



**UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI**

**POLIHIDROXIALCANOATS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE I  
BIODEGRADABLE ALS PLÀSTICS TRADICIONALS**

**Ot Pentinat Llurba**

**TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA**

Tutor acadèmic: Manuel Suárez Recio, Biotecnologia, [manuel.suarez@urv.cat](mailto:manuel.suarez@urv.cat)

Juny 2022

Jo, Ot Pentinat Llurba , amb DNI 39952886T, soc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquet TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de juny de 2022



*Ot Pentinat Llurba*

## **AGRAÏMENTS**

Abans de tot, m'agradaria donar les gràcies al meu tutor de TFG, el doctor Manuel Suárez Recio, per tots els consells a l'hora de la tria de tema de la memòria, també, per estar sempre pendent de tots els correus i solucionar-me els dubtes; però pel que estic més agraït, es pel temps que ens ha dedicat a mi i al TFG.

També, vull centrar el meu agraïment a tota la meva família, la meva mare, el meu pare i als meus tres germans, ells ja saben tot el que m'han ajudat, no només en aquesta última empenta per acabar la universitat, sinó en tots els moments importants de la meva vida. Gràcies per estar amb mi sempre.

Seguidament, es necessari agrair a la meva parella, per haver-me ajudat en tot el que ha pogut i més, i per haver-me tranquil·litzat en moments en els que estava molt nerviós.

Finalment, vull donar les gràcies a la Universitat Rovira i Virgili, en concret a tots els professor que m'han ensenyat el que avui està plasmat en el meu TFG. Ha estat un plaer ser alumne durant quatre anys i formar part d'aquesta família.

## POLIHIDROXIALCANOATS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE I BIODEGRADABLE ALS PLÀSTICS TRADICIONALS

### ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ .....	3
2. OBJECTIUS.....	6
3. METODOLOGIA DE LA REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA .....	7
4. POLIHIDROXIALCANOATS.....	9
4.1. Biosíntesi de PHA i gens implicats.....	12
4.2. Enzims, gens i proteïnes clau .....	14
5. MILLORES PER ARGUMENTAR LA BIOSÍNTESIS DE PHA .....	15
5.1. Mètodes d'enginyeria genètica de vies competidores a la síntesis de PHA.....	15
5.1.1. Regulació de la via de l'àcid tricarboxílic (TCA) per CRISPRi.....	16
5.1.2. Regulació de la via del citrat de metil (MCC) i TCA per CRISPRi.	17
5.1.3. Regulació de la $\beta$ -oxidació.....	17
5.2. Enginyeria de les mides de les cèl·lules .....	19
5.2.1. Augment de la mida i el volum cel·lular per CRISPRi .....	19
5.3. Enginyeria genètica dels promotors i dels llocs d'unió ribosomals (RBS).....	20
6. MICROORGANISMES SINTETITZADORS DE PHA .....	23
6.1. Bacteris .....	23
6.1.1. Extremòfils per a la síntesi de PHA .....	24
6.2. Llevats.....	25
6.3. Plantes .....	26
6.4. Microalgues.....	26
7. RESULTATS.....	28
8. APLICACIONS.....	34

8.1. Aplicacions d'embalatge .....	35
8.2. Aplicacions mèdiques .....	36
8.3. Aplicacions agrícoles .....	36
9. CONCLUSIONS .....	37
10. PERSPECTIVES DE FUTUR.....	38
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES .....	40
AUTOAVALUACIÓ.....	44
ANNEXOS.....	45

**LLISTAT D'ABREVIATURES**

3HB*	3-hidroxi-butirat
3HD*	3-hidroxi-decanoat
3HDD*	3-hidroxi-dodecanoat
3HHx*	3-hidroxi-hexanoat
3HO*	3-hidroxi-octanoat
3HP*	3-hidroxi-propionat
3HV*	3-hidroxi-valerat
4HB*	4-hidroxi-butirat
4HV*	4-hidroxi-valerat
5HV*	5-hidroxi-valerat
CDW	de l'anglès <i>cell dry weight</i>
CRISPRi	de l'anglès <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference</i>
GRAS	de l'anglès <i>generally recognized as safe</i>
Lcl	de l'anglès <i>long chain length</i>
MCC	de l'anglès <i>methylcitrate cycle</i>
Mcl	de l'anglès <i>medium chain length</i>
NGIB	de l'anglès <i>new generation industrial biotechnology</i>
OLMA	de l'anglès <i>oligo-linker mediated assembly</i>
PCL	policaprolactona
PE	polietilè
PET	tereftalat de polietilè
PHBV	poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerat)
PLA	àcid polilàctic
RBS	de l'anglès <i>ribosomal binding site</i>
ScI	de l'anglès <i>short chain length</i>
sgRNA	de l'anglès <i>small guide ribonucleic acid</i>
TCA	de l'anglès <i>tricarboxylic acid</i>

\* els seus polímers s'anomenen de la següent manera: 3HB passa PHB (polihidroxi-butirat) i així successivament.

## RESUM

Els plàstics són una ampla gama de materials sintètics d'origen fòssil, de moment irremplaçables. Tot i així, aquests no són biodegradables i contribueixen a la contaminació mediambiental. Els polihidroxicanoats (PHA) són biopolímers d'àcid (R)-hidroxicanoic, una alternativa als plàstics tradicionals a causa de les seves característiques similars i la seva biodegradabilitat completa. Aquests són sintetitzats majoritàriament per organismes procariotes per l'emmagatzematge d'energia. Mitjançant la repressió o supressió de vies competidores, la sobreexpressió dels diferents enzims de síntesis, la construcció de noves vies, l'augment de la mida cel·lular i la utilització de diferents cassets d'expressió s'ha editat el genoma, no només de bacteris, sinó que també de plantes, microalgues i llevats, per aconseguir organismes enginyeritzats productors de diferents polihidroxicanoats.

Aquesta revisió bibliogràfica consta de 31 articles relacionats amb els polihidroxicanoats, les tècniques d'edició genètica i els diferents organismes productors. A través de la cerca i l'anàlisi dels resultats de les publicacions, s'ha observat una àmplia gama de tècniques per l'edició de diferents organismes productors de polihidroxicanoats, sent els bacteris la opció més viable actualment. No obstant això, falten molts estudis en la utilització de diferents organismes i altres tècniques que ajudaran a trobar un organisme ideal per poder produir aquests bioplàstics de manera industrial.

**Paraules clau:** bioplàstics; biodegradable; polihidroxicanoats; biosíntesi; tècniques d'enginyeria genètica.

## ABSTRACT

Plastics are a wide range of fossil-based synthetic materials that are currently irreplaceable. However, they are not biodegradable, and they contribute to environmental pollution. Polyhydroxyalkanoates (PHA) are (R)-hydroxyalkanoic acid biopolymers, an alternative to traditional plastics due to their similar characteristics and complete biodegradability. These are mostly synthesized by prokaryotic organisms for energy storage. The genome of different organisms has been edited by suppressing competing pathways by CRISPRi, overexpressing different synthesis enzymes, building new pathways, increasing cell size, and using different expression cassettes, not only in bacteria, but also in plants, microalgae, and yeasts.

This literature review consists of 31 articles related to polyhydroxyalkanoates, genetic editing techniques, and the various producing organisms. Through the search and analysis of the results of the publications, a wide range of techniques for the editing of different organisms producing polyhydroxyalkanoates has been observed, with bacteria being the most viable option today. However, many studies are lacking in the use of different organisms and other techniques that will help find an ideal organism to produce these bioplastics industrially.

**Keywords:** bioplastics; biodegradable; polyhydroxyalkanoates; biosynthesis; genetic engineering techniques.

## 1. INTRODUCCIÓ

Avui en dia, els plàstics són un element molt comú en les nostres vides i ofereixen nombrosos beneficis a la societat. Els plàstics tenen moltes més funcionalitats de les que ens pensem; ajuden a alimentar al món d'una manera segura i sostenible, ja que redueixen el malbaratament alimentari; contribueixen a construir edificis i cases més eficients des del punt de vista energètic; permeten grans estalvis de combustible en tots els transports, per tant, disminueixen les emissions de gasos d'efecte hivernacle, i fins i tot, poden salvar vides, ja que són utilitzats en una àmplia gamma d'aplicacions mèdiques [1,7]. Sens dubte, els plàstics són materials molt presents en el nostre dia a dia i potencialment insubstituïbles degut a les seves característiques.

Els plàstics tradicionals derivats del petroli fòssil són una família de centenars de materials amb una àmplia gamma de propietats. La diversitat, la mal·leabilitat, la durabilitat i un alt grau de personalització són una pinzellada de les millors qualitats dels plàstics. A més a més, la seva força, pes lleuger i producció fàcil i de baix cost els converteixen en materials idonis per un elevat nombre d'aplicacions, ja siguin productes industrials o productes de consum. Per tant, els plàstics són materials clau en l'embalatge, la construcció, en el sector del transport, en els dispositius electrònics, la llar, el temps lliure, els esports i l'agricultura, entre d'altres [1,2,3].

Malgrat això, els plàstics juguen a dos bandes; tenen un gran impacte positiu en la facilitació de la nostra vida quotidiana, però al mateix temps són una font important de contaminació mediambiental. De fet, la producció de plàstic actual s'enfronta a deficiències essencials, com l'esgotament continu dels recursos fòssils, el problema mediambiental causat per la dispersió de plàstic, el creixement d'illes de plàstics ens els oceans, i nivells elevats de CO<sub>2</sub> i toxines en l'atmosfera causats per la incineració d'aquests [4,5].

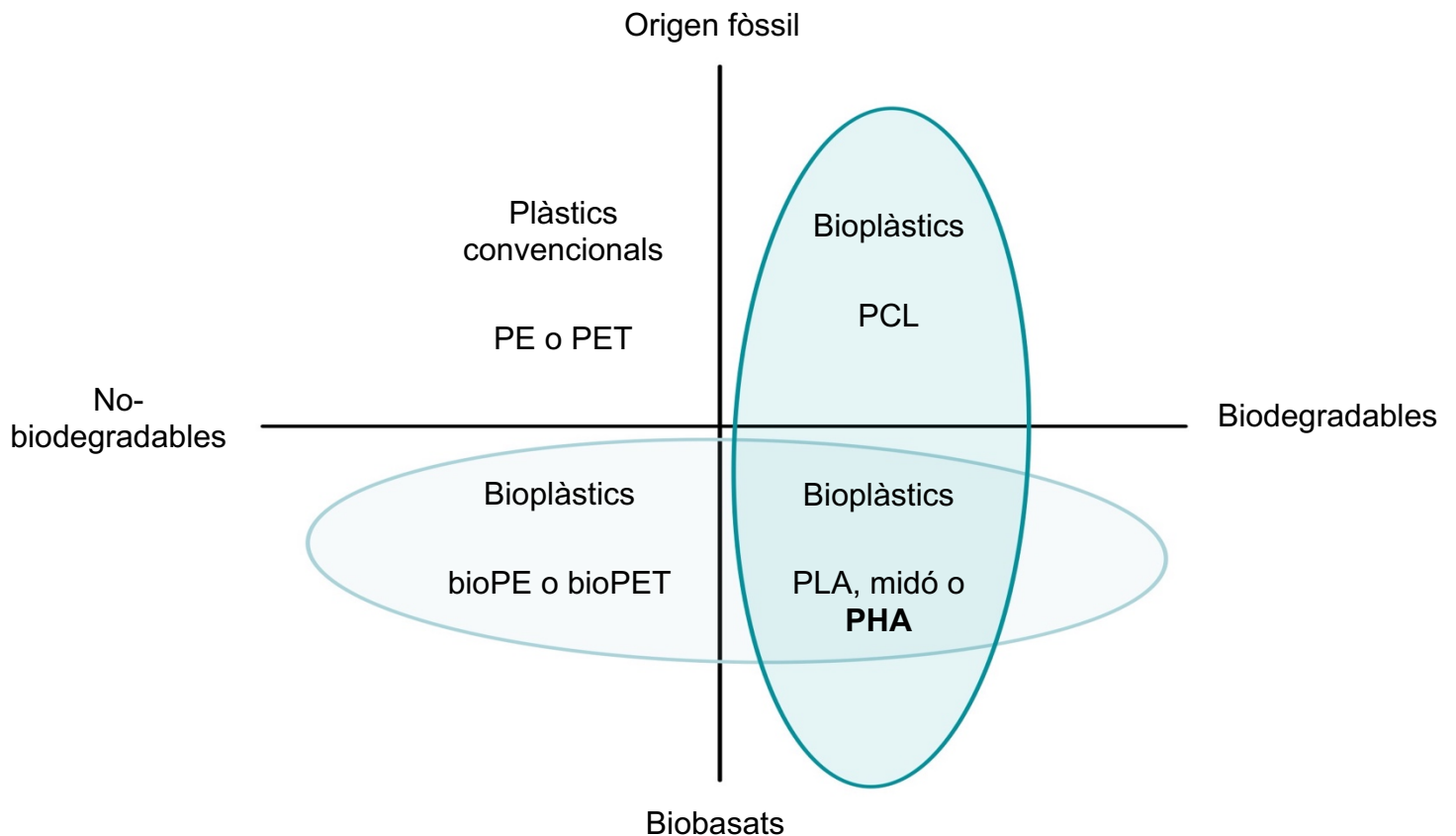
A més, les deixalleries no aconsegueixen fer front a tots els residus que es generen principalment a causa de la producció i el consum continuats. De manera que la majoria d'aquests acaben amb una gestió inadequada. S'estima que un 79% dels residus plàstics acaben en abocadors o són descartats de manera inadequada en ambients naturals, com els mars i oceans [1,3].

Afortunadament, la preocupació pel medi ambient ha augmentat i s'estan destinant esforços a trobar una manera de sortir de la fatídica “*Edat de Plàstic*”. S'han realitzat diversos avenços, sobretot en referència al reciclatge dels plàstics, utilitzant noves tecnologies que augmenten la quantitat de tipus de plàstic que es poden reciclar [5]. Un dels avenços més prometedors són els bioplàstics, una bioalternativa amb propietats similars als plàstics, que es basen en recursos renovables, i que poden sotmetre's a la biodegradació i el compostatge [3].

Els bioplàstics, que són la nova generació de plàstics, es defineixen com a plàstics originaris d'un sistema biològic i produïts a partir de matèries primeres renovables i/o per una sèrie de microorganismes. Aquests, redueixen de manera significativa l'impacte mediambiental, sobretot disminuint l'efecte hivernacle i el consum d'energia, de manera que constitueixen un repte per a un futur més ecològic.

