

UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL
MESTRADO**

Eliana Betina Werlang

DESENVOLVIMENTO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA BIOMASSA DE *Spirulina*
platensis ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE
INDUSTRIAL

Santa Cruz do Sul, 28 de fevereiro de 2019.

ELIANA BETINA WERLANG

DESENVOLVIMENTO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis* ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado e Doutorado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Linha de Pesquisa em Microbiologia aplicada à Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Rosana de Cassia de Souza Schneider.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Maria Viviane Gomes Muller.

Santa Cruz do Sul
2019

SUMÁRIO

1	RESUMO	4
2	INTRODUÇÃO	6
3	ARTIGO 1 - BIOETHANOL FROM HYDROLYZED Spirulina (<i>Arthrosira platensis</i>) BIOMASS USING ETHANOLOGENIC BACTERIA.....	5
3.1	INTRODUCTION	18
3.2	MATERIAL AND METHODS	19
3.2.1	Microalgae source and preparation	19
3.2.2	Characterization of <i>A. platensis</i> biomass.....	20
3.2.3	Enzymatic saccharification of <i>A. platensis</i> carbohydrates	20
3.2.4	Fermentation	21
3.3	RESULTS AND DISCUSSION	22
3.3.1	Characterization of <i>A. platensis</i> biomass.....	22
3.3.2	Saccharification	23
3.3.3	Fermentation of hydrolysates from <i>A. platensis</i> by <i>E. coli</i> MS04	25
3.4	CONCLUSION	28
4	ARTIGO 2 - D-LACTATE PRODUCTION FROM SPIRULINA (<i>Arthrosira platensis</i>) BIOMASS USING LACTOGENIC <i>Escherichia coli</i>	29
4.1	INTRODUCTION	30
4.2	MATERIAL AND METHODS	32
4.2.1	Microalgae biomass.....	32
4.2.2	Enzymatic hydrolysis	33
4.2.3	Fermentation	33
4.2.4	Glucose and lactic acid analysis	34
4.3	RESULTS AND DISCUSSION	34
4.3.1	Saccharification production.....	34
4.3.2	Lactic acid production.....	35
4.4	CONCLUSION	39

5 ARTIGO 3 – Bioconversão de hidrolisado de <i>Spirulina platensis</i> em PHA empregando <i>Bacillus pumilus</i> em cultivo em fase líquida	41
5.1 INTRODUÇÃO	42
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.2.1 Cepa bacteriana e condições de cultivo	44
5.2.2 Ensaios de cinética com a cepa E10.....	44
5.2.3 Pré-tratamento da biomassa	45
5.2.4 Sacarificação enzimática.....	45
5.2.5 Produção de biopolímero	45
5.2.6 Extração de biopolímero.....	46
5.2.7 Análise microscópica.....	46
5.2.8 Análise cromatográfica	47
5.2.9 Caracterização do biopolímero.....	47
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.3.1 Crescimento da bactéria E10 (<i>Bacillus pumilus</i>)	47
5.3.2 Produção de biopolímero	53
5.3.3 Caracterização do biopolímero.....	54
5.4 CONCLUSÃO.....	56
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO.....	57
7 RERÊNCIAS	9
8 ANEXOS	68

1 RESUMO

O fluxograma geral do trabalho realizado pode ser visualizado na Figura 1, onde a biomassa primeiramente foi caracterizada em relação aos seus teores de lipídeos e ácidos graxos, carboidratos, amido, proteínas e cinzas. Posteriormente ao pré-tratamento com moagem criogênica e a remoção de extractivos, a fração polissacarídica foi submetida a ensaios de hidrólise enzimática para determinar a influência da concentração de enzimas na sacarificação dos carboidratos. Uma vez determinada essa condição, ensaios de produção de bioetanol, ácido láctico e PHB foram realizadas.

Destaca-se que durante a produção de bioetanol e ácido láctico, os experimentos foram realizados através da colaboração internacional entre a Universidade de Santa Cruz do Sul e a Universidade Nacional Autônoma do México, pelo Instituto de Biotecnologia (Ibt), junto ao Departamento de Engenharia Celular e Biocatálise, localizado na cidade de Cuernavaca, México. Para isso, as cepas bacterianas de *E. coli*, MS04 e JU15, utilizadas para produção de etanol e ácido láctico, respectivamente, são do acervo de cepas recombinantes registradas com patente do Ibt. Os demais experimentos e caracterizações foram realizadas nas dependências da UNISC.

