

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea in ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

PRODUZIONE DI  
POLIIDROSSIALCANOATI MEDIANTE  
LA TECNOLOGIA B-PLAS

Tesi di laurea in Biocarburanti e Bioraffinerie

**Relatore:** Prof.ssa Chiara Samorì

**Presentata da:**

**Correlatori:** Prof. Cristian Torri

Andrea Pistilli

Dott.ssa Giorgia Pagliano

Dott.ssa Alisar Kiwan

Dott.ssa Eleonora Torricelli

Dott. Daniele Pirini

Sessione Anno Accademico 2019/2020

# INDICE

## CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1. LE PLASTICHE

1.2. RIFIUTI DI PLASTICA, GESTIONE E RELATIVE PROBLEMATICHE AMBIENTALI

1.3. LE BIOPLASTICHE

1.4. BIODEGRADAZIONE

1.5. I POLIESTERI

1.5.1. POLIBUTILENE ADIPATO-CO-TEREFTALATO (PBAT)

1.5.1.1. BIODEGRADAZIONE DEL PBAT

1.5.2. POLICAPROLATTONE (PCL)

1.5.2.1. BIODEGRADAZIONE DEL PCL

1.5.3. ACIDO POLILATTICO (PLA)

1.5.3.1. BIODEGRADAZIONE DEL PLA

1.5.4. POLIIDROSSIALCANOATI (PHA)

1.5.4.1. POLIIDROSSIBUTIRRATO (PHB)

1.5.4.2. BIODEGRADAZIONE DEI PHA

1.5.4.3. PRODUZIONE DI PHA: COMUNITA' MICROBICA E FONTI DI CARBONIO

1.5.4.4. PRODUZIONE DI PHA: STRATEGIE DI FERMENTAZIONE ED ACCUMULO

1.5.4.5. METODI DI ESTRAZIONE DEL PHA: ESTRAZIONE CON SOLVENTE E DISSOLUZIONE SELETTIVA NPCM (NON-PHA CELL MASS)

1.5.4.6. L'IMPIANTO B-PLAS

1.6. SCOPO DELLA TESI

## CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI

2.1. SOLVENTI E REAGENTI

2.2. MONITORAGGIO DELL'IMPIANTO B-PLAS

2.2.1. MONITORAGGIO FANGO DI DEPURAZIONE IN INGRESSO E TRATTAMENTO HTC

2.2.2. MONITORAGGIO DIGESTORE ANAEROBICO

2.2.3. MONITORAGGIO DEI BIOREATTORI AEROBICI R1 ED R2

2.2.3.1. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI PHA

2.2.3.2. ESTRAZIONE DEL PHA

2.2.3.3. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE E DELLE PROPRIETA' TERMICHE DEL POLIMERO

2.3. TEST DI BIODEGRADAZIONE AEROBICA

2.4. TEST DI BIODEGRADAZIONE ANAEROBICA

## CAPITOLO 3 – RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. MONITORAGGIO FANGO DI DEPURAZIONE IN INGRESSO E TRATTAMENTO HTC

3.2. MONITORAGGIO DIGESTORE ANAEROBICO

3.3. MONITORAGGIO DEI BIOREATTORI AEROBICI R1 ED R2

3.3.1. ESTRAZIONE DEL PHA

3.3.2. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE E DELLE PROPRIETA' TERMICHE DEL POLIMERO