Actualment, la classificació més àmpliament utilitzada dels plàstics diferencia entre materials no biodegradables i materials biodegradables; així com en l'ús de matèries primeres renovables (biobasats) o matèries primeres petroquímiques (d'origen fòssil) (**Figura 1**) [6]. Concretament, es pot fer la següent classificació:

- I. Plàstics convencionals, plàstics d'origen fòssil i no biodegradables, com el polietilè (PE) convencional i el tereftalat de polietilè (PET).
- II. Bioplàstics d'origen fòssil i biodegradables. Com la policaprolactona (PCL).
- III. Bioplàstics biobasats o parcialment biobasats i no biodegradables. Per exemple, bio-PE o bio-PET.
- IV. Bioplàstics biobasats i biodegradables. Com ara, àcid polilàctic (PLA), polihidroxialcanoats (PHA) i midó.



**Figura 1.** Classificació dels plàstics. Creació pròpia.

Entre les alternatives a plàstics biodegradables, els polihidroxialcanoats (PHA) són els que destaquen amb un major interès degut a les seves característiques similars als plàstics convencionals, però amb l'avantatge que són completament biodegradables. Aquests són produïts per microorganismes, majoritàriament procariotes, i pretenen reemplaçar els plàstics tradicionals en diversos sectors del mercat, com en el camp de l'envàs o en aplicacions biomèdiques. No obstant, per a fer competitius els PHA, no només és important que aquests siguin biodegradables, sinó que també han de ser adequats tant en termes de qualitat com d'aspectes econòmics, ja que aquests no han arribat al nivell dels plàstics convencionals, per tant són necessàries noves tècniques per poder maximitzar aquest producte tan prometedor [5].

La investigació bibliogràfica d'aquest treball de fi de grau és basa en **la hipòtesi que la utilització de tècniques d'enginyeria genètica a diferents organismes per la producció de PHA per la formació de bioplàstics és una alternativa eficient als plàstics convencionals.**

## 2. OBJECTIUS

Considerant els antecedents prèviament indicats, així com la hipòtesi plantejada, **l'objectiu general d'aquest treball de revisió bibliogràfica és aportar una visió, sintetitzada, específica i actual dels coneixements sobre els polihidroxicanoats (PHA)**, fent èmfasis en dos punts claus en la biotecnologia: (i) l'ús de diferents tècniques d'edició del genoma i (ii) la selecció del microorganisme idoni produir PHA bioplàstics.

Conseqüentment, els **objectius específics** són:

- I. Conèixer els diferents tipus de PHA.
- II. Estudiar les principals rutes biosintètiques de producció dels PHA.
- III. Analitzar les diferents estratègies d'edició del genoma per produir PHA.
- IV. Identificar i comparar els diferents organismes capaços de produir PHA.

### 3. METODOLOGIA DE LA REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

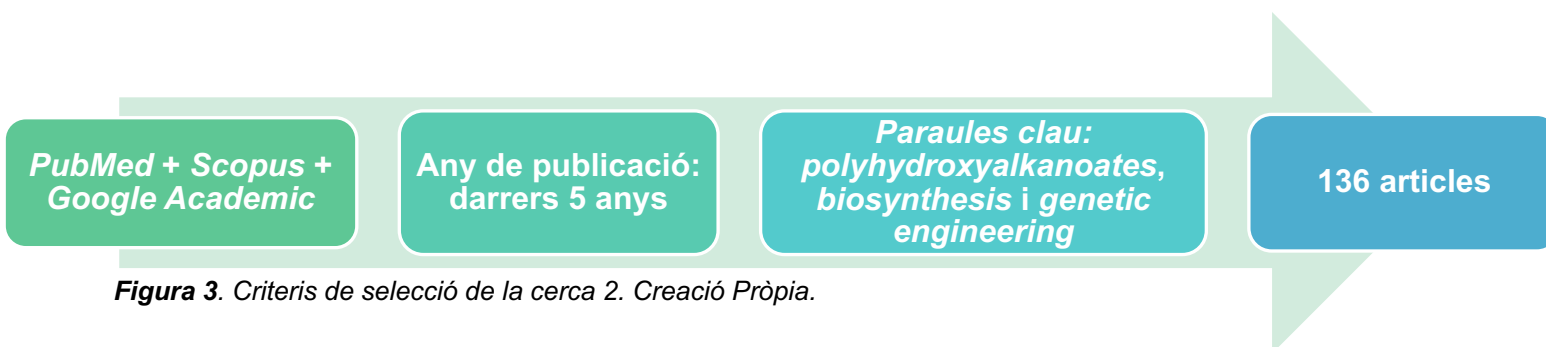
La metodologia seguida per a l'elaboració del present treball de revisió bibliogràfica ha consistit en la recerca, la selecció i l'anàlisi d'informació científica de camp del treball definit, tot respectant els objectius del treball. Seguidament, s'ha organitzat i sintetitzat la informació amb la finalitat de proporcionar una visió més clara, concisa i actual, alhora que crítica, reflexiva i específica, sobre els PHA i les tècniques d'enginyeria genètica per la producció d'aquests.

Quant a la cerca i a la localització de la informació científica, encara que s'han utilitzat recursos electrònics multidisciplinaris com *Google acadèmic*, majoritàriament s'han fet servir recursos especialitzats, utilitzant les bases de dades *Scopus* i *PubMed*. La cerca dels articles ha estat realitzada en el període que inclou des de gener fins a maig del 2022.

Per a la recopilació d'aquesta informació, s'han utilitzat diferents paraules claus en anglès amb la finalitat de concretar el rang de cerca. Per dur a terme el treball, es va començar amb una cerca més general sobre bioplàstics (**Fig. 2**). Seguidament seguint amb la recerca es va acotar a PHA i les tècniques d'edició genètica per l'obtenció de PHA a diferents microorganismes enginyeritzats (**Fig. 3**).



**Figura 2.** Criteris de selecció de la cerca 1. Creació Pròpia.



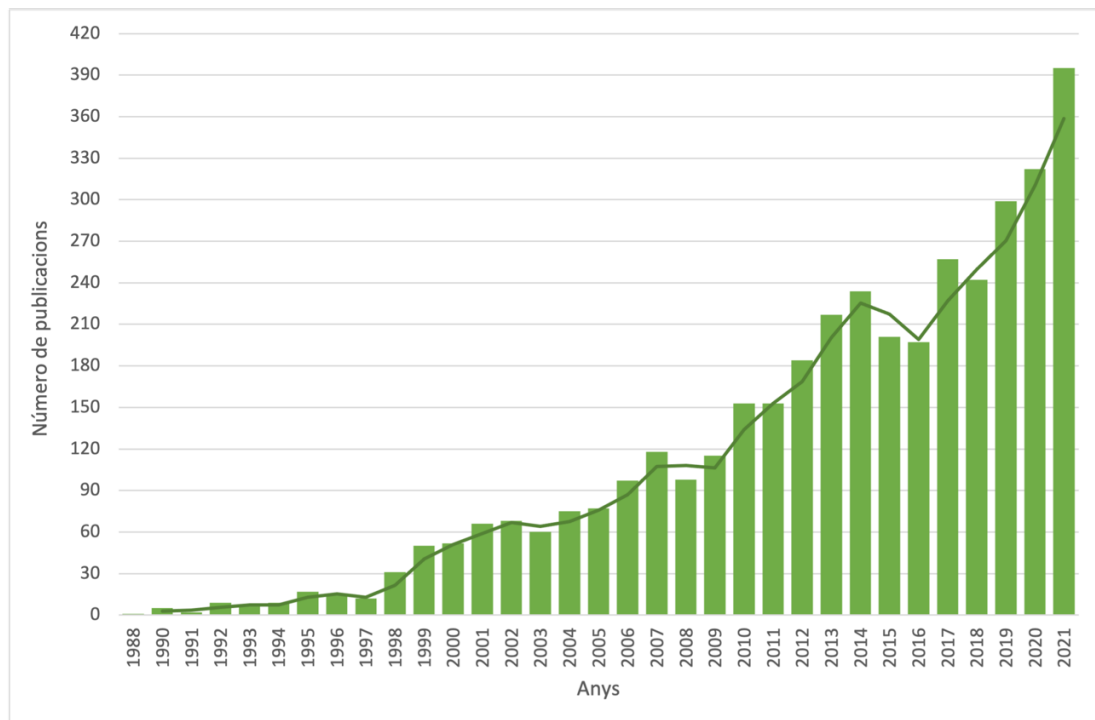
**Figura 3.** Criteris de selecció de la cerca 2. Creació Pròpia.

Les paraules clau utilitzades en la primera van ser “*biodegradation*”, “*circular economy*” i “*bioplastics*”; i els criteris de selecció, articles publicats en els darrers 5 anys i review. Aquesta cerca va generar **21 resultats**.

Les paraules clau utilitzades en la segona van ser “*polyhydroxyalkanoates*”, “*biosynthesis*” i “*genetic engineering*”; i els criteris de selecció, articles publicats fa 5 anys o menys. Aquesta cerca va generar **136 resultats**.

Finalment, es va procedir a llegir els resums dels articles en ordre d'aparició, triant els que s'adaptaven millor a la temàtica del treball. A més dels resultats obtinguts en les diferents cerques, s'han consultat cites les quals apareixen en les bibliografies dels propis articles.

A continuació, en la **Figura 4**, es mostra una gràfica en la qual es representa el nombre de publicacions sobre polihidroxiàlcanoats per any, des de l'any 1990 fins a l'any 2021. Es pot observar una tendència exponencial el nombre de publicacions referents a en aquests tipus de biopolímers, fet que ve donat pel desig de fer un canvi cap a un món més sostenible.



**Figura 4.** Nombre de publicacions sobre polihidroxiàlcanoats per any en el recurs electrònic PubMed. Creació Pròpia.

Articles consultats a partir de la bibliografia existent en la cerca general: 17.

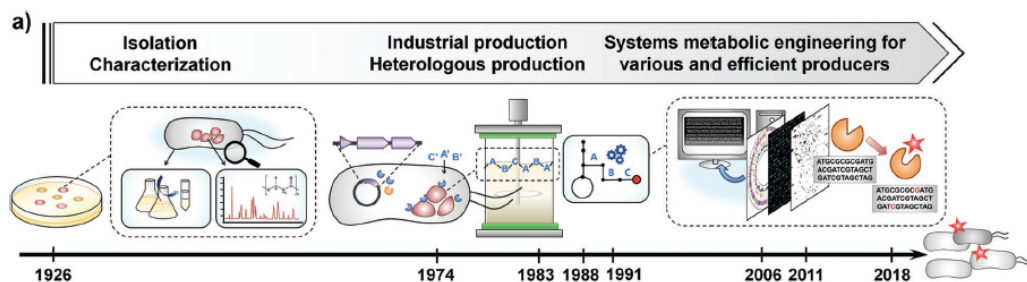
**Bibliografia total consultada:** 31 articles (27 dels quals amb data de publicació igual o posterior a 2017).

#### 4. POLIHIDROXIALCANOATS

Les primeres aparicions de plàstics daten la dècada del 1950 i avui en dia són una part indispensable de la societat. Amb característiques excel·lents com el pes lleuger, alta flexibilitat i força, es van convertir en un producte clau en la vida quotidiana. Tot i així, com que el plàstic tradicional no és biodegradable i s'ha produït excessivament a escala mundial, ha generat un gran problema mediambiental. Els mars i oceans del planeta, avui en dia no només són l'habitat dels peixos i organismes marins, sinó que també ho són dels plàstics i altres residus que produïm els humans, provocant no només contaminació i esgotament de recursos, sinó que envaint ecosistemes i disminuint la biodiversitat del planeta [8]. Degut a aquest problema creixent, en les últimes dècades hi ha hagut preocupacions sobre els efectes nocius d'aquests plàstics derivats del petroli per part dels organismes públics i mediambientals. Aquesta consciència ha provocat un impuls científic global per desenvolupar alternatives, com polièster ecològics i biodegradables o substituïts de plàstics [10].

Els polihidroxicanoats (PHA) són biopolímers d'àcid (R)-hidroxicanoic (**Fig. 6**) amb propietats similars als plàstics tradicionals, però que es caracteritzen per tenir una biodegradabilitat completa [7,8]. Són sintetitzats per microorganismes com a inclusions lipídiques per a l'emmagatzematge d'energia en forma de grànuls dins de l'estructura cel·lular [10].

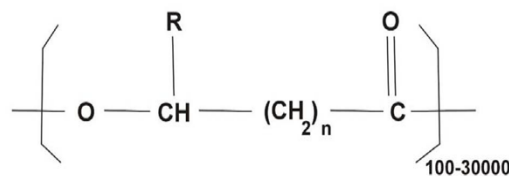
El 1926, el científic francès Lemoigne va identificar, en *Bacillus megaterium*, unes inclusions semblants als lípids. Aquestes inclusions contenien el primer compost, ara coneguts com a PHA, el 3-hidroxi-butirat (3HB). Aquest descobriment va portar al període d'explosió per tal de descobrir i identificar nous possibles components d'interès mitjançant l'alimentació dels microorganismes amb diferents fonts de carboni relacionades i utilitzant tècniques d'edició genòmica (**Fig. 5**) [7,9].



**Figura 5.** Il·lustració esquemàtica del desenvolupament en la producció de PHA [7].

Uns 50 anys més tard, el 3-hidroxivalerat (3HV) i el 3-hidroxihexanoat (3HHx) també es van identificar com a monòmers de PHA que mostraven propietats materials molt millors, i se'n van produir en grans quantitats a escala industrial.

Des d'aquell moment, s'han identificat més de 150 estructures com a components de la família dels PHA. Aquests es poden classificar segons el nombre de carbonis (C2–C20), la posició del grup hidroxil i els grups funcionals de les cadenes laterals [7,8]. Aquesta gran diversitat de PHA és possible a causa de la promiscuïtat de les sintases PHA, involucrades en la seva síntesis i que poden actuar sobre una àmplia gamma de substrats.



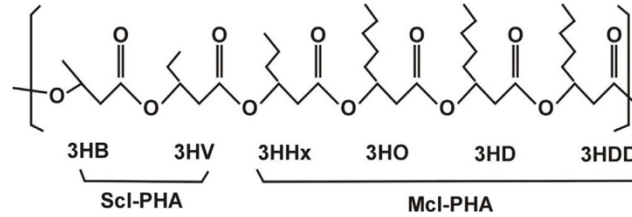
**Figura 6.** Estructura química dels principals PHA produïts en bacteris [10].

A la **Taula 1** es mostren alguns exemples de la varietat de monòmers que poden presentar els PHA. S'indica el nom i l'abreviatura que rep el monòmer, el nombre d'àtoms de carboni pels quals estan constituïts i els valors de "n" i del grup radical (R) en la unitat repetitiva general.