O referencial teórico, a metodologia, resultados e discussões deste estudo serão apresentados em sequência na forma de três artigos. Portanto, o Artigo 1 apresentará os resultados referentes à produção de bioetanol, em língua inglesa, visando a publicação na Revista *Biomass and Bioenergy* (Fator de Impacto: 3.358, Qualis CAPES para Engenharia I: A2). O Artigo 2 apresentará os resultados referentes à produção de ácido láctico, em língua inglesa, visando a publicação na Revista *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Fator de Impacto: 3.376, Qualis CAPES para Engenharia I: A2). Os resultados da produção de PHB, por sua vez, serão apresentados no Artigo 3, em língua portuguesa, visando a publicação na Revista *Journal of Applied Polymer Science* (Fator de Impacto: 1.901, Qualis CAPES para Engenharia I: A2).

As imagens relacionadas aos experimentos com a produção de bioetanol e ácido láctico são apresentadas na sessão de Anexos deste trabalho.

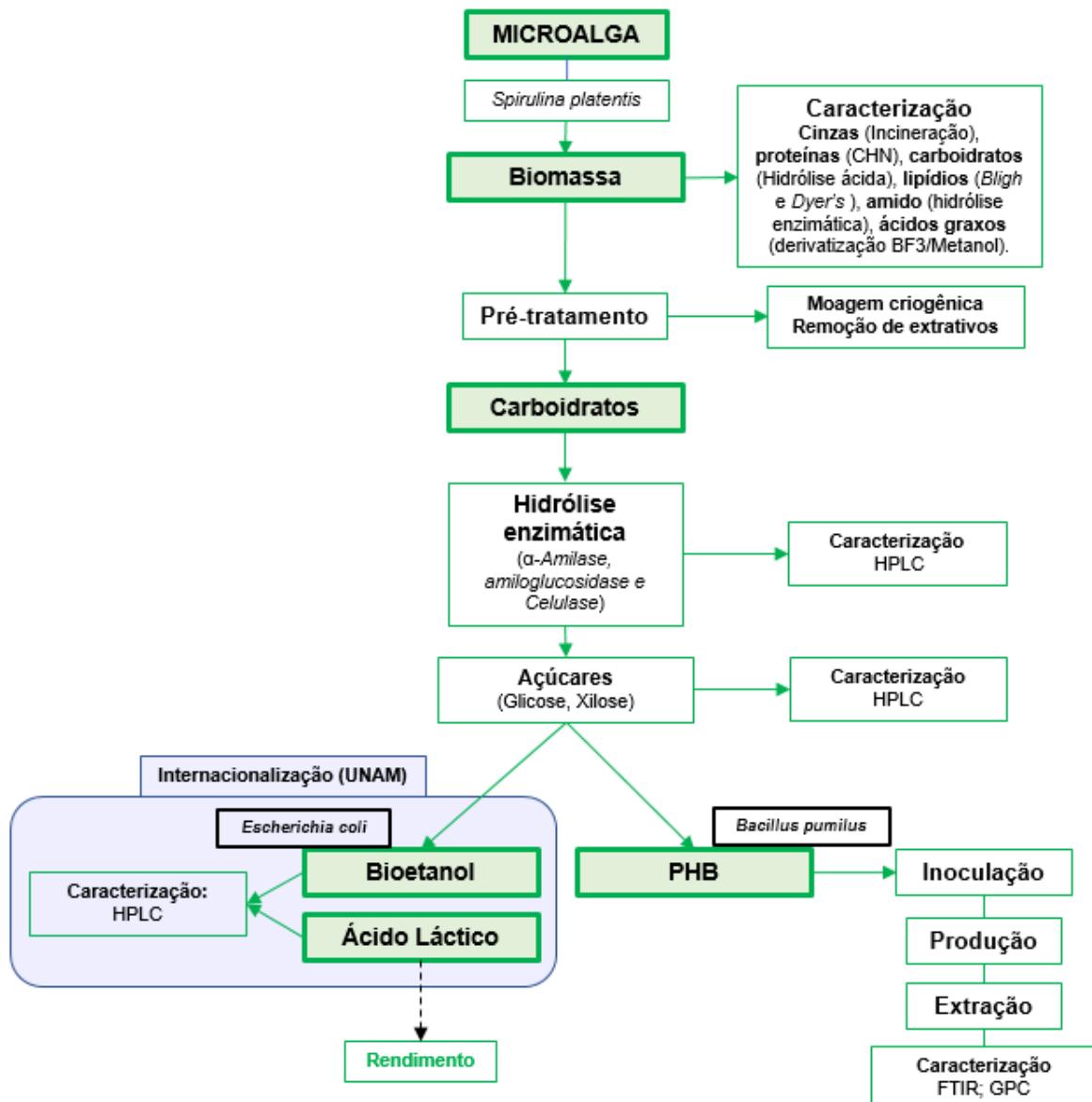


Figura 1 Fluxograma geral do trabalho realizado para produção de bioetanol, ácido láctico e PHB.

2 INTRODUÇÃO

Com a aceleração crescente do consumo de energia e os problemas ambientais associados a esse consumo, desafios vêm sendo propostos a toda sociedade. Diante deste cenário, biocombustíveis são considerados uma alternativa potencial para complementar o suprimento de energia limpa devido a utilização de matéria prima oriunda de fontes renováveis, diminuindo consideravelmente a poluição causada pela utilização de combustíveis fosseis [1]. Nesta nova proposta, os combustíveis como biodiesel e bioetanol são os mais produzidos atualmente [1, 2].

Para a produção destes biocombustíveis, os grãos oleaginosos e as fontes lignocelulósicas oriundas das indústrias alimentícias são comumente utilizados. Entretanto, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para substituir essas fontes por outras alternativas na produção de biocombustíveis. As algas, por sua vez, são consideradas alternativas promissoras pois além de produzir biomassa com elevado teor de lipídeos, carboidratos e proteínas, são capazes de se reproduzir através da fotossíntese com a assimilação de CO₂ [2].

