2018) Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* 126, 45–56

48. Rehm B. H. A. (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* 376:15-33.
49. Rehm B. H. A., Kruger N., and Steinbuchel A. (1998) A New Metabolic Link between Fatty Acid de novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 273:24044-24051.
50. Riedel S.L., Jahns S., Koenig S., Bock M.C., Brigham C.J., Bader J., Stahl U. (2015) Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *J Biotechnol.*; 214: 119-127.
51. Rodríguez J.G.E., Lorenzo F., Valentino P., Giovanna L., Marina B., Sergio C. (2018) Nuclease expression in efficient polyhydroxyalkanoates-producing bacteria could yield cost reduction during downstream processing. *Bioresour. Technol.* 261, 176–181.
52. Salehizadeh H., Loosdrecht MCMV. (2004) Production of polyhydroxyalkanolates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22:261-279
53. Santimano M.C., Prabhu N.N., Garg S. (2009) PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus sp.* strain COL1/A6. *Res. J. Microbiol.* 4, 89–96.
54. Shahzad K., Kettl K.H., Titz M., Koller M., Schnitzer H., Narodoslowsky M. (2013) Comparison of ecological footprint for biobased PHA production from animal residues utilizing different energy resources. *Clean Technol Environ Pol.*; 15: 525-536
55. Sharma P., Munir R., Blunt W., et al. (2017) Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant *Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA SYNTHASE (PhaC1 16) enzyme. *Appl Sci.*;7:242.
56. Song J.J., Yoon S.C., Yu S.M., Lenz R.W. (1988) Differential scanning calorimetric study of poly(3-hydroxyoctanoate) inclusions in bacterial cells. *Int J Biol Macromol.*; 23(3):165-173.
57. Stubbe J. (1994) Overexpression and Purification of the Soluble Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a Required Posttranslational Modification for Catalytic Activity. *Biochemistry* 33:9311-9320
58. Stubbe J., and Tian J. (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Nat. Prod. Rep.* 20:445-457.
59. Špoljarić I.V., Lopar M., Koller M., Muhr A., Salerno A., Reiterer A., Horvat P. (2013) In silico optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. *J Biotechnol.*; 168: 625-635.

60. Tufail S., Munir S., Jamil N. (2017) Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Braz J Microbiol.*;48(4):629-636.
61. Uchino K., Saito T., Gebauer B., and Jendrossek D. (2007) Isolated Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granules Are Complex Bacterial Organelles Catalyzing Formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and Degradation of PHB to Acetyl-CoA. *J. Bacteriol.* 189:8250-8256.
62. Van-Thuoc D., Quillaguaman J., Mamo G., Mattiasson B. (2008) Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *J. Appl. Microbiol.* 104, 420–428
63. Wang Z.-X., Brämer C., and Steinbüchel A. (2003) Two phenotypically compensating isocitrate dehydrogenases in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.* 227:9-16.
64. Wecker P., Moppert X., Simon-Colin C., et al. (2015) Discovery of a mcl-PHA with unexpected biotechnical properties: the marine environment of French Polynesia as a source for PHA-producing bacteria. *Amb Express.*;5:74.
65. Wieczorek R., Pries A., Steinbüchel A., and Mayer F. (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 177:2425-2435.
66. Yu J. and Chen L.X.L. (2006) Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnology Progress*, v. 22, no. 2, p. 547–553.
67. Zinn M., Witholt B., and Egli T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, no. 1, p. 5–21.103.



## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

M. Marošević

---

ime i prezime studenta