**Taula 1.** Monòmers constituents dels PHA. Creació Pròpia.

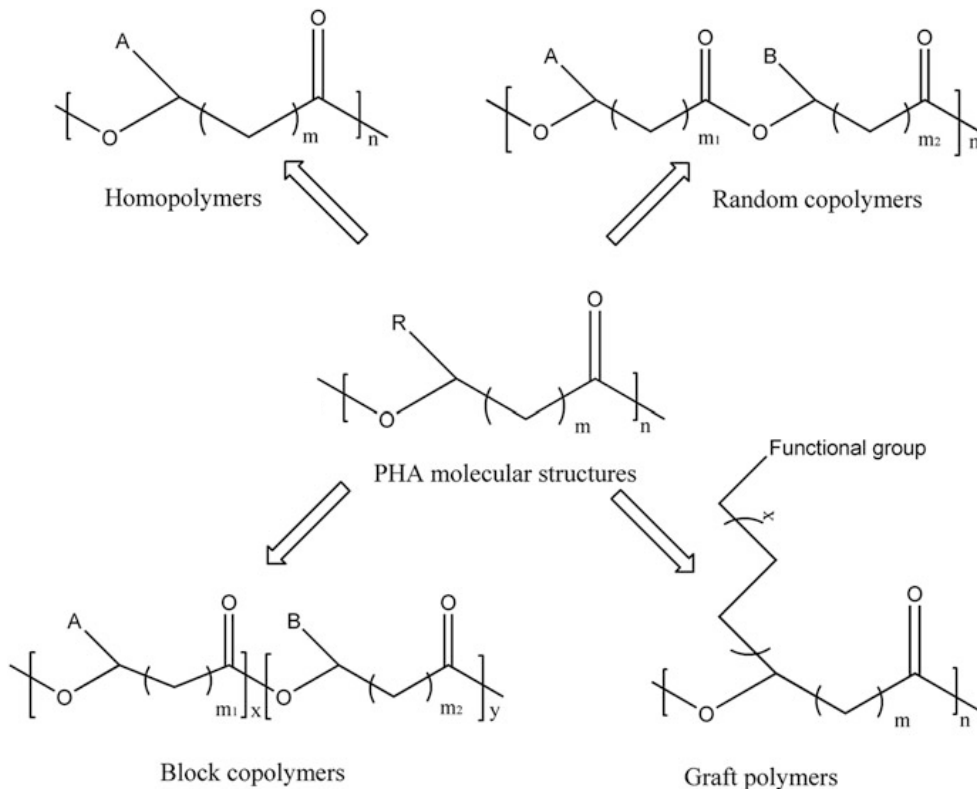
Abreviatura	Nom del monòmer	n	R	Número de C
<b>3HP</b>	poli(3-hiroxiopropionat)	1	Hidrogen	3
<b>3HB</b>	poli(3-hidroxibutirat)	1	Metil	4
<b>3HV</b>	poli(3-hidroxivalerat)	1	Etil	5
<b>3HHx</b>	poli(3-hidroxihexanoat)	1	Propil	6
<b>3HO</b>	poli(3-hidroxioctanoat)	1	Pentil	8
<b>4HB</b>	poli(4-hidroxibutirat)	2	Hidrogen	4
<b>4HV</b>	poli(4-hidroxivalerat)	2	Metil	5
<b>5HV</b>	poli(5-hidroxivalerat)	3	Hidrogen	5

Generalment, els PHA es divideixen en PHA de cadena curta (Scl, de l'anglès *short chain length*), entre C3–C5 i PHA de cadena mitjana (Mcl, de l'anglès *medium chain length*) que comprenen els monòmers de C6–C14. En alguns casos, es poden produir PHA de cadena llarga (Lcl, de l'anglès *long chain length*) que comprèn longituds de cadena de carboni encara més llargues (C15–C20) [7,9]. Els monòmers de 3HB i 3HV són exemples de Scl, mentre que 3HHx, 3HO, 3-hidrodecanoat (3HD), i 3-hidroxidodecanoat (3HDD) són de Mcl (**Fig. 7**) [10].



**Figura 7.** Estructura de les PHA pel que fa a la classificació [10].

Segons la composició dels monòmers i les seves disposicions, els PHA s'han classificat en (i) homopolímers que consisteixen en un monòmer, (ii) copolímers aleatoris de dos o més monòmers diferents, (iii) copolímers de bloc d'almenys dos homopolímers connectats per enllaços covalents i (iv) els polímers d'empelt, que són copolímers que es sintetitzen majoritàriament per modificació química d'homopolímers (**Fig. 8**) [11].



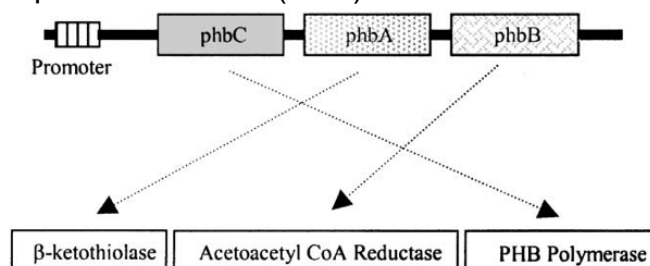
**Figura 8.** Estructures moleculars PHA [11].

Els substrats inicials, els tipus i les composicions de monòmers, les estructures moleculars que adopten i les associacions són factors clau en les propietats dels PHA. D'aquesta manera, els polímers poden ser sintetitzats per presentar característiques diferents com ara propietats químiques, mecàniques, biodegradables i biocompatibles. Tot i així, la major diferència entre propietats recau en la mida dels PHA. Per exemple, els Scl són generalment termoplàstics durs i rígids amb alta cristal·linitat, mentre que els Mcl són flexibles [7,9].

No obstant, malgrat tot l'avenç, la producció de bioplàstics és gairebé nul·la respecte a la del total de plàstic produït anualment. Per augmentar la producció de PHA es poden utilitzar diferents estratègies. Per exemple, d'entre les més destacades trobem l'edició genètica per produir copolímers, la millora de microorganismes per utilitzar una gamma més àmplia de fonts de carboni disponibles, la coproducció amb altres productes valuosos i la funcionalització de PHA per millorar la seva aplicació [8].

#### 4.1. Biosíntesi de PHA i gens implicats

El PHA es sintetitza en un gran nombre de procariotes així com en alguns eucariotes. El genoma bacterià conté diversos gens per a la producció de PHA i proteïnes relacionades amb els processos de metabolisme relacionats amb aquests. El clúster s'anomena operó CAB i està compost pel gen *phaC* que codifica per una PHA sintasa, el gen *phaA* que dona lloc a una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa i, finalment, el gen *phaB* que codifica per una acetoacetyl-CoA reductasa dependent de NADPH, que té un paper important en la producció de PHA. Tot i així, els diferents microorganismes tenen les seves característiques pròpies per la producció de PHA a causa dels respectius gens implicats en la via de producció del polímers [8]. En la **Figura 9**, es pot observar l'operó *phbCAB* que conté els gens que codifiquen per els enzims essencials per la producció del PHA més estudiat, el polihidroxibutirat (PHB).



**Figura 9.** Els gens de l'operó *phbCAB* codifiquen per tres enzims per la producció de PHB [9].

Pel que fa a la via de biosíntesi, són necessàries dues molècules d'acetil-CoA que per l'acció de l'enzim  $\beta$ -cetotilasa es condensen i donen lloc a una molècula d'acetoacetil-CoA. La segona reacció és la reducció de l'acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA mitjançant una acetoacetil-CoA reductasa dependent de NADPH. Finalment, per l'acció de la PHA sintasa es catalitza l'enllaç èster produint 3-hidroxiacetil-CoA (3HB) [8,9].

Alguns monòmers de PHA es poden generar *in vivo* a partir de fonts de carboni naturals. Per exemple, la glicòlisi, el cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA), la biosíntesi i la degradació d'àcids grassos, la biosíntesi d'aminoàcids, el cicle de Calvin i el cicle de la serina. Altres monòmers són sintetitzats mitjançant vies biosintètiques modificades per enginyeria no natural [7]. Hi ha més de 14 vies diferents de producció de PHA; les vies I–IV són naturals mentre que les V–XIV són fruit de tècniques d'enginyeria genètica. En la via I, el sucre es converteix en acetil-CoA, transformat a acetoacetil-CoA i finalment en 3-hidroxiacetil-CoA, que després es polimeritza. La via II utilitza àcids grassos per convertir-los en R-3-hidroxiacetil-CoA per  $\beta$ -oxidació, donant lloc Mcl després de la polimerització. A la via III, l'acetil-CoA esdevé malonil-CoA, que es converteix en 3-cetoacetil-ACP, que després es transforma en monòmers R-3-hidroxiacetil-CoA, i a la via IV, l'àcid butíric es converteix en S-3-hidroxiacetil-CoA, després a acetil-CoA, que segueix la via I (Fig. 10) [8].

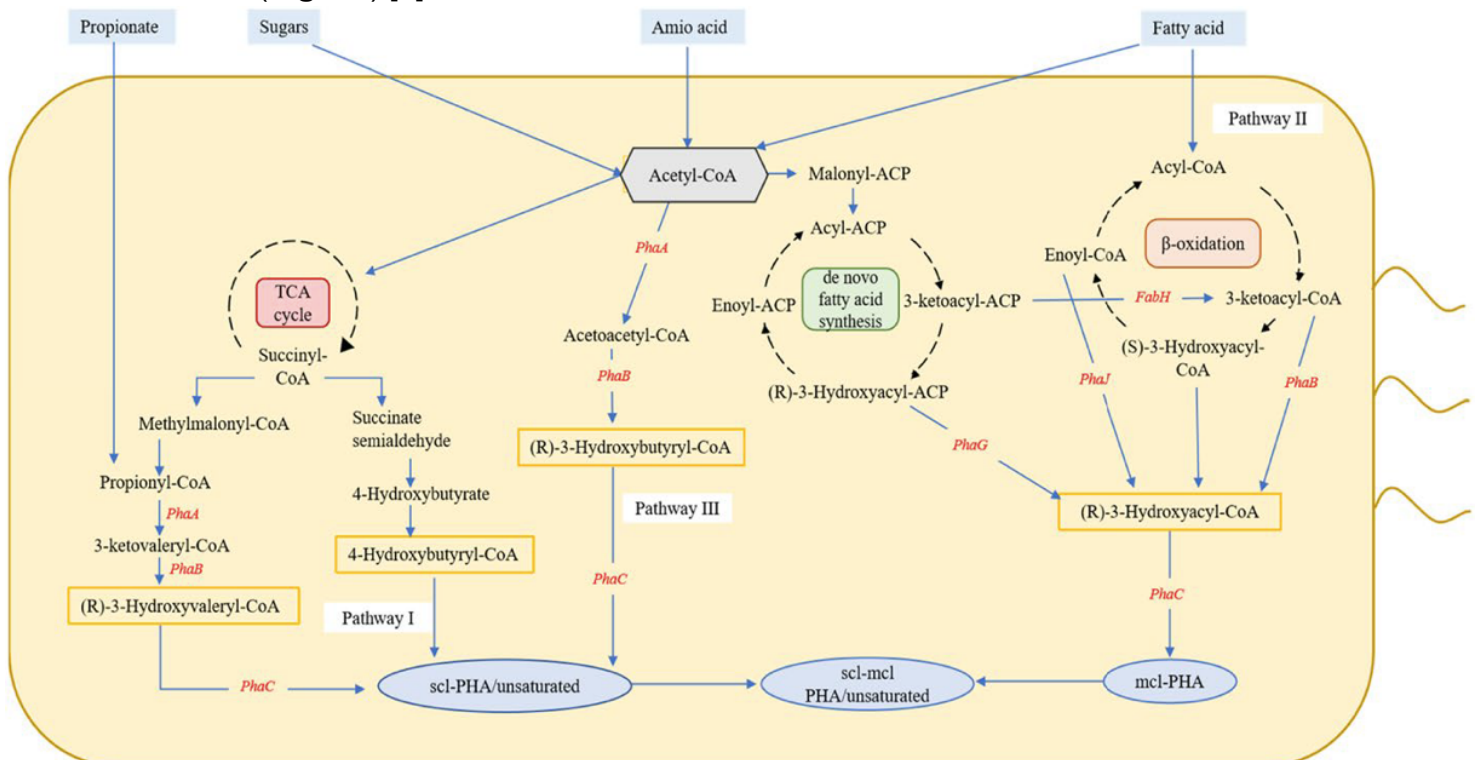
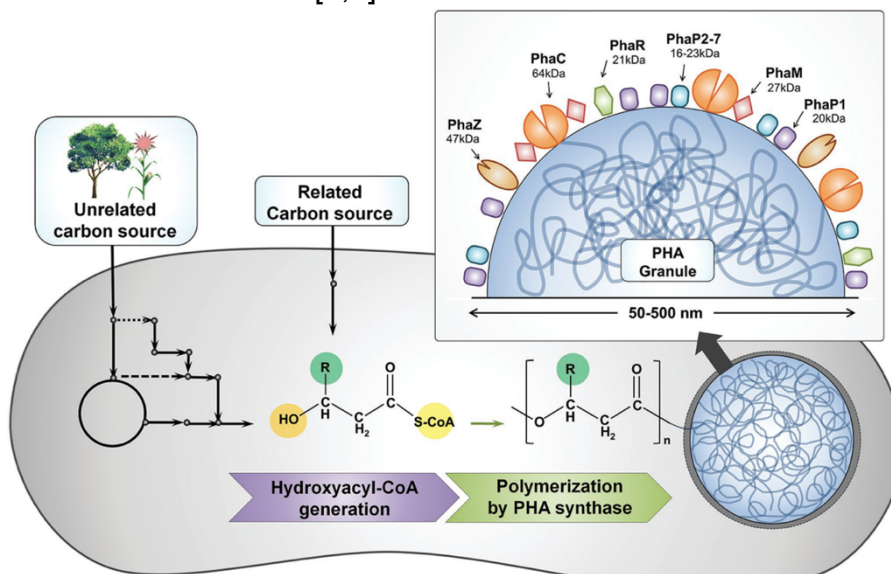


Figura 10. Diferents vies de biosíntesi de PHA que utilitzen diverses biomolècules [8].

Pel que fa a la producció industrial, s'utilitzen fonts de carboni senzilles econòmiques, com la glucosa, la sacarosa o àcids grassos volàtils de diferents residus. Tal i com es comenta anteriorment, la utilització de diferents fonts de carboni provoca diferents monòmers i homopolímers, de manera que si s'utilitzen de manera conjunta s'obtenen copolímers i/o heteropolímers [8].

#### 4.2. Enzims, gens i proteïnes clau

Actualment, s'estan fent grans avenços en la comprensió de les vies metabòliques i dels enzims implicats en la biosíntesi de PHA, la qual cosa, no només ha conduït al coneixement gairebé total dels metabolismes de la biosíntesi, sinó que també dels mecanismes de degradació de PHA. Els PHA existeixen com a incusions citoplasmàtiques i que per tant, estan envoltades de diversos tipus de proteïnes associades a grànuls. Aquestes proteïnes estan implicades en la biosíntesi, degradació, mobilització i estabilització dels PHA. Les més destacades són la PHA sintasa (codificada pel gen *phaC*) que polimeritza hidroxiacil-CoAs en PHA, la PHA despolimerasa (codificada pel gen *phaZ*) i PHA oligòmer hidrolasa (codificada pel gen *phaY*) que degraden PHA; les fasines, grup de proteïnes que tenen funcions estructurals i reguladores en la biosíntesi de PHA i estan implicades en la determinació de la mida i el nombre de grànuls, com *phaP*, *phal*, *phaF*, *apdA*, *GA14* i *mms16*, proteïnes reguladores, com *phaR* i *phaQ* i una proteïna activadora de la PHA sintasa, anomenada *phaM*. Un altre gen implicat en la producció de PHA és el *phaD* que codifica per a la proteïna *phaD*, la qual encara no s'ha trobat una funció, però és essencial per a la producció bacteriana de PHA [7,8].