Entretanto, mesmo com a crescente visibilidade das microalgas, o custo relacionado ao cultivo e a produção de biocombustíveis ainda é elevado. Relacionado a isso, o conceito de biorrefinaria vem sendo amplamente explorado, visando a integração de processos produtivos e reutilização de seus subprodutos, tornando-os sustentáveis [1, 3].

Neste contexto, uma alternativa promissora é a utilização de microalgas no tratamento de efluentes como forma de remoção de nutrientes. Após o processo de tratamento, a utilização da biomassa de microalga gerada é destinada para a produção de diversos bioproductos, tornando-se uma alternativa que visa reduzir o custo associado ao cultivo de microalgas e demais produtos desenvolvidos através desta matéria prima [2].

A biomassa de microalga é rica em lipídeos, proteínas, açúcares redutores, carboidratos e pigmentos, podendo ser utilizada em inúmeros processos para o desenvolvimento de diversos bioproductos. Durante muitos anos a fração lipídica foi utilizada como fonte primária nas pesquisas para a produção de biodiesel. Nos últimos anos, porém as pesquisas estão sendo voltadas para a conversão dos carboidratos em bioetanol, ácido láctico e biopolímeros, por exemplo.

Inúmeras espécies de microalgas possuem potencialidade de uso devido ao seu elevado teor de carboidratos. Dentre os gêneros comumente estudados destacam-se *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., e *Spirulina* sp. A parede celular da *Spirulina*, por exemplo, é composta predominantemente por polissacarídeos do tipo hexose, com baixos teores de xiloses ou pentoses, tornando-a muito promissora para a produção de bioetanol [4].

A produção de bioetanol ocorre basicamente em três estágios: 1) recuperação da fração fermentável presente na célula, na forma de amido e outros açúcares; 2) hidrólise dos açúcares utilizando diversos tratamentos, como enzimático e químico e; 3) fermentação dos açúcares utilizando microrganismos como leveduras e bactérias para a produção de bioetanol [5].