3.4. TEST DI BIODEGRADAZIONE AEROBICA

3.5. TEST DI BIODEGRADAZIONE ANAEROBICA DI POLIMERI IN POLVERE

3.6. TEST DI BIODEGRADAZIONE ANAEROBICA DI POLIMERI IN FILM

## CAPITOLO 4 - CONCLUSIONI

4.1. VALUTAZIONE GENERALE DELLE RESE DI PROCESSO TRAMITE COD

4.2. VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI PHA E CARATTERIZZAZIONE DEL POLIMERO

4.3. TEST DI BIODEGRADAZIONE AEROBICA ED ANAEROBICA

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

# CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

## 1.1. LE PLASTICHE

Hermann Staudinger ricevette il premio Nobel per la chimica nel 1953 per la sua ricerca pionieristica sulle macromolecole. Il suo lavoro ha fornito le basi per la comprensione e la progettazione di innumerevoli applicazioni per i polimeri nella vita quotidiana, sia come materie prime che come polimeri funzionali speciali. La vita moderna è inimmaginabile senza polimeri, tuttavia le materie plastiche vengono oggi discusse severamente come responsabili di effetti dannosi sull'ambiente. Infatti, se non adeguatamente gestite esse possono giungere in ambiente persistendo per periodi di tempo indefiniti, in quanto resistenti al degrado in presenza di influenze ambientali ed alla degradazione microbica (Ferreira et al. 2019).

Per tale motivo, negli ultimi anni l'argomento riguardante la produzione, la gestione e gli effetti indesiderati della plastica sull'ambiente naturale e sui sistemi viventi ha attirato molta attenzione da parte di tutti i settori (scienza e ricerca, industria, pubblico, politica) (Agarwal 2020).

Le plastiche sono materiali sintetizzati dall'uomo, composte da molecole polimeriche naturali o sintetiche insolubili in acqua, caratterizzate da macromolecole le cui strutture contengono unità ripetitive multiple (monomeri), conferendo così al composto un'elevata massa molecolare relativa e particolari proprietà associate (meccaniche, termiche) (Tokiwa et al. 2009; Sagnelli et al. 2017; Kulkarni and Dasari 2018).

Tali polimeri differiscono per il grado di polimerizzazione ovvero per il numero di monomeri, uguali (omopolimero) o diversi (copolimero) uniti a catena mediante la ripetizione dello stesso tipo di legame.

I polimeri vengono suddivisi in:

- Alifatici: catene di atomi di carbonio legate da legami singoli (saturi) ed atomi di idrogeno, come polietilene (PE) e polipropilene (PP);
- Aromatici: dotati di uno o più anelli benzenici, che li rende particolarmente stabili, come il polietilene tereftalato (PET) ed il polistirene (PS);
- Clorurati: possiedono strutture idrocarburiche contenenti almeno un legame covalente con un atomo di cloro, come il polivinilcloruro (PVC).

In base al loro comportamento termico inoltre, i polimeri possono essere ulteriormente suddivisi in due categorie:

1- Termoplastici: materie plastiche che acquistano malleabilità sotto l'azione del calore così da essere facilmente lavorabili per la creazione di oggetti finiti, per poi tornare nuovamente rigide a temperatura ambiente (stampipe 2016).

Questo processo può essere usato per riciclare i polimeri termoplastici ma può comportare un progressivo deterioramento del materiale (e.g. abbassamento del peso molecolare). Se il materiale non è contaminato, la fusione (riciclo meccanico) può essere usata per riciclare i polimeri termoplastici.

I principali polimeri termoplastici sono: PE, PP, PVC, PET, PS, poliamidi (PA), policarbonato (PC), elastomeri termoplastici (TPE), ecc. ('Plastics – the Facts 2019, PlasticsEurope').

2- Termoindurenti: sono un gruppo di materie plastiche che, dopo una fase iniziale di fusione dovuta al riscaldamento, induriscono per effetto di reticolazione tridimensionale; nella fase di fusione per effetto combinato di calore e pressione risultano formabili. Se questi materiali vengono riscaldati dopo l'indurimento non ritornano più a fondere, ma si decompongono carbonizzandosi (stampipe 2016).

I principali polimeri termoindurenti sono: il poliuretano (PUR), poliesteri insaturi, vinil esteri, silicone, resine fenoliche, resine acriliche, ecc. ('Plastics – the Facts 2019, PlasticsEurope').