**Figura 11.** Una representació esquemàtica de la biosíntesi de grànuls de PHA i totes les seves proteïnes [7].

L'enzim clau en la biosíntesis de PHA es la PHA sintasa. Aquesta està associada als grànuls i és responsable de la polimerització, afectant a la composició del monòmer, el seu pes molecular i la productivitat del PHA. Totes les vies de producció de PHA acaben després de la reacció de polimerització, que és catalitzada per les PHA sintases [7]. Les PHA sintases es divideixen en quatre classes diferents: (i) la classe I produeix Scl; (ii) la classe II produeix Mcl; (iii) la classe III té dues subunitats que són phaC/phaE i produeix tant Scl com Mcl; (iv) i la classe IV també tenen dues subunitats que són phaC/phaR i només produeix Scl [8]. La transcripció de phaC està regulada per les proteïnes reguladores codificades per *phaF*, entre d'altres, mentre que l'activació està controlada per la proteïna phaM [8].

## 5. MILLORES PER ARGUMENTAR LA BIOSÍNTESIS DE PHA

Les vies de biosíntesi de PHA i els seus enzims relacionats s'han estudiat àmpliament, especialment les que estan relacionades amb les múltiples vies que condueixen a la formació dels diversos tipus de monòmers. S'han realitzat molts estudis per millorar el flux metabòlic a la síntesi de PHA, com ara el debilitament del cicle de  $\beta$ -oxidació [14,18], la supressió o la repressió de les vies que competeixen pels monòmers PHA mitjançant CRISPRi [12,15–17], la sobreexpressió dels enzims de síntesi de NADH [24] o la construcció de noves vies per a la síntesi de monòmers [22,23], així com diferents estratègies d'augment de la mida cel·lular [19–22]. Tot i així, un dels factors més crítics per la biosíntesis de PHA, és la utilització dels cassets d'expressió en diferents microorganismes. S'han fet molts esforços per augmentar la competitivitat de la producció microbiana mitjançant la biologia sintètica i l'edició del genoma.

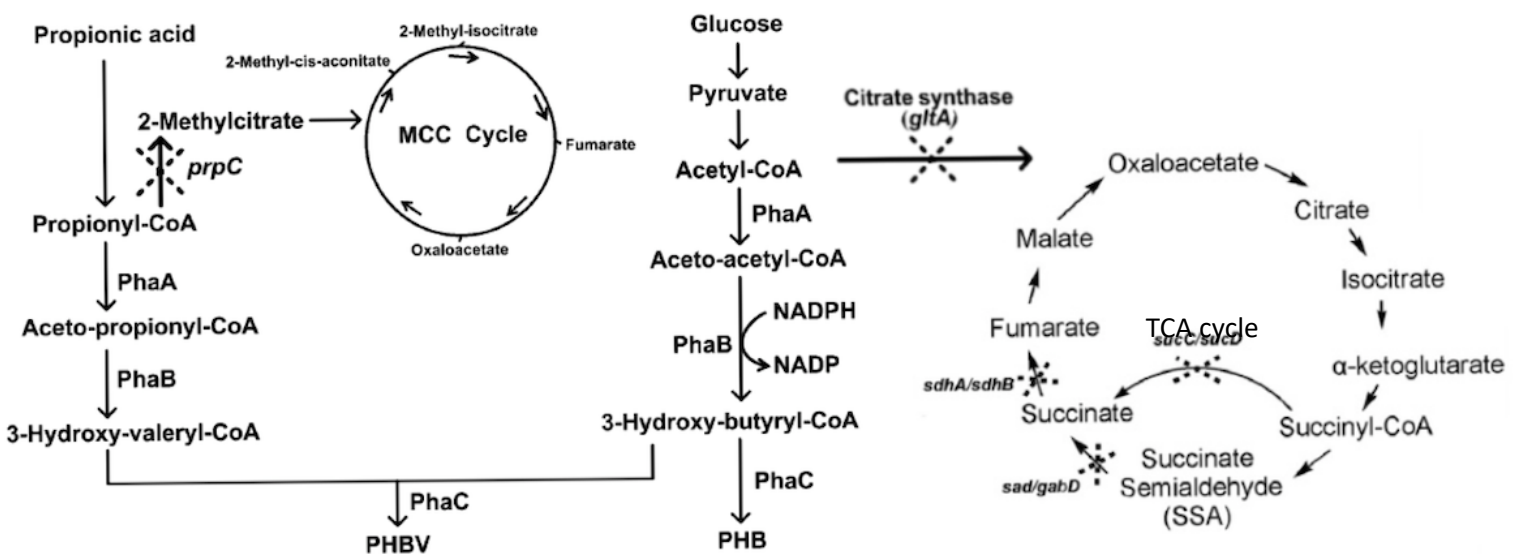
### 5.1. Mètodes d'enginyeria genètica de vies competidores a la síntesi de PHA

Com que la biosíntesi de PHA està competint amb molts altres metabòlits i compostos intermedis, és important eliminar o debilitar les vies competidores perquè es canalitzin més recursos cap a les vies de síntesi de PHA. Un mecanisme per fer-ho és CRISPRi derivat de CRISPR/Cas9. CRISPRi és una tècnica d'edició genòmica que utilitza una proteïna dCas9 que no té activitat endonucleasa per regular els gens de manera guiada per l'ARN. L'especificitat

de l'orientació està determinada per l'aparellament de bases complementària d'un únic ARN guia (sgRNA) al locus genòmic. Aquest s'ha utilitzat amb èxit per dirigir el flux metabòlic a la biosíntesi de PHA. La intensitat de repressió CRISPRi es pot dissenyar modulant la ubicació d'unió dels sgRNA. S'ha demostrat que CRISPRi és molt útil per controlar el flux metabòlic en múltiples vies i ajustar les composicions de PHA [12,15,16,17].

### 5.1.1. Regulació de la via de l'àcid tricarboxílic (TCA) per CRISPRi

*Escherichia coli* és el bacteri per excel·lència per l'edició genètica de manera que es va dissenyar amb ell una metodologia per tenir una via per a la síntesi de poli(3-hidroxi-butirat-co-4-hidroxi-butirat), conegut com a P(3HB-co-4HB). El gen natiu que codifica la succinat semialdehid deshidrogenasa es va expressar sota el control de CRISPRi mitjançant cinc RNA guia (sgRNAs) dissenyats especialment per regular el flux de carboni a la síntesi de 4HB. A més, el succinat, generat per succinil-CoA sintetasa i succinat deshidrogenasa, codificats respectivament pels gens *sucC*, *sucD* i *sdhA*, *sdhB*, es va canalitzar preferentment al precursor 4HB mitjançant l'ús de sgRNAs dissenyats per CRISPRi (Fig. 12). Es va acumular un 18% mols de 4HB i 72% de PHA. Els resultats oscil·laven depenent dels nivells d'expressió dels gens regulats. Els resultats mostren que CRISPRi és un mètode factible per manipular simultàniament múltiples gens a *E. coli* [16].



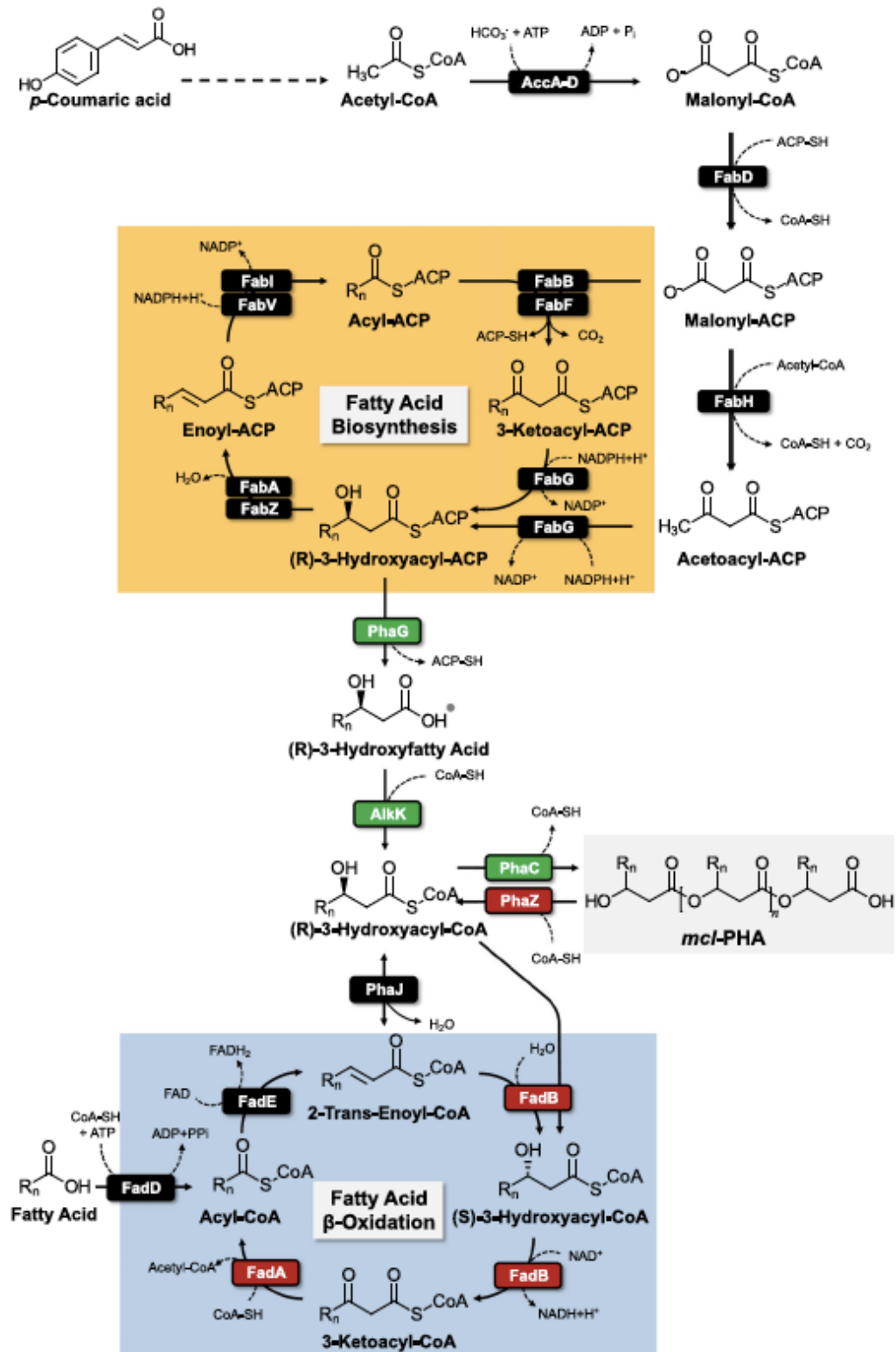
**Figura 12.** Cicle del citrat de metil (MCC) i cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA) amb els seus respectius enzims i intermediaris [16,17].

### 5.1.2. Regulació de la via del citrat de metil (MCC) i TCA per CRISPRi

En un altre estudi, fent servir un microorganisme no model *Halomonas* sp. TD01, es va utilitzar CRISPRi per regular les expressions del gen *prpC* que codifica la 2-metilcitrat sintasa per modular la proporció de monòmers de 3HV en poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerat) (PHBV) (**Fig. 12**). Els percentatges d'3HV en copolímers PHBV eren controlables entre menys de l'1 i el 13%. A més, les repressions sobre el gen *gltA* que codifica la citrat sintasa van canalitzar més acetil-CoA del TCA a la síntesi de PHB. L'acumulació de PHB per *Halomonas* sp. TD01 amb el seu gen *gltA* reprimint en diverses intensitats mitjançant CRISPRi va augmentar aproximadament un 8% en comparació amb el control de tipus salvatge que contenia el vector CRISPRi sense objectiu [17].

### 5.1.3. Regulació de la $\beta$ -oxidació

*Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas entomophila* o *E. coli* utilitzen àcids grassos com a fonts de carboni i energia mitjançant la via de la  $\beta$ -oxidació per proporcionar diversos precursors 3-hidroxi-alcanoics per a la síntesi de PHA. La inhibició o repressió de la via de la  $\beta$ -oxidació mitjançant la supressió de gens relacionats amb la via, ajuda a formar monòmers amb una longitud de cadena igual o superior a la longitud de la cadena dels àcids grassos afegits. Aquestes estratègies han aconseguit produir una àmplia gamma d'homopolímers Mcl, copolímers aleatoris i de bloc [14,18]. En un altre estudi, es van combinar una sèrie d'objectius d'enginyeria metabòlica per millorar la producció de Mcl al cromosoma *P. putida* i es van avaluar en soques que creixien en un compost fenòlic model, àcid p-cumàric, i en corrents de lignina. Concretament, es va eliminar el gen de la PHA despolimerasa, *phaZ*, i es van eliminar els gens implicats en la  $\beta$ -oxidació (*fadBA1* i *fadBA2*). A més, per augmentar el flux de carboni a la biosíntesi de Mcl, es van sobreexpressar *phaG*, *alkK*, *phaC1* i *phaC2* (**Fig. 13**). Es va demostrar un augment del 53% i 200% de la concentració de Mcl (g/L) i un augment del 20% i 100% del rendiment (g Mcl per g de pes sec de cèl·lules) quan s'utilitzaven l'àcid p-cumàric i la lignina, respectivament, en comparació amb la soca de tipus salvatge [18].



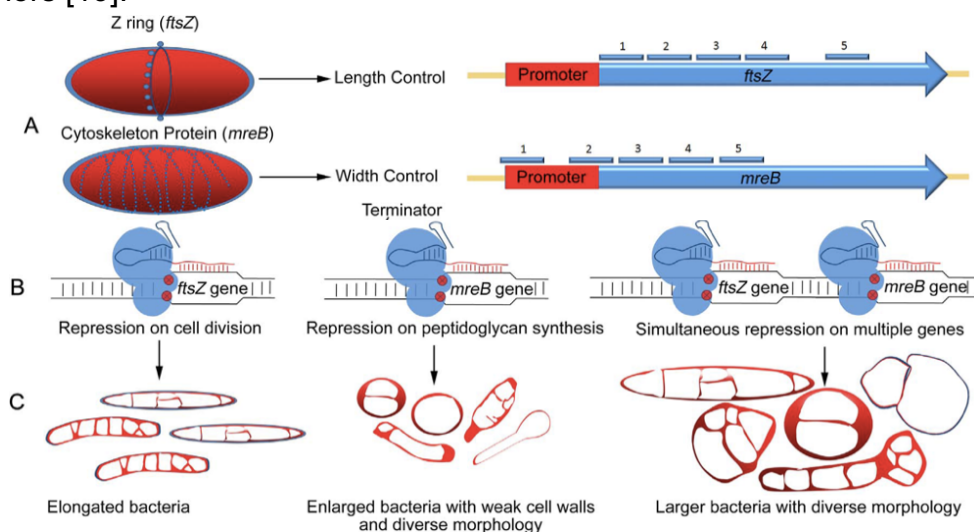
**Figura 13.** La via de producció de *mcl* a *P. putida* KT2440 mitjançant la biosintesi d'àcids grassos i la via de  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos competidors. Els requadres vermells indiquen gens dirigits a la supressió, i els requadres verdes indiquen gens objectiu per a la sobreexpressió [18].