Outro bioproduto produzido através da fração polissacarídica é o ácido láctico, sendo considerado um produto de alto valor agregado por possuir diversas aplicações nas indústrias química, de cosméticos, farmacêutica, e de alimentos. O ácido láctico é uma alternativa biodegradável aos plásticos à base de petróleo, podendo ser produzido através de sínteses químicas ou pela fermentação com microrganismos. Os processos de fermentação microbiana possuem vantagens adicionais na medida em que utilizam substratos renováveis e requerem condições de produção moderadas e baixo consumo de energia, em comparação com a síntese química. Deste modo, a utilização de uma fonte renovável, rica em carboidratos vem sendo cada vez mais estudada [6].

Outra divisão de biopolímero estudada é a dos poli-3-hidroxibutiratos (PHB), pertencentes a classe dos polihidroxialcanoatos (PHA), que por sua vez, além de serem biodegradáveis, também são sintetizados por microrganismos, como bactérias, e possuem características semelhantes aos polímeros produzidos de fontes não renováveis [7-9]. Recentemente, inúmeros estudos vem sendo realizados para sintetizar PHB através de biomassa, como por exemplo subprodutos oriundos de processos industriais como gordura e óleos, resíduos da agricultura em geral, glicerol, açúcares, efluentes e microalgas [10-12]

De maneira geral, as tecnologias adotadas para o desenvolvimento de métodos biotecnológicos visam diminuir a geração de resíduos, emissões de gases e custos associados aos processos. Baseiam-se nos conceitos da química verde, onde a busca

por insumos e metodologias menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana tornam-se o principal diferencial em relação aos métodos convencionais.

No Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental (PPGTA), na linha de pesquisa “Microbiologia aplicada à Tecnologia Ambiental” o projeto “Emprego de microalgas para biorremediação em águas e efluentes e desenvolvimento de bioprodutos”, visa, a partir da utilização de microalgas, biorremediar efluentes e produzir bioprodutos, como bioetanol, biopolímeros e ácido láctico através da reutilização da biomassa de microalgas.

Destaca-se que a biomassa utilizada (*Spirulina platensis*) foi produzida através de um sistema de *raceway* desenvolvido na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). As cepas bacterianas para a produção de bioetanol e ácido láctico, MS04 e JU15 respectivamente, foram disponibilizadas através de uma colaboração internacional realizada com a Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). A cepa bacteriana utilizada para a produção de PHB, denominada E10, foi disponibilizada pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

Dentro deste cenário, ao aplicar os conceitos de biorefinaria para a produção de bioetanol, ácido láctico e PHB utilizando a microalga *Spirulina platensis*, justifica-se a realização deste trabalho e sua importância, uma vez que as técnicas de produção foram identificadas e otimizadas para buscar um alto rendimento durante a realização dos experimentos. Adicionalmente, visou-se reduzir os impactos relacionados aos insumos e resíduos gerados durante a produção destes bioprodutos, buscando a otimização e integração dos processos considerando princípios de química verde.

RERÊNCIAS

1. Su, Y., et al., *Progress of microalgae biofuel's commercialization*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017. **74**: p. 402-411.
2. Colling Klein, B., A. Bonomi, and R. Maciel Filho, *Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018. **82**: p. 1376-1392.
3. Patel, A., et al., *Microalgae: Antiquity to era of integrated technology*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017. **71**: p. 535-547.
4. Rempel, A., et al., *Saccharification of Spirulina platensis biomass using free and immobilized amyloytic enzymes*. Bioresource Technology, 2018. **263**: p. 163-171.
5. Raheem, A., et al., *A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments*. Journal of Cleaner Production, 2018. **181**: p. 42-59.
6. Abdel-Rahman, M.A. and K. Sonomoto, *Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid*. Journal of Biotechnology, 2016. **236**: p. 176-192.
7. Rahman, A. and C.D. Miller, *Chapter 6 - Microalgae as a Source of Bioplastics A2 - Rastogi, Rajesh Prasad*, in *Algal Green Chemistry*, D. Madamwar and A. Pandey, Editors. 2017, Elsevier: Amsterdam. p. 121-138.
8. Cassuriaga, A.P.A., et al., *Innovative polyhydroxybutyrate production by Chlorella fusca grown with pentoses*. Bioresource Technology, 2018. **265**: p. 456-463.
9. Costa, J.A.V., et al., *Recent advances and future perspectives of PHB production by cyanobacteria*. Industrial Biotechnology, 2018. **14**(5): p. 249-256.
10. Możejko-Ciesielska, J. and R. Kiewisz, *Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?* Microbiological Research, 2016. **192**: p. 271-282.
11. Naranjo, J.M., C.A. Cardona, and J.C. Higuita, *Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery*. Waste Management, 2014. **34**(12): p. 2634-2640.
12. Sakthiselvan, P. and R. Madhumathi, *Kinetic evaluation on cell growth and biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by Bacillus safensis EBT1 from sugarcane bagasse*. Engineering in Agriculture, Environment and Food, 2018. **11**(3): p. 145-152.
13. Lee, O.K. and E.Y. Lee, *Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass*. Biomass and Bioenergy, 2016. **92**: p. 70-75.