I polimeri derivanti da fonti fossili possiedono generalmente buone proprietà meccaniche e termiche, facile lavorabilità e costi di produzione relativamente bassi, il che li rende altamente adattabili a molte applicazioni ed ampiamente utilizzati in diversi settori industriali come l'edilizia, le industrie siderurgiche e dell'alluminio, settore elettronico, automobilistico, aeronautico ed aerospaziale, medico e packaging (Siracusa et al. 2008; Sam et al. 2016; Abdullah et al. 2017; Ferreira et al. 2019).

Nella Tabella 1 sono indicati nel dettaglio, i principali utilizzi delle plastiche sintetiche.

**Tabella 1. Principali utilizzi delle plastiche sintetiche (Shah et al. 2008).**

<b>PLASTICHE</b>	<b>USI</b>
Polietilene (PE)	Sacchetti di plastica, bottiglie per latte ed acqua, pellicole per imballaggi alimentari, giocattoli, tubi di irrigazione e drenaggio, bottiglie di olio motore
Polistirene (PS)	Bicchieri usa e getta, materiali di imballaggio, articoli da laboratorio, elettronica
Poliuretano (PUR)	Pneumatici, guarnizioni, paraurti, isolamento del frigorifero, spugne, imbottitura per mobili e giubbotti di salvataggio
Polivinil cloruro (PVC)	Coprisedili per auto, tende da doccia, impermeabili, bottiglie, visiere, soles di scarpe, tubi da giardino e cavi elettrici
Polipropilene (PP)	Tappi di bottiglia, cannucce, bottiglie per medicinali, seggiolini auto, batterie per auto, paraurti, siringhe usa e getta, supporti per tappeti
Polietilene tereftalato (PET)	Bottiglie per bibite gassate, imballaggi per carne lavorata, barattoli di burro di arachidi, imbottitura di cuscini e sacchi a pelo, fibre tessili
Nylon	Tergicristalli, ugelli per tubi dell'acqua, caschi, scarpe da corsa, inchiostri, tessuti per abbigliamento da paracadute, abbigliamento antipioggia
Policarbonato	Illuminazione stradale, visiere di sicurezza, luci posteriori di automobili, biberon e casalinghi, serre, verande, occhiali
Politetrafluoroetilene (PTFE)	Impianti chimici specializzati, elettronica e cuscinetti, rivestimento su utensili da cucina antiaderenti, come pentole e padelle.

Le materie plastiche più ampiamente utilizzate a livello commerciale sono PE, PP, PS e PVC, ma costituiscono però anche le materie plastiche più comunemente osservate nell'ambiente e che danno

origine ad una delle categorie più problematiche di rifiuti solidi, che influenzano negativamente il suolo e le acque (Ferreira et al. 2019).

## 1.2. RIFIUTI DI PLASTICA, GESTIONE E RELATIVE PROBLEMATICHE AMBIENTALI

Nel 2015 sono stati generati rifiuti di plastica per circa 6,3 Gt in tutto il mondo, con un tasso di crescita in costante aumento, che si stima possa arrivare fino a 12 Gt di rifiuti in plastica entro il 2050 (Geyer et al. 2017).

Una parte del rifiuto di materie plastiche viene disperso nell'ambiente (circa il 27%) attraverso smaltimento incontrollato (Seggiani et al. 2018).

Tutto ciò, nel corso del tempo ha portato all'accumulo ed alla persistenza di macro e microplastiche nelle varie matrici ambientali e ciò sta diventando una minaccia crescente per ecosistemi ed organismi terrestri ed acquatici, oltre che per la salute umana (Sagnelli et al. 2017).

La maggior parte delle plastiche rilevate come microplastiche nell'ambiente sono PET e poliolefine, quali PE, PP: questi polimeri ad alta massa molare, sono molto stabili e persistono nell'ambiente per molto tempo, per diverse decine e centinaia di anni (Agarwal 2020).