## 5.2. Enginyeria de les mides de les cèl·lules

Com que els PHA són cossos d'inclusió emmagatzemats en petits espais intracel·lulars, la quantitat i la mida dels grànuls de PHA estan limitades pel petit espai intracel·lular, independentment de la quantitat de flux dirigida a la biosíntesi de PHA. Per tant, s'han fet molts esforços per augmentar les mides dels bacteris productors de PHA. L'enginyeria de morfologia microbiana s'ha tornat interessant recentment per a la biotecnologia. Els gens *ftsZ* i *mreB* que codifiquen proteïnes de l'anell de fissió bacteriana i dels esquelets, respectivament, són essencials per al creixement cel·lular. Ambdós són els gens més importants que mantenen les formes bacterianes, inclosa la longitud i l'amplada de la cèl·lula, respectivament [19-22].

### 5.2.1. Augment de la mida i el volum cel·lular per CRISPRi

En un estudi es van dissenyar i sintetitzar cinc sgRNA associats a CRISPRi, respectivament, per orientar cinc ubicacions diferents dels gens *ftsZ* o *mreB* codificats al cromosoma *E. coli*, donant lloc a diversos nivells d'expressió reduïts de *ftsZ* i/o *mreB*, respectivament. Les repressions combinades a les expressions de *ftsZ* i *mreB* van generar bacteris més llargs i més gran amb morfologies diverses que inclouen diverses mides de carabasses, barres, cocs, fusos, multi-angles i el·lipsoïdes (**Fig. 14**). En tots els casos, les acumulacions de PHB intracel·lular van ser directament proporcionals als volums intracel·lulars, oscil·lant entre el 40% i el 80% de PHB en pesos secs de cèl·lules bacterianes, depenent de l'augment dels volums cel·lulars per les aplicacions CRISPRi anteriors [19].

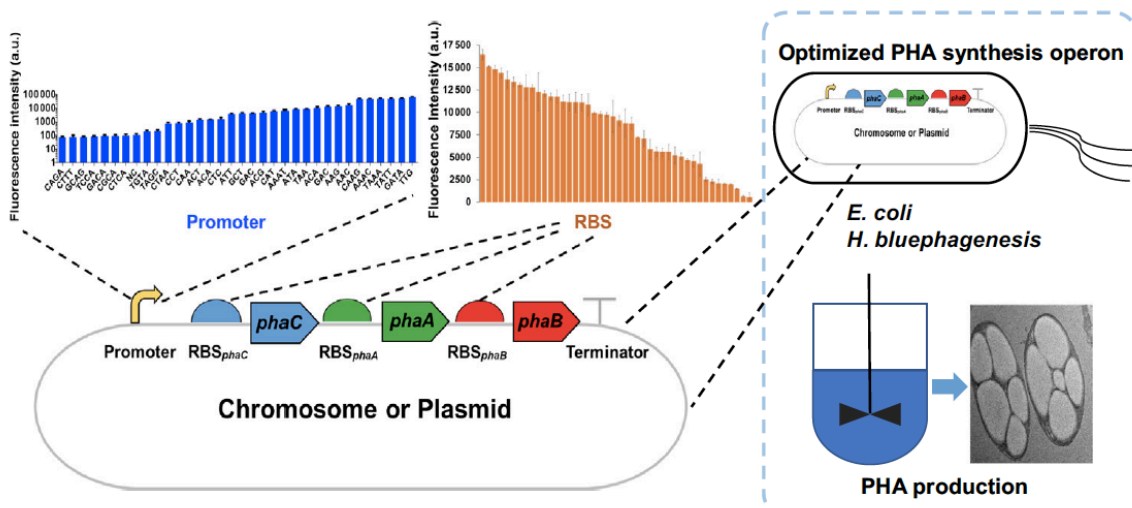


**Figura 14.** Aplicació de CRISPRi per manipular *E. coli* longitud (*ftsZ*) o/i amplada (*mreB*) [19]. (A) La longitud i amplada cel·lular estan controlades pels gens *ftsZ* i *mreB*, respectivament. (B) Mecanisme de CRISPRi per reprimir l'inici i l'allargament de la transcripció. (C) Morfologies canviants d'*E. coli* mitjançant CRISPRi controlant els nivells d'expressió de *ftsZ* o/i *mreB*.

Els resultats aconseguits en *E. coli* s'han transferit amb èxit a *Halomonas campaniensis* més interessant industrialment, que va demostrar millores similars en l'acumulació de PHA. En aquest cas, es va utilitzar un plàsmid sensible a la temperatura que codifica per *ftsZ* i *mreB*. De manera que a 30 °C a una certa densitat, el bacteri *H. campaniensis* LS21 va créixer normal. Quan la temperatura era de 37 °C, es van induir canvis de morfologia mitjançant l'eliminació de *ftsZ* o *mreB*, ja que no s'expressaven. Es va aconseguir un augment del 80% del rendiment de PHB mitjançant *H. campaniensis* LS21 de morfologia controlable manipulada [20].

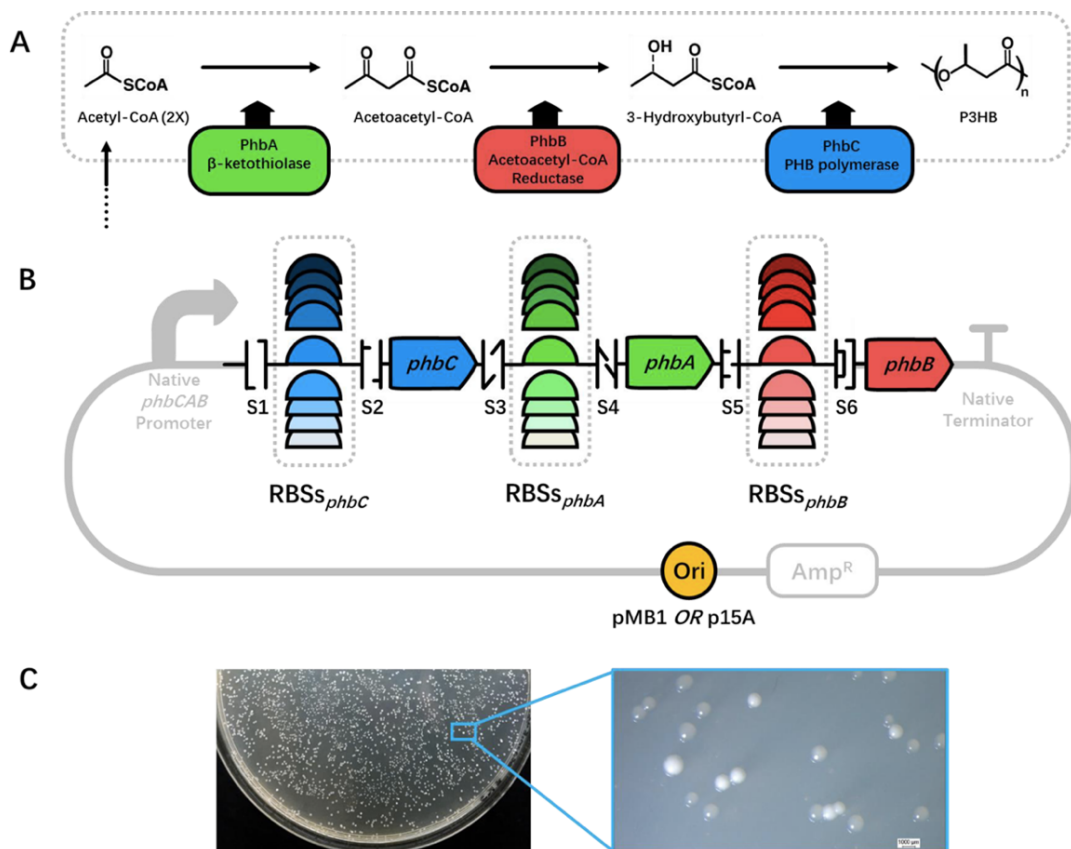
### 5.3. Enginyeria genètica dels promotors i dels llocs d'unió ribosomals (RBS)

Expressar gens relacionats amb la síntesi de PHA, com l'operó *phaCAB* i alguns gens homòlegs, dona lloc a l'acumulació de diferents PHA com per exemple, PHB, PHBV i PHP, així com copolímers dels seus diversos monòmers. Els nivells de transcripció dels gens implicats en la síntesi de PHA afecten significativament la formació del producte. Així doncs, l'optimització de la via mitjançant l'ajust dels nivells d'expressió dels tres gens condueix a una millora en l'acumulació de PHA. Entre les diverses estratègies, s'ha demostrat que és eficient optimitzar els lloc d'unió del ribosoma (RBS) i promotors, mitjançant enginyeria genètica, per regular l'expressió dels gens, ja que tan el promotor com el RBS són claus en el procés de traducció. Primer es dissenyen i construeixen biblioteques de promotors i/o RBS, i després se'n caracteritza la força. Després del càlcul i l'anàlisi, s'utilitza el promotor o el RBS adequat per construir i optimitzar la via sintètica del PHA [15,21].



**Figura 15.** Enginyeria genètica dels RBS i del promotor per a la síntesi millorada de PHA [15].

Un enfoc semi-racional per a l'optimització de la via PHB altament eficient a *E. coli* es va basar en l'ús d'un operó *phbCAB* clonat del productor natiu *R. entrophia*. Es van construir biblioteques RBS dissenyades racionalment per a cadascun dels tres gens a partir de plasmidis de nombre de còpies alt o baix en una reacció mitjançant un mètode d'assemblatge mediat per oligo-enllaçador (OLMA). Les soques amb propietats desitjades es van avaluar i seleccionar mitjançant tres metodologies diferents; la selecció visual, el cribratge d'alt rendiment i l'anàlisi detallada en profunditat (**Fig. 16**). Aplicant aquest enfoc, es van aconseguir soques que acumulaven del 0% al 92% de continguts de PHB en pes sec cel·lular (CDW, de l'anglès *cell dry weight*). També es van produir de manera eficient PHB amb diversos pesos moleculars mitjans (Mw) de pes de  $2.7-6.8 \times 10^6$  en continguts relativament alts. Aquests resultats suggereixen que l'enfoc semi-racional, que combina disseny de biblioteques, construcció i cribratge adequat és una manera eficient d'optimitzar el PHB i altres vies multienzimàtiques [21].



**Figura 16.** Construcció de biblioteques i selecció visual al plat [21]. (A) La via d'acumulació de PHB heteròloga a *E. coli* conté tres enzims que codifiquen tres gens *phbA*, *phbB* i *phbC* a l'operó *phbCAB* clonat a partir de *R. entrophia*. (B) Estructura de la biblioteca de plasmidis OLMA. (C) Selecció visual a la placa.

Els bacteris no model solen preservar vies úniques per als seus productes. Els seus valors es podrien millorar encara més introduint noves vies i afegint un nou control genètic. Per dissenyar microorganismes no models hi ha diversos sistemes d'expressió derivats de fags nous utilitzats per al control transcripcional. En un estudi es van obtenir nous parells de promotors T7 de RNA polimerasa mitjançant l'extracció de genomes de fags, seguit de la caracterització *in vivo* en soques no models *Halomonas* spp TD01 i *P. entomophila*. Es van desenvolupar tres sistemes d'expressió. L'expressió a les biblioteques de promotors T7 corresponents va persistir amb correlacions entre *E. coli* i *Halomonas* sp. TD01, que implica la idoneïtat d'una àmplia gamma d'hostes. A continuació, es van construir tres soques *Halomonas* TD a partir d'aquests sistemes d'expressió que van permetre l'expressió gènica intercanviable i controlable. Una de les soques es va utilitzar per expressar el casset d'allargament cel·lular i la via biosintètica del PHB, donant lloc a un augment de 100 vegades en la longitud cel·lular i alts nivells de producció de PHB (fins a 92% del pes sec cel·lular) [22].

Altrament, *Halomonas bluephagenesis* s'ha desenvolupat com una soca de plataforma per a la biotecnologia industrial de propera generació (NGIB) amb avantatges de resistències a la contaminació microbiana i creixement d'alta densitat cel·lular, especialment per a la producció de PHA inclòs. Els promotors per a l'expressió de gens heteròlegs en *H. bluephagenesis* són força limitats, i molts promotors heteròlegs funcionen de manera anormal en aquesta soca. El  $P_{porina}$ , és un promotor fort de la proteïna porina i un dels pocs promotors disponibles per a l'expressió heteròloga en *H. bluephagenesis*, però té una activitat transcripcional fixa que no es pot ajustar. La porina es va identificar per primera vegada amb una regió promotora bàsica. La mutagènesi de saturació es va dur a terme a la regió central del promotor per augmentar significativament la diversitat dins de la biblioteca del promotor. Es van construir soques de *H. bluephagenesis* que tenien el gen *orfZ* que codifica la transferasa 4HB-CoA impulsada per promotors seleccionats de la biblioteca, la millor produïda amb més de 100 g/L de pes sec de cèl·lules que contenia un 80% de P(3HB-co-11%4HB) amb una productivitat d'1.59 g/L·h després de 50 h de creixement en condicions d'alimentació no estèrils [23].

Un altre estudi a destacar sobre aquest bacteri, va trobar que *H. bluephagenesis* utilitza NADH en lloc de NADPH com a cofactor per a la producció de PHB, revelant així la rara situació d'acumulació de PHA millorada sota limitació d'oxigen. Per augmentar la proporció de NADH/NAD<sup>+</sup> per a l'acumulació de PHA millorada sota la limitació de l'oxigen, una via de transport d'electrons que conté subunitats de la flavoproteïna de transferència d'electrons  $\alpha$  i  $\beta$  codificada per operó *eff* va ser bloquejada per augmentar el subministrament de NADH, el que va portar a un 90% d'acumulació de PHB en el pes sec cel·lular en comparació amb el 84% pel tipus salvatge. L'àcid acètic es va utilitzar juntament amb la glucosa per equilibrar l'estat redox i reduir la inhibició del metabolisme del piruvat, donant lloc a un 22% més de CDW i un 94% d'acumulació de PHB [24].