14. Hamouda, R.A., S.A. Sherif, and M.M. Ghareeb, *Bioethanol Production by Various Hydrolysis and Fermentation Processes with Micro and Macro Green Algae*. Waste Biomass Valor., 2018. **9**(9): p. 1495-1501.
15. Sivaramakrishnan, R. and A. Incharoensakdi, *Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel*. Fuel, 2018. **217**: p. 458-466.
16. Bastos, R.G., *Biofuels from Microalgae: Bioethanol*, in *Green Energy Technol.* 2018, Springer Verlag. p. 229-246.
17. Shokrkar, H., S. Ebrahimi, and M. Zamani, *Enzymatic hydrolysis of microalgal cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis*. Fuel, 2018. **228**: p. 30-38.
18. Velazquez-Lucio, J., et al., *Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review*. Biofuel Res. J., 2018. **5**(1): p. 780-791.
19. Vargas-Tah, A., et al., *Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol*. Bioresour. Technol., 2015. **198**: p. 611-618.
20. Braga, V.D.S., et al., *Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in Spirulina biomass*. Bioresour. Technol., 2018. **269**: p. 221-226.
21. Silva, A.D.S.E., et al., *Microwave-assisted extraction of polysaccharides from Arthrospira (Spirulina) platensis using the concept of green chemistry*. Algal Research, 2018. **35**: p. 178-184.
22. Rempel, A., et al., *Saccharification of Spirulina platensis biomass using free and immobilized amylolytic enzymes*. Bioresour. Technol., 2018. **263**: p. 163-171.
23. Li, X., et al., *Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis*. Bioresour. Technol., 2018. **263**: p. 555-561.
24. Dixon, C. and L.R. Wilken, *Green microalgae biomolecule separations and recovery*. Bioresour. Bioprocess., 2018. **5**(1).
25. Al Abdallah, Q., B.T. Nixon, and J.R. Fortwendel, *The Enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol*. Front. Energy Res., 2016. **4**: p. 36.
26. Singh, N., et al., *Bioethanol production potential of a novel thermophilic isolate Thermoanaerobacter sp. DBT-IOC-X2 isolated from Chumathang hot spring*. Biomass Bioener., 2018. **116**: p. 122-130.
27. Shankar, K., et al., *Saccharification of the pretreated husks of corn, peanut and coffee cherry by the lignocellulolytic enzymes secreted by Sphingobacterium*