Al fine di gestire adeguatamente la risorsa "plastica", PlasticsEurope propone le seguenti strategie e tecnologie di trattamento dei rifiuti di plastica (Figura 1).



Figura 1. Principali strategie e tecnologie di trattamento dei rifiuti di plastica ('Plastics – the Facts 2019, PlasticsEurope').

Innanzitutto, è estremamente importante un'adeguata raccolta e smistamento dei differenti rifiuti di plastica in ingresso. Successivamente, questi possono essere recuperati attraverso il riciclo o il recupero energetico (e.g. tramite termovalorizzazione) (Ishigaki et al. 2004).

In alternativa, i rifiuti plastici che non possono essere recuperati vengono smaltiti in discarica, dove persistono per periodi di tempo indefiniti in quanto recalcitranti al degrado microbico (Ishigaki et al. 2004).

Nonostante questo, il 25% dei rifiuti di plastica nell'UE viene ancora inviato in discarica ogni anno,

ma le attuali restrizioni stanno incoraggiando il riciclaggio ('The Circular Economy for Plastics - A European Overview, PlasticsEurope'). Infatti diverse tipologie di riciclaggio possono essere impiegate: ad esempio il riciclo meccanico, che consiste nella lavorazione meccanica di rifiuti di plastica che diventano così materia prima/seconda per la produzione di nuovi oggetti, anche se la qualità dei prodotti ottenuti sarà fortemente influenzata dalla qualità della selezione operata sul prodotto di riciclo.

Altra tipologia è il riciclaggio chimico che mira invece ad ottenere combustibili e chemicals con vantaggi quali ad esempio il risparmio di materie prime, la riduzione delle emissioni di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera, il contenimento del conferimento indiscriminato dei rifiuti in discarica. Il riciclo chimico è rappresentato quindi da una serie di processi chimici che decompongono il polimero nei monomeri d'origine: alcune plastiche (polimeri di policondensazione), per loro natura chimica, si prestano meglio a questo genere di trattamento, ad esempio il PET, le poliammidi (PA) ed i poliuretani (PUR) possono essere efficacemente depolimerizzati; tali processi di decomposizione chimica mutano a seconda del reattore o del metodo utilizzato per la depolimerizzazione e consistono in trattamenti termici o idrolitici che determinano il cracking o l'idrolisi delle catene polimeriche.

L'alto costo del riciclo, il basso valore commerciale delle materie plastiche riciclate ed il basso costo delle materie prime limitano però il riciclo della plastica (Shen et al. 2020). Inoltre i rifiuti di plastica di bassa qualità, come imballaggi in plastiche multistrato e film plastici, sono particolarmente difficili da separare e riciclare (Shen et al. 2020); altra sfida risiede inoltre nell'uso frequente di coloranti, additivi e riempitivi nel processo di produzione della plastica e dunque alla presenza di impurezze (Shen et al. 2020). In media inoltre, la plastica può essere riciclata solo circa 2-3 volte prima che la sua qualità scenda al punto tale da non poter più essere utilizzata (Sedaghat, 2018): ogni ciclo del processo di riciclaggio meccanico riduce la lunghezza della catena polimerica, causando così una perdita di massa e richiedendo un ulteriore trattamento del materiale, pertanto, uno dei modi migliori per trattare i rifiuti di plastica talvolta, è farli decomporre in CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O allo stato naturale, restituendoli indietro all'ecosistema (Shen et al. 2020). I crescenti problemi posti dalla gestione dei rifiuti di materiali plastici hanno stimolato dunque l'interesse per i materiali biodegradabili.

Le plastiche biodegradabili sono progettate per essere facilmente degradate dai microrganismi e per essere meglio assorbite dall'ambiente naturale, dalle discariche di rifiuti o dagli impianti di trattamento dei rifiuti biologici urbani ed industriali (Augusta et al. 1992; Witt et al. 1997; Ishigaki et al. 2004).