## 6. MICROORGANISMES SINTETITZADORS DE PHA

### 6.1. Bacteris

Diferents bacteris són capaços de produir diferents formes de PHA segons la seva nutrició i les seves condicions ambientals. Els bacteris són les excel·lents fàbriques per a la producció industrial de PHA a causa del seu ràpid creixement i alta acumulació. Tant els eubacteris com els arqueobacteris poden produir PHA. En general, els bacteris es classifiquen en dos grups diferents segons la condició d'estrès essencial per a la producció de PHA. El primer grup requereix les limitacions dels nutrients essencials amb un excés de fonts de carboni per produir-lo. Els pocs bacteris que pertanyen a aquest grup són *Cupriavidus metallidurans*, *Protomonas extorquens* i *Protomonas oleovorans*, mentre que el segon grup de bacteris no requereix cap requisit de limitació. *Alcaligenes latus* i *E. coli* recombinant pertanyen a aquest grup [8].

En un estudi, es va desenvolupar i optimitzar un procés de fermentació per lots alimentats en un reactor de tanc agitat, per la biosíntesi de poli(3-hidroxidecanoat) (PHD) a partir d'àcid decanoic mitjançant *E. coli* LSBJ recombinant deficient en  $\beta$ -oxidació. Mitjançant optimitzacions iteratives de la composició i la velocitat d'alimentació de substrat, es van convertir 25 g d'àcid decanoic en PHD amb un rendiment molar del 89.4% (20.1 g/L i 0.42 g/Lh) [25].

Tot i així, l'enginyeria genètica recombinant no és la única eina d'edició dels genomes dels microorganismes. A més a més de les tècniques recombinats, també es poden trobar diferents mètodes per millorar el flux metabòlic cap a la síntesi de PHA, el debilitament del cicle de  $\beta$ -oxidació, la supressió o la repressió de les vies que competeixen pels monòmers PHA mitjançant CRISPRi o CRISPR/Cas9, la sobreexpressió dels enzims de síntesi de NADH o la construcció de noves vies per a la síntesi de monòmers, així com diferents estratègies d'augment de la mida cel·lular. *E. coli* tampoc és l'únic bacteri que pot ser sotmès a aquestes modificacions. També s'ha investigat en *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* i *Cupriavidus necator*, també conegut com a *Ralstonia eutropha*.

### 6.1.1. Extremòfils per a la síntesi de PHA

Els bacteris extremòfils, inclosos els acidòfils, els alcalífils, els psicròfils, els termòfils, els xeròfils i els halòfils, així com els metanòtrofs, els substrats gasosos o els usuaris de cel·lulosa, són capaços de créixer en algunes condicions úniques, evitant contaminacions per altres microorganismes. Es poden dissenyar per convertir-se en soques de producció per a la biotecnologia industrial de nova generació (NGIB). Es poden adoptar les estratègies que inclouen la redirecció del flux metabòlic a la síntesi de PHA, l'augment de la mida de les cèl·lules, l'acceleració del creixement cel·lular, la reprogramació de la biosíntesi de PHA CRISPR/Cas9 i l'enginyeria d'altres mecanismes biològics [12].

El P(3HB-co-4HB), es va produir amb èxit mitjançant *H. bluephagenesis* TD01. El gen *orfZ* que codifica 4HB-CoA transferasa de *Clostridium kluyveri* es va integrar al genoma per aconseguir una acumulació de P(3HB-co-4HB) comparable a la de les soques que codifiquen *orfZ* en plasmidis. Els cultius per lots fets en fermentadors de 1000 litres van donar com a resultat un pes sec cel·lular de més de 83 g/L que contenia un 61% de P(3HB-co-16mol%4HB) després de 48 h sota condicions estèrils amb una productivitat d'1.04 g/L·h. Els resultats demostren que l'enginyeria *H. bluephagenesis* TD01 és una soca industrial adequada per a la producció a gran escala en condicions no estèrils [26].

## 6.2. Llevats

S'han utilitzat llevats i plantes per a la producció de polímers. No obstant això, tota la producció industrial de PHA es basa actualment en bacteris, que poden estar associats a certs problemes com la contaminació dels fags del procés d'*E. coli* o la possible presència de lipopolisacàrids en el producte, la qual cosa exclou el seu ús en aplicacions mèdiques. D'altra banda, els llevats tenen una major resistència a la contaminació, un ampli espectre de substrats que inclouen subproductes industrials i el cultiu es pot dur a terme en ambients durs, amb condicions àcides o amb grans quantitats de sucre. La majoria dels estudis sobre llevats s'han dut a terme amb *Saccharomyces cerevisiae*, però, els resultats obtinguts eren insuficients per competir amb els sistemes bacterians [8,13].

*Yarrowia lipolytica* és un organisme GRAS (generalment considerat com a segur) amb grans potencials en biotecnologia industrial. Aquest llevat és naturalment capaç de produir i acumular gran quantitat de lípids (més del 50% del seu pes sec en fermentacions a gran escala). Pel que fa a aquest potencial, aquest llevat s'està convertint en un organisme preferit per a la producció de molts compostos com ara PHA. És naturalment capaç de créixer en diferents substrats (sucres, olis, alcà, glicerol) i recentment s'ha dissenyat per acceptar fonts de carboni econòmiques. Els estudis indiquen que *Y. lipolytica* és eficient en el catabolisme i l'anabolisme dels àcids grassos, que poden ser utilitzats per la  $\beta$ -oxidació de l'àcid gras més tard mitjançant la producció de PHA. La incorporació de la PHA sintasa mostrarà un gran potencial per a la producció de Mcl en comparació amb els altres llevats [27].

En un altre estudi, es va augmentar la síntesi de PHBV en el llevat no convencional *Arxula adenivorans* mitjançant l'estabilització de l'acumulació de polímers mitjançant la modificació genètica i l'optimització de les condicions de cultiu. Una soca d'*A. adenivorans* amb gens de la via PHA sobreexpressats va ser capaç d'acumular un nivell de polímer inesperadament alt [28].

### 6.3. Plantes

La producció de PHA a les plantes és considerablement menys costosa que els sistemes bacterians i llevats, ja que no requereixen una font d'energia externa com l'electricitat per dur a terme la fermentació. A més de ser rendibles, els sistemes de producció de plantes són respectuosos amb el medi ambient i més barates, ja que només requereixen CO<sub>2</sub> i aigua fixats fotosintèticament per produir PHA [8,12]. Dins de la cèl·lula vegetal, el PHA es pot sintetitzar en diferents compartiments, i cadascun d'ells afecta la producció de manera diferent en funció de la disponibilitat d'acetil-CoA. Principalment, es produeix citoplasma, peroxisomes, mitocondris i plàstids. El PHA s'està produint en diverses plantes C3 com *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* o *Nicotiana tabacum* i plantes C4 com *Zea mays*. L'estratègia consisteix en l'enginyeria genètica de plantes utilitzant vectors que porten la maquinària genètica per permetre la producció de PHA per part de la planta hoste. El nivell més alt de PHA acumulat en una planta és de fins a un 40% de la fulla seca d'*A. thaliana* [29].

La producció de PHA no és tan ràpid a les plantes com el sistema microbià, però és molt més rendible. Pel que fa a la limitació principal, la producció de PHA per unitat de temps és molt lenta. Un altre problema, són les hectàrees de camp que requereixen i tota la feina que comporten. Per tant, calen més investigacions per assolir productivitats que puguin fer que aquesta alternativa sigui comercialment viable a gran escala [8,13,29].

### 6.4. Microalgues

Les microalgues pertanyen a un grup heterogeni de microorganismes fotosintètics, gramnegatius i pigmentats. Poden ser eucariotes o procariotes. Les microalgues tenen la capacitat de desenvolupar-se ràpidament en condicions adverses a causa de la seva estructura cel·lular simple. Només necessiten llum, nutrients inorgànics i aigua per créixer, de manera que són bioreactors fotosintètics microscòpics en si mateixes. Per tant, és redueix el cost de producció [8,30].

En un estudi utilitzant microalgues, es van construir i caracteritzar les soques de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que sobreexpressaven els gens *pha* per a la producció de PHB. Aquestes soques van mostrar taxes de creixement lleugerament reduïdes. En condicions de privació de N, les soques que sobreexpressen (OE) *phaAB*, *phaEC* i *phaABEC* van mostrar continguts de PHB significativament més alts que el tipus salvatge. El contingut màxim de PHB, un augment de 2.6 vegades que produeix un 26% de PHB pes sec cel·lular, es va observar a les cèl·lules OE *phaAB* cultivades durant 9 dies en medi privat de N. En aquesta condició, aquestes cèl·lules *phaAB* OE van augmentar la producció de PHB al 35% de PHB pes sec cel·lular després d'afegir un 0.4% (p/v) d'acetat [31].

Tot i ser el substrat econòmic, les microalgues encara no estan involucrades en la producció comercial a gran escala. Una de les raons és la seva baixa taxa de creixement en comparació amb els bacteris, la qual cosa redueix la producció de PHA per unitat de temps. Per tant, els PHA derivats de les microalgues encara no es produeixen amb finalitats comercials, però es poden augmentar mitjançant la promoció del seu ús integrat juntament amb la producció de múltiples productes per reduir el preu actual dels PHA, i contribuirà a la indústria del bioplàstic a llarg termini [8].

## 7. RESULTATS

En base a la informació compilada dels articles seleccionats a la cerca bibliogràfica, a continuació, s'exposen alguns dels resultats més rellevants d'estudis sobre la producció de PHA. Com s'observa a la Taula 2, hi ha diverses maneres de produir PHA en diferents tipus de bacteris.

**Taula 2.** Tècniques d'edició del genoma en diferents microorganismes per la producció de PHA. (Creació pròpia).

TÈCNICA D'EDICIÓ	MICROORGANISME	DISSENY EXPERIMENTAL	RESULTATS	REF
<b>Regulació de la via TCA per CRISPRi</b>	<i>E. coli</i> S17-1	<p>Es van escollir cinc gens de la via TCA per estudiar els efectes de la seva sobre la producció de P(3HB-co-4HB):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>sdhA</i> i <i>sdhB</i> (succinat deshidrogenasa).</li> <li>- <i>sucC</i> i <i>sucD</i> (succinil-CoA sintetasa).</li> <li>- <i>sad</i> (succinat semialdehid deshidrogenasa).</li> </ul> <p>En combinar l'orientació dels sgRNAs, es va generar un plasmidi regulador.</p>	<p>La soca <i>E. coli</i> pot regular a la baixa els nivells d'expressió gènica; es va acumular 18% mols de 4HB i 72% de PHA, tot i que aquestes cèl·lules van créixer lentament.</p>	16

<b>Regulació de les vies MCC i TCA per CRISPRi</b>	<i>Halomonas</i> sp. TD01	<p>Dos aproximacions es van dur a terme en aquest estudi.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Es van dissenyar set sgRNAs al llarg del gen <i>prpC</i> (2-metilcitrat sintasa) regulant el MCC.</li> <li>- Es van dissenyar quatre sgRNA dirigits a <i>gltA</i> (citrat sintasa) regulant el TCA.</li> </ul>	<p>Es va acumular un 75% de pes sec cel·lular de PHBV. Variant el percentatge de 3HV del 1 al 13% depenent de la intensitat de la repressió <i>prpC</i>.</p> <p>L'acumulació de PHB va augmentar un 8% quan es va utilitzar CRISPRi per regular el gen <i>gltA</i>.</p>	17
<b>Augment de la mida cel·lular per CRISPRi</b>	<i>E. coli</i> JM109	<p>Per mesurar el canvi dels volums i de les mides bacterianes, es va coexpressar l'operó <i>phbCAB</i> juntament amb plasmidis CRISPRi que regulen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- El gen <i>ftsZ</i> (formació d'anell de fissió) dirigits per cinc sgRNAs.</li> <li>- El gen <i>mreB</i> (control de la mida) dirigits per cinc sgRNAs.</li> </ul> <p>Els dos gens combinats.</p>	<p>La repressió combinada dels gens <i>ftsZ</i> i <i>mreB</i> va provocar una acumulació de PHA del pes sec cel·lular del 81%. Les cèl·lules van augmentar la seva mida tant en longitud com en amplada. Tanmateix, el creixement de les cèl·lules d'<i>E. coli</i> va ser més lent.</p>	19

<b>Enginyeria genètica (Operó phbCAB)</b>	<i>E. coli</i> Mach1 T1	<p>Construcció d'una biblioteca de la via PHB amb tres grups de llocs d'unió ribosomals (RBS) seqüència amunt de tres gens <i>phbCAB</i> mitjançant el mètode OLMA.</p> <p>La biblioteca es va construir a partir de: un plasmidi de nombre de còpies alt i un plasmidi de nombre de còpies baix.</p>	<p>Aplicant aquest enfocament, es van aconseguir soques que acumulaven 0%-92% de continguts de PHB en pes sec cel·lular. També es van produir de manera eficient PHB amb diversos pesos moleculars mitjans (Mw) de <math>2.7-6.8 \times 10^6</math> en continguts relativament alts.</p>	21
<b>Enginyeria genètica de promotors (NGBI)</b>	<i>H. bluephagenesis</i>	<p>Construir una biblioteca promotora basada en la regió central de <math>P_{porin}</math> mitjançant una mutagènesi de saturació. Es van construir soques de que contenen el gen <i>orfZ</i> que codifica la transferasa 4HB-CoA impulsada per promotors seleccionats de la biblioteca.</p>	<p>Es van produir més de 100 g/L de pes sec cel·lular que contenen un 80% de poli(3-hidroxi-butirat-co-11% mol de 4-hidroxi-butirat) amb una productivitat d'1,59 g/L/h.</p>	23
<b>Augmentar NADH/NAD+</b>	<i>H. bluephagenesis</i> <i>TD01</i>	<p>Per augmentar la relació NADH/NAD<sup>+</sup>, es va bloquejar una via de transport d'electrons que contenia subunitats de flavoproteïnes de transferència d'electrons <math>\alpha</math> i <math>\beta</math> codificades per l'operó <i>etf</i>.</p>	<p>Van augmentar la proporció de 3HV en el seu copolímer PHBV del 4% al 8% CDW, 4HB en el seu copolímer P34HB del 8% al 12% CDW.</p>	24

A continuació, a la **Taula 3**, s'exposen els diferents organismes capaços de produir PHA, diferents estudis d'edició genòmica, així com les característiques avantatjoses i destacables, i també els seus inconvenients.