- sp. ksn for the production of bioethanol.* Biomass Bioener., 2019. **127**: p. 105298.
28. Fernández-Sandoval, M.T., et al., *Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic Escherichia coli under non-aerated conditions in glucose-mineral medium.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012. **96**(5): p. 1291-1300.
 29. Sluiter, A., et al., *Determination of Ash in Biomass.* 2008. 1-6.
 30. Souza, L.D., et al., *Morphological and ultrastructural characterization of the acidophilic and lipid-producer strain Chlamydomonas acidophila LAFIC-004 (Chlorophyta) under different culture conditions.* Protoplasma, 2017. **254**(3): p. 1385-1398.
 31. Sluiter, A., et al., *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.* Laboratory analytical procedure, 2008. **1617**.
 32. Verdasco-Martín, C.M., A. Díaz-Lozano, and C. Otero, *Advantageous enzyme selective extraction process of essential spirulina oil.* Catal. Today, 2019.
 33. Phélix, M., et al., *Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria Arthrospira platensis.* Algal Res., 2019. **38**: p. 101426.
 34. Magro, F.G., et al., *Spirulina platensis biomass composition is influenced by the light availability and harvest phase in raceway ponds.* Environ. Technol., 2018. **39**(14): p. 1868-1877.
 35. Lu, W., et al., *Integrating Spirulina platensis cultivation and aerobic composting exhaust for carbon mitigation and biomass production.* Bioresour. Technol., 2019. **271**: p. 59-65.
 36. Depraetere, O., et al., *Harvesting carbohydrate-rich Arthrospira platensis by spontaneous settling.* Bioresour. Technol., 2015. **180**: p. 16-21.
 37. Keris-Sen, U.D. and M.D. Gurol, *Using ozone for microalgal cell disruption to improve enzymatic saccharification of cellular carbohydrates.* Biomass Bioener., 2017. **105**: p. 59-65.
 38. Tornabene, T., et al., *Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium Spirulina platensis (Cyanophyceae, Nostocales).* Marine Ecology-progress Series - Mar Eol-Progr Ser, 1985. **22**: p. 121-125.
 39. Phwan, C.K., et al., *Overview: Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae.* Energy Convers. Manag., 2018. **173**: p. 81-94.
 40. Fernández-Sandoval, M., et al., *Volumetric oxygen transfer coefficient as a means of improving volumetric ethanol productivity and a criterion for scaling up ethanol production with Escherichia coli: Scale-up ethanol production E. coli.* J. Chem. Technol. Biotechnol., 2016.

41. Castro, Y.A., et al., *Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation*. Appl. Energy, 2015. **140**: p. 14-19.
42. Hermansyah, et al., *Bioethanol Production from Microalgae Oscillatoria sp Cultured in Blue Green 11 and Bold Basal Media*. E3S Web Conf., 2018. **68**.
43. Phwan, C.K., et al., *Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae*. Biotechnol. Biofuels, 2019. **12**(1): p. 191.
44. Markou, G., et al., *Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis*. Energies, 2013. **6**: p. 3937-3950.
45. Zhou, N., et al., *Hydrolysis of Chlorella biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂*. Bioresour. Technol., 2011. **102**: p. 10158-61.
46. Shokrkar, H., S. Ebrahimi, and M. Zamani, *Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture*. Fuel, 2017. **200**: p. 380-386.
47. Mukhopadhyay, A., *Tolerance engineering in bacteria for the production of advanced biofuels and chemicals*. Trends Microbiol., 2015. **23**(8): p. 498-508.
48. Rodríguez, R., et al., *Environmental analysis of Spirulina cultivation and biogas production using experimental and simulation approach*. Renewable Energy, 2018. **129**: p. 724-732.
49. Vuppaldadiyam, A.K., et al., *Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2018. **12**(2): p. 304-324.
50. de Souza, M.P., et al., *Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges*. Waste and Biomass Valorization, 2018.
51. Chen, G., L. Zhao, and Y. Qi, *Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review*. Applied Energy, 2015. **137**: p. 282-291.
52. Li, X., et al., *Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalgae Spirulina platensis*. Bioresource Technology, 2018. **263**: p. 555-561.
53. Depraetere, O., et al., *Harvesting carbohydrate-rich Arthrospira platensis by spontaneous settling*. Bioresource Technology, 2015. **180**: p. 16-21.
54. Aikawa, S., et al., *Synergistic enhancement of glycogen production in Arthrospira platensis by optimization of light intensity and nitrate supply*. Bioresource Technology, 2012. **108**: p. 211-215.