Pertanto, la necessità attuale è quella di utilizzare polimeri non dannosi per l'ambiente o di trovare metodi semplici ed efficienti dal punto di vista energetico, economico e tecnologico che aiutino a degradarli o permetterne un riciclo ed un recupero adeguato (Kulkarni and Dasari 2018).

### **1.3. LE BIOPLASTICHE**

La produzione globale di plastica ha raggiunto 335 Mt nel 2016 ed è ancora in crescita, in questo contesto le bioplastiche rappresentano solo lo 0,5% della produzione annuale di plastica e si prevede che aumentino fino a circa 2,62 Mt nel 2023, grazie alla produzione di bioplastiche emergenti, applicazioni diversificate e prodotti sempre più sofisticati ([www.european-](http://www.european-)

bioplastics.org).

Le bioplastiche per definizione, sono polimeri che possono essere ricavati da fonti rinnovabili (bio-based) o essere biodegradabili o possedere entrambe le caratteristiche. Quindi viene definita bioplastica anche una plastica proveniente da fonti fossili ma biodegradabile o anche una plastica proveniente da fonti rinnovabili ma non biodegradabile.

È necessaria una chiara differenziazione: mentre "bio-based" si riferisce semplicemente alla materia prima da cui ha origine, la "biodegradabilità" è una proprietà collegata alla struttura chimica ([www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org)).

Una plastica bio-based è interamente o parzialmente derivata dalla biomassa (EN 16575): un prodotto a base biologica è normalmente caratterizzato dal contenuto di carbonio a base biologica (carbonio contenuto o proveniente dalla biomassa) o dal contenuto di materia a base biologica.

Le plastiche biodegradabili sono invece state introdotte negli anni '80 principalmente per ridurre gli oneri ambientali dovuti all'aumento del volume di rifiuti nelle discariche, come contributo ecologico alla soluzione di problemi derivanti dallo smaltimento dei rifiuti di plastica (Urbanek et al. 2020; Gironi and Piemonte 2010).

Le bioplastiche commercializzate comprendono i seguenti tre gruppi di materiali, a seconda dei loro componenti principali: polimeri di origine batterica (come i poliidrossialcanoati (PHA)), polimeri di origine vegetale (amido) e polimeri sintetizzati chimicamente (come il policaprolattone (PCL)) (Kawai, 1995).

Diversi biopolimeri, come i PHA, l'acido polilattico (PLA), i poliesteri alifatici e i polisaccaridi, sono già stati testati con successo come bioplastiche poiché alcune delle loro proprietà fisiche e chimiche si avvicinano a quelle della plastica sintetica convenzionale (Lee et al. 1996; Steinbüchel and Fächtenbusch 1998). Tra questi, i PHA hanno guadagnato molta attenzione poiché completamente bio-based e per la loro completa biodegradabilità in varie condizioni entro un periodo di 1 anno, oltre che per la loro ampia gamma di proprietà fisiche e meccaniche a seconda della loro composizione chimica (Cavalheiro et al. 2009; [www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org)).

Nella Figura 2 viene infine riportata una classificazione delle bioplastiche in relazione alla loro biodegradabilità ed alla loro rinnovabilità.