**Taula 3.** *Microorganismes productors de PHA per diferents vies. (Creació pròpia).*

ORGANISME	MECANISMES D'EDICIÓ	RESULTATS	CARACTERÍSTIQUES DESTACABLES	INCONVENIENTS	REF
<b>Bacteri</b> <i>P. putida</i> KT2440	Eliminar la despolimerització de Mcl, disminuir el flux d'intermedis i augmentar el flux de carboni. Eliminant els gens <i>phaZ</i> , <i>fadB</i> i <i>fadA</i> i sobreexpresant els gens <i>alkK</i> , <i>phaC1</i> i <i>phaC2</i> .	Va demostrar un augment del 53% i 200% del concentració de Mcl (g/L) i un augment del 20% i 100% del rendiment (g Mcl per g de CDW) de l'àcid p-cumàric i la lignina, respectivament, en comparació amb la soca de tipus salvatge.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Els bacteris són les excel·lents fàbriques a causa del seu ràpid creixement i alta acumulació de PHA.</li> <li>- Diferents tècniques d'edició del genoma per augmentar la producció de PHA.</li> <li>- Gran diversitat d'espècies.</li> <li>- Mecanisme moleculars coneguts.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contaminació per fags.</li> <li>- Possible presència de lipopolisacàrids en el producte.</li> </ul>	18

<p><b>Bacteri Extremòfil</b>  <i>H. bluephagenesis</i>          TD01</p>	<p>Es va utilitzar el sistema T7- per ajustar l'expressió <i>orfZ</i> que codifica per la 4HB-CoA transferasa de <i>Clostridium kluyveri</i>.</p>	<p>83 g/L CDW que contenen un 61% de P(3HB-co-16mol%4HB) amb una productivitat d'1.04 g/Lh.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Créixer en condicions úniques, evitant contaminacions per altres microorganismes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poca recerca en aquest tipus de microorganismes.</li> <li>- Rutes metabòliques complexes i úniques.</li> </ul>	<p>27</p>
<p><b>Llevats</b>  <i>A. adenivorans</i></p>	<p>Sobreexpressió del gen de la <math>\beta</math>-cetotiolasa, gens de l'acetoacetil-CoA reductasa, de la PHA sintasa i fasines mitjançant un plasmid.</p>	<p><i>A. adenivorans</i>, és capaç de produir un 52.1% de CDW de PHBV (10.8 g/L) amb un 13.2% mol de PHV en matràs agitador i un 15.3% de CDW de PHBV (11.6 g/L ) amb 23.1 % mol de PHV en un bioreactor alimentat per lots.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Major resistència a la contaminació.</li> <li>- Ampli espectre de substrats que inclouen subproductes industrials.</li> <li>- Poden créixer en ambients amb diverses característiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pocs estudis en aquest àmbit.</li> </ul>	<p>29</p>

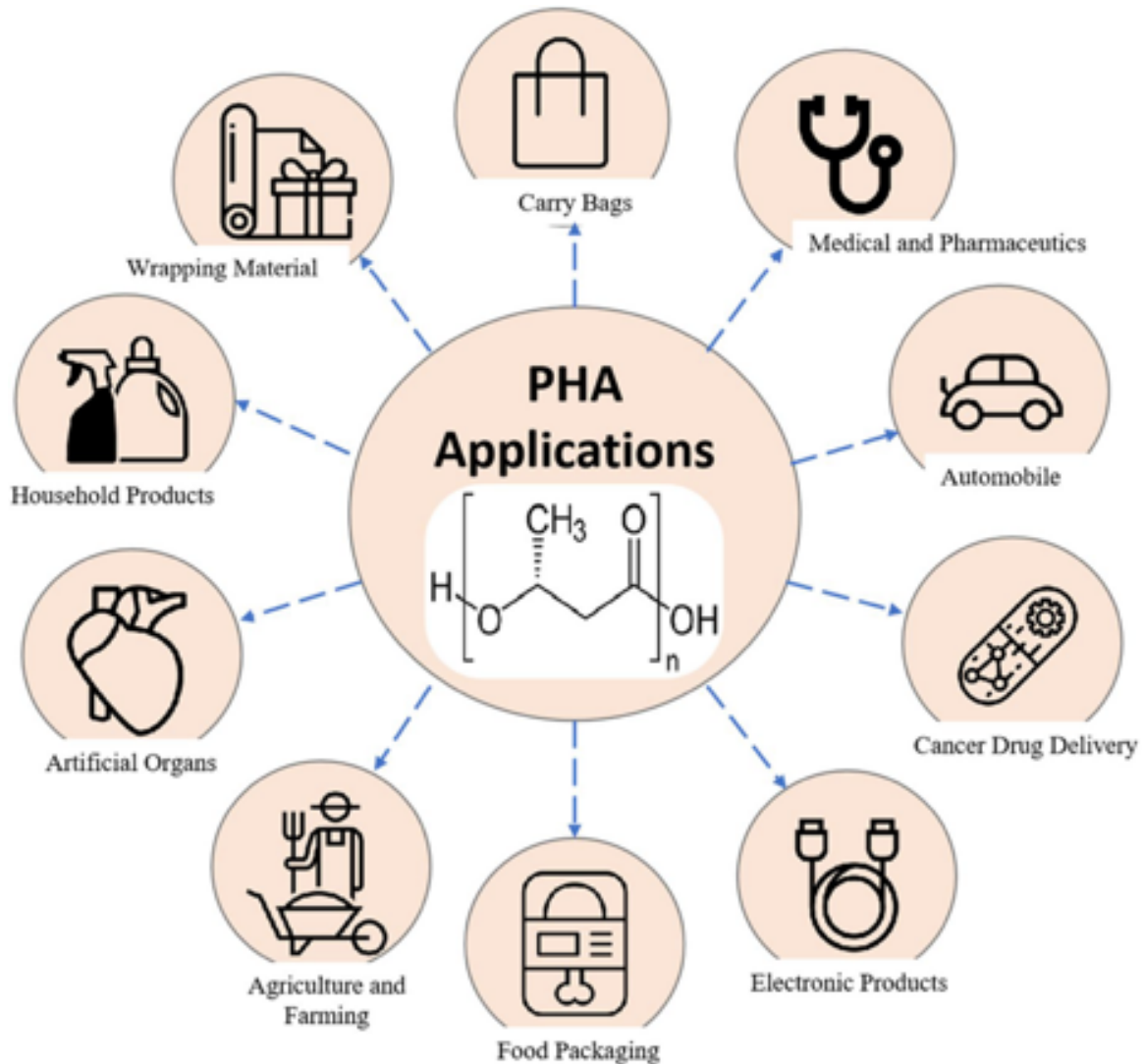
<p><b>Plantes</b> <i>A. thaliana</i></p>	<p>Expressen els tres enzims que codifiquen la ruta biosintètica al polihidroxibutirat (PHB).</p>	<p>Aquestes plantes acumulaven més del 4% del seu pes fresc (aproximadament el 40% del seu pes sec) en forma de PHB en cloroplasts de fulles.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menys costós, ja que no requereixen una font d'energia externa com l'electricitat per dur a terme la fermentació.</li> <li>- Respectuosos amb el medi ambient i barates, només requereixen CO<sub>2</sub> i aigua.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Producció i creixement lent.</li> <li>- Molt terreny per la plantació.</li> <li>- Problemes amb insectes, plagues i condicions meteorològiques.</li> <li>- Manca d'investigació.</li> </ul>	<p>30</p>
<p><b>Microalgues</b> <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</p>	<p>Doble recombinació homolga de tres plàsmids que contenen <i>phaAB</i>, <i>phaEC</i> o <i>phaABEC</i>.</p>	<p>La sobreexpressió de <i>phaA</i> i <i>phaB</i> va donar com a resultat el nivell més alt de PHB (35% de PHB CDW) en la soca sobreexpressió cultivada en medi privat de N suplementat amb acetat.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es desenvolupen ràpidament en condicions adverses.</li> <li>- Estructura cel·lular simple.</li> <li>- Només necessiten llum, nutrients inorgànics i aigua per créixer.</li> <li>- Poc cost de producció.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa taxa de creixement.</li> </ul>	<p>31</p>

La producció de PHA per diferents organismes és una alternativa eficaç respecte els plàstics convencionals, aquesta majoritàriament estudiada en bacteris demostra que mitjançant tècniques d'enginyeria genètica, es possible augmentar el rendiment de diferents microorganismes a nivells extremadament alts. D'altra banda, també hi ha estudis en plantes, microalgues i llevats, aquests presenten diverses avantatges respecte els bacteris. En el cas de les microalgues i les plantes, abarateixen molt els costos ja que aquestes només necessiten llum, nutrients inorgànics i aigua per créixer. En el cas dels llevats, és la seguretat els que els fa interessants. Pel que fa a les tècniques d'edició també hi ha una gran diversitat de metodologies que es poden seguir cadascuna aportant les seves característiques destacables. En aquest cas, CRISPRi, actualment està sent un dels més utilitzats, gracies a la seva tecnologia actual de regulació de diferents gens.

La literatura experimental suggereix que hi ha estudis esperançadors pel que fa a la síntesi de PHA. Tot i així, són necessaris estudis exhaustius, amb diferents microorganismes i utilitzant diferents tècniques d'edició genètica, però a la vegada, es fonamental, seguir millorant els organismes amb una major producció i avaluar-los en plantes pilot per veure com es desenvoluparien en condicions industrials.

## 8. APLICACIONS

A causa de la seva biocompatibilitat, biodegradabilitat i les característiques tan semblants als plàstics derivats del petroli, els PHA s'estan utilitzant àmpliament en molts camps (**Fig.17**) [10]. Tot i així, els PHA han recorregut un llarg camí per utilitzar-se com a material d'emalatge per a productes alimentaris, agricultura, productes per a la llar, aplicacions mèdiques i productes farmacèutics. Des de la introducció del plàstic biodegradable al mercat, aquest està en un auge constatat, sobretot al llarg dels últims anys degut al canvi progressiu de consciència dels efectes perjudicials dels residus plàstics que es generen cada any i de les estrictes normes reguladores i polítiques implementades arreu del món. Entre tots, Europa ocupa la major part del mercat PHA, acompanyada d'Amèrica del Nord i Àsia-Pacífic. L'augment d'utilització de PHA en els diversos sectors està impulsat ja que, la gent està avançant cap a productes més sostenibles i ecològics i evitant l'ús de plàstic d'un sol ús [8].



**Figura 17.** Diferents sectors on s'utilitza PHA [8].

### 8.1. Aplicacions d'embalatge

La indústria de l'embalatge és responsable de consumir més del 40% del total de plàstics produïts, dels quals els envasos d'aliments en representen aproximadament la meitat [2,7]. El PHA s'utilitza per envasar aliments siguin productes de curta durada com ara sucres, fruites i verdures com de productes de llarga vida com aperitius i aliments secs. La biodegradabilitat del PHA el converteix en una opció excel·lent per a la indústria de l'envasament d'aliments. A més a més, també s'utilitzen altres productes d'un sol ús, com ara estris de menjar, tasses, plats, cobrteria i bosses de transport [8].

## 8.2. Aplicacions mèdiques

Els PHA han rebut molta atenció a la indústria de materials mèdics i terapèutics a causa de la seva biocompatibilitat, biodegradabilitat, la insignificant o nul·la resposta inflamatòria, la permeabilitat als nutrients i fàrmacs i la absència de citotoxicitat. En diversos estudis, s'ha observat que els PHA són candidats gairebé ideals per a les seves aplicacions mèdiques [7]. Fins ara, molts estudis han informat que el PHA és prometedor en una àmplia gamma d'aplicacions mèdiques, com ara la regeneració neuronal, òrgans artificials, vàlvules cardíaques, apòsits per ferides, dispositius mèdics, sutures quirúrgiques, reparació de teixit ossi, reparació de cartílags, plaques de fixació de fractures òssies, pegats de reparació, pegats cardiovasculars, agulles ortopèdiques, barreres d'adhesió, dispositius de reparació/regeneració de teixits guiats, dispositius de reparació de cartílags articulars, guies nervioses, pastilles recobertes, sistema de lliurament de fàrmacs per a la teràpia contra el càncer i vacunes [7,8,10]. A més, els altres residus mèdics, com ara nanses, paquets, tubs, xeringues i mascaretes, que es descarten estan fets d'un polímer biodegradable com el PHA, reduint l'acumulació de residus al medi ambient [8]. El PHA per excel·lència en aquestes aplicacions és el PHB, ja que aquest en petites quantitats s'està produint i metabolitzant al cos humà, de manera que és altament compatible amb cèl·lules i teixits. Per tant, es pot utilitzar en implants quirúrgics, sutures i fils de costura per a la reabsorció pel cos [8].

## 8.3. Aplicacions agrícoles

En el sector agrícola, el PHA s'està utilitzant com a tests de plantes, ja sigui per les plàntules inicials o tests normals. Les plantes en test es poden plantar directament al sòl, i el test es degradat pels microbis del sòl. També s'utilitzen en bosses de cultiu, així com el producte per controlar l'alliberament de fertilitzants. Aquests s'encapsulen per resines de PHA, i per la lenta degradació, els fertilitzants s'alliberen en quantitat controlada. Aquesta pràctica evita el malbaratament de fertilitzants pel procés de lixiviació, i tots els nutrients són consumits per la planta, fent-la molt més eficient que les pràctiques tradicionals [8].

## 9. CONCLUSIONS

La cerca bibliogràfica evidencia que les tècniques d'edició del genoma i els diferents microorganismes poden augmentar la producció de PHA.

- Els bacteris són els microorganismes els quals s'ha fet més investigació en aquest àmbit. Hi ha un ampli ventall de tècniques d'enginyeria genètica, de les quals destaquen per la majoria d'estudis, la sobreexpressió dels gens que codifiquen per la biosíntesis i la innovadora eina biotecnològica CRISPRi.
- La regulació de l'expressió genètica per CRISPRi és una alternativa prometedora que dona molts bons resultats en organismes com *E. coli* o *Halomonas* sp.
- L'organisme model per excel·lència és *E. coli* en la que s'han obtingut altes quantitats de PHA. Però recentment, *H. bluephagenesis* s'ha desenvolupat com una soca de plataforma per a la biotecnologia industrial de propera generació (NGIB), de manera que ha obert la porta a nous estudis i noves tècniques amb alta eficiència en la producció de PHA.
- Les tècniques d'enginyeria genètica com, debilitament del cicle de  $\beta$ -oxidació, la supressió o la repressió de les vies que competeixen pels monòmers PHA mitjançant CRISPRi o CRISPR/Cas9, la sobreexpressió dels enzims de síntesi de NADH o la construcció de noves vies per a la síntesi de monòmers, així com diferents estratègies d'augment de la mida cel·lular, donen resultats esperançadors per fer front a la Edat de Plàstic.
- Respecte als microorganismes, els bacteris segueixen sent els principals productors de PHA, tot i la gran quantitat d'estudis que s'han fet en plantes, llevats i microalgues.
- Aquest dos últims, tenen característiques destacables i s'han obtingut bons resultats.
- Encara falten estudis i optimització industrial en plantes pilot a més microorganismes modificats genèticament per les diferents tècniques d'edició. Alçant el PHA si que sigui un competidor directe als plàstic convencionals.

## 10. PERSPECTIVES DE FUTUR

En una perspectiva futura, el món té una necessitat crítica de canviar al plàstic biodegradable tan aviat com sigui possible, i la resposta són PHA, entre moltes altres bioalternatives. D'una manera o d'una altra, els humans no som capaços de degradar ni reciclar amb èxit els residus del planeta. Fins i tot si hi hagués un canvi complert i immediat cap als bioplàstics, ja que els problemes creats pel plàstic convencional, només podrien quedar alleugerats [8].