55. Muys, M., et al., *High variability in nutritional value and safety of commercially available Chlorella and Spirulina biomass indicates the need for smart production strategies*. Bioresource Technology, 2019. **275**: p. 247-257.
56. Ho, S.H., et al., *Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock*. Bioresour Technol, 2013. **135**: p. 191-8.
57. Dixon, C. and L.R. Wilken, *Green microalgae biomolecule separations and recovery*. Bioresources and Bioprocessing, 2018. **5**(1).
58. Shokrkar, H. and S. Ebrahimi, *Synergism of cellulases and amylolytic enzymes in the hydrolysis of microalgal carbohydrates*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2018. **12**(5): p. 749-755.
59. Parra-Ramírez, D., A. Martinez, and C.A. Cardona, *Lactic acid production from glucose and xylose using the lactogenic Escherichia coli strain JU15: Experiments and techno-economic results*. Bioresource Technology, 2019. **273**: p. 86-92.
60. Alves de Oliveira, R., et al., *Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects*. Biochemical Engineering Journal, 2018. **133**: p. 219-239.
61. Bae, J.H., et al., *Direct fermentation of Jerusalem artichoke tuber powder for production of L-lactic acid and D-lactic acid by metabolically engineered Kluyveromyces marxianus*. Journal of Biotechnology, 2018. **266**: p. 27-33.
62. Cubas-Cano, E., et al., *Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2018. **12**(2): p. 290-303.
63. Park, H.J., et al., *Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast Pichia kudriavzevii NG7*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. **115**(9): p. 2232-2242.
64. Awasthi, D., et al., *Metabolic engineering of Bacillus subtilis for production of D-lactic acid*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. **115**(2): p. 453-463.
65. Eş, I., et al., *Recent advancements in lactic acid production - a review*. Food Research International, 2018. **107**: p. 763-770.
66. Upadhyaya, B.P., L.C. DeVeaux, and L.P. Christopher, *Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production*. Trends in Biotechnology, 2014. **32**(12): p. 637-644.
67. Zhao, J., et al., *Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by genetically engineered Escherichia coli B*. Microbial Cell Factories, 2013. **12**(1): p. 57.

68. Ishida, N., et al., *Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of pure L-(+)-lactic acid*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006. **131**(1): p. 795-807.
69. Joshi, D.S., et al., *Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for d-lactic acid production*. Biotechnology Letters, 2010. **32**(4): p. 517-520.
70. Wang, X., et al., *Pretreatment of corn stover by solid acid for d-lactic acid fermentation*. Bioresource Technology, 2017. **239**: p. 490-495.
71. Nguyen, C.M., et al., *Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli*. Bioresource Technology, 2012. **110**: p. 552-559.
72. Utrilla, J., et al., *Production of D-lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains*. Bioresource Technology, 2016. **220**: p. 208-214.
73. Utrilla, J., et al., *Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter*. Metabolic Engineering, 2012. **14**(5): p. 469-476.
74. Utrilla, J., G. Gosset, and A. Martinez, *ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to d-lactate*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009. **36**(8): p. 1057-1062.
75. Vargas-Tah, A., et al., *Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol*. Bioresource Technology, 2015. **198**: p. 611-618.
76. El-Mashad, H.M., *Biomethane and ethanol production potential of *Spirulina platensis* algae and enzymatically saccharified switchgrass*. Biochemical Engineering Journal, 2015. **93**: p. 119-127.
77. Talukder, M.M.R., P. Das, and J.C. Wu, *Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid*. Biochemical Engineering Journal, 2012. **68**: p. 109-113.
78. Nguyen, C.M., et al., *D-Lactic acid production from dry biomass of *Hydrodictyon reticulatum* by simultaneous saccharification and co-fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens**. Biotechnology Letters, 2012. **34**(12): p. 2235-2240.
79. Hirayama, S. and R. Ueda, *Production of optically pure D-lactic acid by *Nannochlorum* sp. 26A4*. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, 2004. **119**(1): p. 71-77.
80. Panda, I., et al., *Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis**. Chemical Engineering Communications, 2018. **205**(2): p. 249-256.