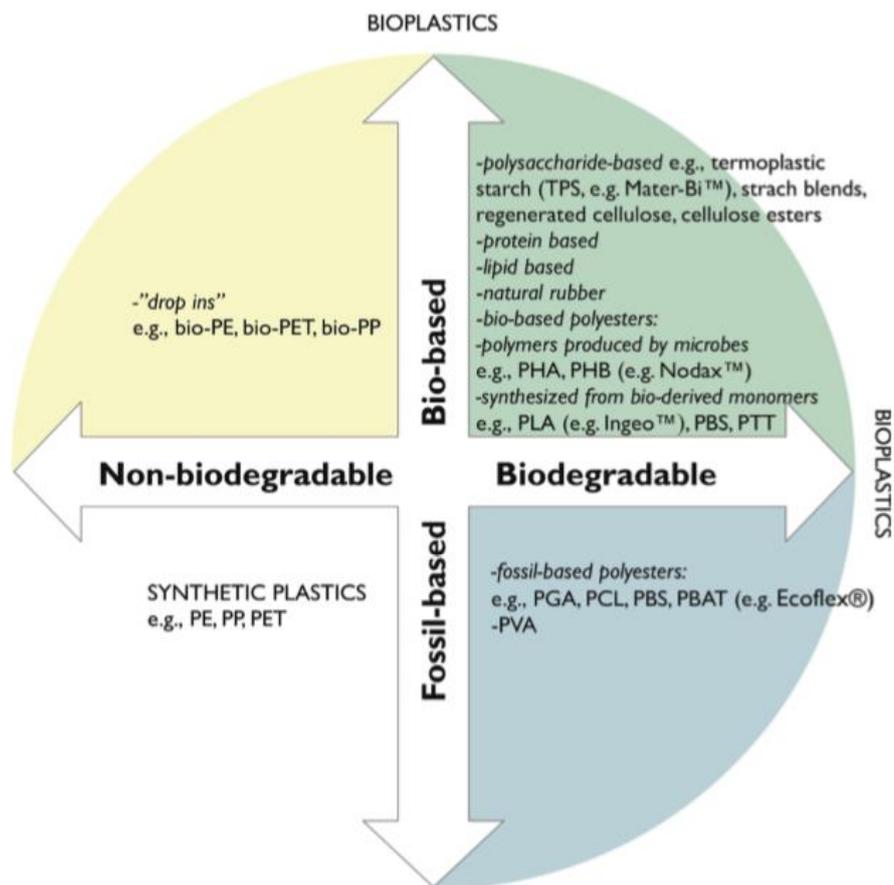


Figura 2. Grafico classificativo delle bioplastiche (Bátori et al. 2018).

Tra le bioplastiche completamente biodegradabili e bio-based si ha il PLA ed il PHA, tra le bioplastiche biodegradabili ma provenienti da fonti fossili sono annoverati il PBAT (polibutilene adipato-co-tereftalato) ed il PCL, infine tra le bioplastiche completamente biobased ma non biodegradabili (i cosiddetti drop-in), si hanno Bio-PET, bio-PE e bio-PP, con caratteristiche simili ai loro corrispondenti petrolchimici.

Altresì alcune bioplastiche, ad oggi, possiedono anche alcune proprietà indesiderate, tra cui elevata permeabilità all'acqua / gas, fragilità e scarsa stabilità durante la lavorazione, nonché bassa resistenza al calore, quindi talvolta la miscelazione con altri polimeri e / o il rinforzo con riempitivi può superare queste limitazioni (Sorrentino et al. 2007; Aslam et al. 2018).

La miscelazione di polimeri biodegradabili allora, può essere un approccio per ridurre il costo complessivo del materiale e modificarne le proprietà e i tassi di degradazione desiderati: rispetto al metodo di copolimerizzazione, la miscelazione può essere un modo molto più semplice e veloce per ottenere le proprietà desiderate (Tokiwa et al. 2009).

Rispetto alle plastiche convenzionali inoltre, i costi di produzione delle bioplastiche prodotte con le attuali tecnologie e processi sono circa da 3 a 10 volte superiori e la società è poco disposta a scegliere nuove bioplastiche con un prezzo più elevato al fine di proteggere l'ambiente ecologico, pertanto questo limita la potenziale enorme prospettiva di sviluppo e l'ampio mercato in termini di applicazioni delle bioplastiche (Rujnicsokele e Pilipovic, 2017; Luyt e Malik, 2019; Shen et al. 2020).

Dal punto di vista delle applicazioni delle bioplastiche, tutto dipende dal fatto che queste siano

appunto biodegradabili o meno. Quelle non biodegradabili, quindi drop-in, saranno destinate generalmente al packaging rigido, come le bottiglie d'acqua e le fibre tessili, mentre per le bioplastiche biodegradabili verranno utilizzate ad esempio, nel packaging flessibile, come le buste della spesa, ed in campo agricolo (Shah et al. 2008).