Les recents legislacions i regulacions contra l'ús de productes plàstics han estat revitalitzant el desenvolupament de substituïts dels plàstics convencionals no biodegradables. Els PHA són una d'aquestes alternatives però un dels majors reptes en la comercialització a gran escala és l'alt cost de producció. Tanmateix, l'interès i la demanda creixents de plàstics biodegradables conduiran a una major optimització dels processos de producció per reduir el preu. No només els processos de producció són cars, el preu es determina pel substrat, els mètodes de refinament i purificació, el manteniment del bioreactor, entre d'altres [8,10].

Aquest problema de costos de producció es pot alleujar utilitzant millors soques, estratègies de producció rendibles i la utilització de fonts de carboni barates. Una de les alternatives actualment en desenvolupament és la capacitat de certs bacteris d'utilitzar directament la biomassa lignocel·lulòsica com a matèria primera de carboni per a la producció industrial de PHA. Aquesta metodologia es un pas cap als processos de producció econòmics. A més, per reduir el cost de producció, s'està practicant la utilització de residus de diferents indústries per la producció d'aquests polímers [8].

Una altre branca en desenvolupament és la utilització de diversos microorganismes i diferents tècniques d'edició del genoma per produir PHA de manera molt més eficient. Dintre d'aquests microorganismes destaquen els estudis fent en plantes, llevats, microalgues i bacteris. De moment, les soques bacterianes són les més preferides per a la producció.

Paral·lelament, l'avenç en eines biotecnològiques com CRISPR/Cas9 permetrà en un futur diverses modificacions genètiques per augmentar encara més el rendiment i la diferent composició monomèrica per als polímers. La construcció de les noves vies de biosíntesi podrà ajudar a reduir el cost de producció, ja sigui

sobreexpressant els gens per millorar encara més la biosíntesi, alterant els compartiments cel·lulars per augmentar la capacitat de manteniment de PHA o modificant les soques per produir PHA extracel·lular.

Els PHA són essencials per el futur del planeta tot i que encara s'ha d'estendre el seu ús. Aquests, no només provocaran un canvi cap a un món més sostenible sinó que a més aportaran oportunitats a diferents sectors i milloraran la mentalitat de la comunitat a favor d'utilitzar més plàstics biodegradables.

Un altre factor dels seus alts preus és la manca d'alta competència en el sector. L'entrada al mercat de més empreses productores de bioplàstics ajudarà a reduir el cost i augmentarà la participació activa cap a l'ús del bioplàstic al màxim possible. L'expansió de la diversitat de productes basats en bioplàstics aportarà a la comunitat local una alternativa biodegradable als plàstics derivats del petroli, exemple d'aquests productes poden ser bosses a base de bioplàstics, papers de bombolles, estris de cuina, roba, accessoris i altres productes d'aquest tipus que influeixen en la generació jove cap a un major consum dels productes a base de bioplàstics. Un cop que PHA es torni més assequible tan econòmicament com físicament, és probable que el plàstic derivat del petroli es substitueixi completament [8].

L'àmplia investigació en els microorganismes i les tècniques d'edició per augmentar la biosíntesi de PHA pot fer possible el canvi complet al bioplàstic en els propers anys. El planeta i els recursos naturals deixaran d'existir en algun moment si no es posa fre. El canvi complet al bioplàstic és l'única opció que queda.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- 1) Narancic, Tanja, and Kevin E. O'Connor. 2019. "Plastic Waste as a Global Challenge: Are Biodegradable Plastics the Answer to the Plastic Waste Problem?" *Microbiology (United Kingdom)*. Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000749>.
- 2) PlascticsEurope. n.d. "Plastics-the Facts 2021 An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data."
- 3) Ferreira-Filipe, Diogo A., Ana Paço, Armando C. Duarte, Teresa Rocha-Santos, and Ana L.Patrício Silva. 2021. "Are Biobased Plastics Green Alternatives?—A Critical Review." *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph18157729>.
- 4) Sheldon, Roger A., and Michael Norton. 2020. "Green Chemistry and the Plastic Pollution Challenge: Towards a Circular Economy." *Green Chemistry*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0gc02630a>.
- 5) Koller, Martin. 2017. "Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production." *Bioengineering*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4040088>.
- 6) Coppola, Gerardo, Maria Teresa Gaudio, Catia Giovanna Lopresto, Vincenza Calabro, Stefano Curcio, and Sudip Chakraborty. 2021. "Bioplastic from Renewable Biomass: A Facile Solution for a Greener Environment." *Earth Systems and Environment*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s41748-021-00208-7>.
- 7) Choi, So Young, In Jin Cho, Youngjoon Lee, Yeo Jin Kim, Kyung Jin Kim, and Sang Yup Lee. 2020. "Microbial Polyhydroxyalkanoates and Nonnatural Polyesters." *Advanced Materials*. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adma.201907138>.
- 8) Bhola, Shivam, Kanika Arora, Saurabh Kulshrestha, Sanjeet Mehariya, Ravi Kant Bhatia, Parneet Kaur, and Pradeep Kumar. 2021. "Established and Emerging Producers of PHA: Redefining the Possibility." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03626-5>.
- 9) Reddy, CSK, R Ghai, and VC Kalia. n.d. "Polyhydroxyalkanoates: An Overview."

- 10) Raza, Zulfiqar Ali, Sharjeel Abid, and Ibrahim M. Banat. 2018. "Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, Production, Recent Developments and Applications." *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>.
- 11) Zhao, Huimin, and An-Ping Zeng. n.d. "Synthetic Biology-Metabolic Engineering." <http://www.springer.com/series/10>
- 12) Chen, Guo Qiang, and Xiao Ran Jiang. 2018. "Engineering Microorganisms for Improving Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis." *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.008>.
- 13) Jambunathan, Pooja, and Kechun Zhang. 2016. "Engineered Biosynthesis of Biodegradable Polymers." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1785-z>.
- 14) Zheng, Yang, Jin Chun Chen, Yi Ming Ma, and Guo Qiang Chen. 2020. "Engineering Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHA) for Diversity and Cost Reduction." *Metabolic Engineering*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.004>.
- 15) Zhang, Xu, Yina Lin, Qiong Wu, Ying Wang, and Guo Qiang Chen. 2020. "Synthetic Biology and Genome-Editing Tools for Improving PHA Metabolic Engineering." *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.10.006>.
- 16) Lv, Li, Yi Lin Ren, Jin Chun Chen, Qiong Wu, and Guo Qiang Chen. 2015. "Application of CRISPRi for Prokaryotic Metabolic Engineering Involving Multiple Genes, a Case Study: Controllable P(3HB-Co-4HB) Biosynthesis." *Metabolic Engineering* 29 (May): 160–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.013>.
- 17) Tao, Wei, Li Lv, and Guo Qiang Chen. 2017. "Engineering Halomonas Species TD01 for Enhanced Polyhydroxyalkanoates Synthesis via CRISPRi." *Microbial Cell Factories* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0655-3>.
- 18) Salvachúa, Davinia, Thomas Rydzak, Raquel Auwae, Annette de Capite, Brenna A. Black, Jason T. Bouvier, Nicholas S. Cleveland, et al. 2020. "Metabolic Engineering of Pseudomonas Putida for Increased Polyhydroxyalkanoate Production from Lignin." *Microbial Biotechnology* 13 (1): 290–98. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13481>.

- 19) Elhadi, Dina, Li Lv, Xiao Ran Jiang, Hong Wu, and Guo Qiang Chen. 2016. "CRISPRi Engineering E. Coli for Morphology Diversification." *Metabolic Engineering* 38 (November): 358–69. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.09.001>.
- 20) Jiang, Xiao Ran, Zhi Hao Yao, and Guo Qiang Chen. 2017. "Controlling Cell Volume for Efficient PHB Production by Halomonas." *Metabolic Engineering* 44 (November): 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.09.004>.
- 21) Li, Teng, Jianwen Ye, Rui Shen, Yeqing Zong, Xuejin Zhao, Chunbo Lou, and Guo Qiang Chen. 2016. "Semirational Approach for Ultrahigh Poly(3-Hydroxybutyrate) Accumulation in Escherichia Coli by Combining One-Step Library Construction and High-Throughput Screening." *ACS Synthetic Biology* 5 (11): 1308–17. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00083>.
- 22) Zhao, Han, Haoqian M. Zhang, Xiangbin Chen, Teng Li, Qiong Wu, Qi Ouyang, and Guo Qiang Chen. 2017. "Novel T7-like Expression Systems Used for Halomonas." *Metabolic Engineering* 39 (January): 128–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.11.007>.
- 23) Shen, Rui, Jin Yin, Jian Wen Ye, Rui Juan Xiang, Zhi Yu Ning, Wu Zhe Huang, and Guo Qiang Chen. 2018. "Promoter Engineering for Enhanced P(3HB- Co-4HB) Production by Halomonas Bluephagenesis." *ACS Synthetic Biology* 7 (8): 1897–1906. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00102>.
- 24) Ling, Chen, Guan Qing Qiao, Bo Wen Shuai, Karel Olavarria, Jin Yin, Rui Juan Xiang, Kun Nan Song, Yun Hao Shen, Yingying Guo, and Guo Qiang Chen. 2018. "Engineering NADH/NAD + Ratio in Halomonas Bluephagenesis for Enhanced Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA)." *Metabolic Engineering* 49 (September): 275–86. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.09.007>.
- 25) Scheel, Ryan A., Truong Ho, Yuki Kageyama, Jessica Masisak, Seamus McKenney, Benjamin R. Lundgren, and Christopher T. Nomura. 2021. "Optimizing a Fed-Batch High-Density Fermentation Process for Medium Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) in Escherichia Coli." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (February). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.618259>.

- 26) Chen, Xiangbin, Jin Yin, Jianwen Ye, Haoqian Zhang, Xuemei Che, Yiming Ma, Mengyi Li, Lin Ping Wu, and Guo Qiang Chen. 2017. "Engineering Halomonas Bluephagenesis TD01 for Non-Sterile Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-4-Hydroxybutyrate)." *Bioresource Technology* 244: 534–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.149>.
- 27) Rigouin, Coraline, Sophie Lajus, Connie Ocando, Vinciane Borsenberger, Jean Marc Nicaud, Alain Marty, Luc Avérous, and Florence Bordes. 2019. "Production and Characterization of Two Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by Engineered Strains of *Yarrowia Lipolytica*." *Microbial Cell Factories* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1140-y>.
- 28) Biernacki, Mateusz, Marek Marzec, Thomas Roick, Reinhard Pätz, Kim Baronian, Rüdiger Bode, and Gotthard Kunze. 2017. "Enhancement of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) Accumulation in *Arxula Adeninivorans* by Stabilization of Production." *Microbial Cell Factories* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0751-4>.
- 29) Dobrogojski, Jędrzej, Maciej Spychalski, Robert Luciński, and Sławomir Borek. 2018. "Transgenic Plants as a Source of Polyhydroxyalkanoates." *Acta Physiologiae Plantarum*. Polish Academy of Sciences, Institute of Slavic Studies. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4>.
- 30) Costa, Samantha Serra, Andréa Lobo Miranda, Michele Greque de Moraes, Jorge Alberto Vieira Costa, and Janice Izabel Druzian. 2019. "Microalgae as Source of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A Review." *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>.
- 31) Khetkorn, Wanthanee, Aran Incharoensakdi, Peter Lindblad, and Saowarath Jantaro. 2016. "Enhancement of Poly-3-Hydroxybutyrate Production in *Synechocystis* Sp. PCC 6803 by Overexpression of Its Native Biosynthetic Genes." *Bioresource Technology* 214 (August): 761–68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>.

## **AUTOAVALUACIÓ**

La realització d'aquest TFG suposa un punt d'inflexió respecte a la manera d'afrontar el canvi climàtic i la contaminació associada als plàstics tradicionals.

A nivell acadèmic he après que els polihidroxiàlcans són una alternativa eficient als plàstics tradicionals. És necessari un canvi cap a la sostenibilitat i a la biodegradabilitat i els polihidroxiàlcans són la solució. Aquests són produïts majoritàriament per bacteris, tot i així, les plantes, els llevats i les microalgues poden ser productors d'aquests també. Gràcies a tècniques d'enginyeria genètica, com CRISPRi, l'ús de vectors o l'optimització dels llocs d'unió ribosomals i els promotors, s'han pogut desenvolupar microorganismes amb altes capacitats de síntesis dels diferents PHA.

Tot i així encara queda molt per descobrir en aquest àmbit. Sobretot en fer proves industrials, ja que per poder substituir els plàstics tradicionals són necessàries grans quantitats de producte. També és important, seguir investigant i fent proves en diferents microorganismes.

## ANNEXOS

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia  
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

### ANNEX 2

#### FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

**Nom i Cognoms de l'Alumne:** Ot Pentinat Llurba

**Nom i Cognoms del Tutor/a:** Manuel Suárez Recio

**Data de la entrevista amb l'alumne:** primera tutoria realitzada el 17 de febrer de 2022

**Recomanacions durant el seguiment:** En la primera reunió de TFG, Ot va explicar-me el lloc en el que estava realitzant les seves pràctiques curriculars, l'empresa Alifarma, i la seva idea de treball de fi de grau, centrat en els resultats generats durant les pràctiques. En base a aquesta idea, i a la seva proposta inicial, li vaig donar alguns suggeriments sobre l'estructura i orientació del treball i va establir un calendari de reunions per a fer-ne un seguiment. Concretament vam fixar una reunió quinzenal, al menys durant les primeres setmanes.

**Observacions:** En la segona reunió de seguiment Ot va proposar un canvi de plantejament del treball donat que les tècniques utilitzades durant les pràctiques no acabaven de encaixar en el camp biotec. Per aquest motiu per va proposar centrar el TFG en una revisió bibliogràfica. A partir d'aquí proposa una índex de continguts i va presentant-me els avenços obtinguts en reunions i correus de seguiment. En aquest període Oti accepta i aplica de forma adequada les crítiques i comentaris que van sorgint.

**Observacions Darrera revisió:** en l'última reunió realitzada (el 24 de maig del 2022) Ot em presenta el document generat a falta d'uns petits retocs i les conclusions. Es compromet a enviar-me el document complet a finals de setmana cosa ha complert. La setmana vinent farem la última reunió per revisar el contingut i deixar finalitzat el treball. La valoració final és molt satisfactòria ja que Ot és autosuficient, dedicat i treballador i es capaç d'organitzar-se molt bé el treball. També aplica de forma adequada els comentaris que se li fan i, a més, compleix les dates d'entrega que es defineixen

Signatura del Tutor/a

Manuel Suárez Recio - DNI  
47681287X (AUT)  
Firmado digitalmente  
por Manuel Suárez  
Recio - DNI  
47681287X (AUT)  
Fecha: 2022.05.26  
17:48:27 +02'00'

Signatura de l'Alumne

  
Ot Pentinat Llurba

Tarragona a 26 de maig 2022