81. Sukan, A., I. Roy, and T. Keshavarz, *Dual production of biopolymers from bacteria*. Carbohydrate Polymers, 2015. **126**: p. 47-51.
82. Azizi, N., G. Najafpour, and H. Younesi, *Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using Cupriavidus necator*. International Journal of Biological Macromolecules, 2017. **101**(Supplement C): p. 1029-1040.
83. García Prieto, C.V., et al., *Optimization of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and PHB*. Energy, 2017.
84. Ganapathy, K., R. Ramasamy, and I. Dhinakarasamy, *Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **111**: p. 102-108.
85. Pérez Rivero, C., et al., *Building a predictive model for PHB production from glycerol*. Biochemical Engineering Journal, 2016. **116**: p. 113-121.
86. Obruca, S., et al., *Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications*. Biotechnology Advances, 2018. **36**(3): p. 856-870.
87. de Paula, F.C., et al., *Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated Pandoraea sp.* Journal of King Saud University - Science, 2017. **29**(2): p. 166-173.
88. Hand, S., J. Gill, and K.-H. Chu, *Phage-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB) produced from synthetic crude glycerol*. Science of The Total Environment, 2016. **557**: p. 317-321.
89. Hassan, M.A., et al., *Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by Bacillus sp. isolated from Egypt*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2016. **6**(4): p. 46-51.
90. Baikar, V., A. Rane, and R. Deopurkar, *Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by Bacillus megaterium VB89 Isolated from Nisargrana Biogas Plant*. Applied biochemistry and biotechnology, 2017. **183**(1): p. 241-253.
91. Lin, Y.-Y. and P.T. Chen, *Development of polyhydroxybutyrate biosynthesis in Bacillus subtilis with combination of PHB-associated genes derived from Ralstonia eutropha and Bacillus megaterium*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017. **79**: p. 110-115.
92. Sen, K.Y., M.H. Hussin, and S. Baidurah, *Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by Cupriavidus necator from various pretreated molasses as carbon source*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **17**: p. 51-59.
93. Kookos, I.K., A. Koutinas, and A. Vlysidis, *Life cycle assessment of bioprocessing schemes for poly(3-hydroxybutyrate) production using soybean*

oil and sucrose as carbon sources. Resources, Conservation and Recycling, 2019. **141**: p. 317-328.

94. Zeller, M.A., et al., *Bioplastics and their thermoplastic blends from Spirulina and Chlorella microalgae.* Journal of Applied Polymer Science, 2013. **130**(5): p. 3263-3275.
95. Moraes, L.B., *Emprego de resíduo agroindustrial oriundo da produção de biodiesel para obtenção de polihidroxialcanoato (PHA).* 2017.
96. Avendaño, R.E., et al., *Growth of Bacillus pumilus and Halomonas halodurans in sulfates: prospects for life on Europa.* Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, 2015. **67**(3): p. 367-375.
97. Divyashree, M.S. and T.R. Shamala, *Extractability of polyhydroxyalkanoate synthesized by Bacillus flexus cultivated in organic and inorganic nutrient media.* Indian journal of microbiology, 2010. **50**(1): p. 63-69.
98. Gowdhaman, D., B. Bharathi, and V. Ponnusami, *Isolation and Identification of Polyhydroxybutyrate(PHB) Producing Bacillus cereus BB613-A Novel Isolate.* 2016, International Journal of ChemTech Research. p. 224-228.
99. Yousuf, R.G. and J.B. Winterburn, *Waste date seed oil extract as an alternative feedstock for Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis.* Biochemical Engineering Journal, 2017. **127**: p. 68-76.
100. Lin, K.-W., C.-H. Lan, and Y.-M. Sun, *Poly[(R)3-hydroxybutyrate] (PHB)/poly(l-lactic acid) (PLLA) blends with poly(PHB/PLLA urethane) as a compatibilizer.* Polymer Degradation and Stability, 2016. **134**: p. 30-40.
101. Arcos-Hernandez, M.V., et al., *Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures.* Journal of Biotechnology, 2010. **150**(3): p. 372-379.
102. Kumar, M., et al., *Recovery of polyhydroxyalkanoates from municipal secondary wastewater sludge.* Bioresource Technology, 2018. **255**: p. 111-115.
103. Kynadi, A.S. and T.V. Suchithra, *Formulation and optimization of a novel media comprising rubber seed oil for PHA production.* Industrial Crops and Products, 2017. **105**: p. 156-163.
104. AK, B., et al., *Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes.* 2013: *International Journal of Biomaterials.*
105. Obruca, S., et al., *Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds.* Process Biochemistry, 2014. **49**(9): p. 1409-1414.

106. Li, T., D. Elhadi, and G.-Q. Chen, *Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals*. Metabolic Engineering, 2017. **43**: p. 29-36.
107. Ramezani, M., M. Amoozegar, and A. Ventosa, *Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly- β -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium Oceanimonas sp. GK1*. Vol. 65. 2014.
108. Sathiyanarayanan, G., et al., *A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus subtilis* MSBN17*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **59**: p. 170-177.