Il packaging rimane comunque il più grande campo di applicazione per le bioplastiche con oltre il 53% (1,14 Mt) del mercato totale delle bioplastiche nel 2019: quando si tratta di proteggere gli alimenti e prolungarne la durata di conservazione, le prestazioni degli imballaggi in bioplastica possono essere talvolta paragonabili, in termini di proprietà barriera, agli imballaggi convenzionali esistenti ([www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org)).

Per quanto riguarda invece lo smaltimento delle bioplastiche, a seconda della composizione chimica, della biodegradabilità e del volume raccolto, le linee guida europee stilano un elenco delle strategie di smaltimento preferenziale per ciascuna categoria:

1. Riciclaggio: pratica preferibile, ma attualmente i volumi sono troppo bassi per renderli economicamente vantaggiosi.
2. Incenerimento con recupero energetico: il recupero di energia da questi materiali a base biologica al termine della loro vita utile (quando il riciclaggio non è più possibile) può garantire un vantaggio netto per l'ambiente; questi infatti contengono energia preziosa che può essere recuperata in centrali termiche / combinate con produzione di bioenergia.
3. Digestione anaerobica (produzione di biogas): si ottengono ulteriori benefici (climatici) poiché il biogas (biometano) potrebbe sostituire il metano di origine fossile; pratica adottabile solo per bioplastiche biodegradabili.
4. Compostaggio: favorevole solo quando il materiale possiede un valore aggiunto (per esempio, aumentare la quantità di rifiuti alimentari raccolti da compostare e ridurre la quantità di plastica fossile all'interno della stessa categoria di rifiuti, con conseguente creazione di compost più prezioso); pratica adottabile solo per bioplastiche biodegradabili.
5. Incenerimento senza recupero energetico: viene emessa CO<sub>2</sub> biogenica. Se la produzione di una plastica biobased produce meno emissioni di CO<sub>2</sub> rispetto alla produzione della sua controparte convenzionale, la plastica biobased ha un impatto minore sull'ambiente quando viene incenerita.

Le bioplastiche dunque, possono apportare un contributo considerevole all'aumento dell'efficienza delle risorse attraverso la creazione di un ciclo di risorse chiuso, specialmente se i materiali e i prodotti a base biologica e/o biodegradabili vengono riutilizzati o riciclati ed infine utilizzati per il recupero di energia.

L'uso di una risorsa rinnovabile però non rende un materiale necessariamente più sostenibile dell'alternativa fossile. Al fine di verificare i benefici delle bioplastiche rispetto alle plastiche convenzionali, è necessario valutare l'impatto ambientale derivante dalla produzione, utilizzo e smaltimento dei due tipi di materiale, valutandone quindi l'intero ciclo di vita in termini di impatti. Al giorno d'oggi, lo strumento più importante per valutare l'impatto ambientale di un materiale (ad esempio plastica bio o convenzionale) è la valutazione del ciclo di vita (LCA) che determina l'impatto complessivo di una plastica sull'ambiente attraverso la definizione e l'analisi di diversi indici di impatto (Gironi and Piemonte 2010); una maggiore implementazione di

questo tipo di valutazione può aiutare la società ad avere una maggiore comprensione sulla biocompatibilità di un materiale (sia in termini univoci che comparativi) e capire quali fasi del ciclo di vita sono più critiche in termini di impatto ambientale e dunque su quali aspetti agire per apportare miglioramenti.

## 1.4. BIODEGRADAZIONE

La biodegradazione è un processo naturale mediante il quale le sostanze chimiche organiche nell'ambiente vengono convertite e scomposte in composti più semplici (oligomeri, dimeri o monomeri) ad opera di organismi (batteri, funghi, alghe, ecc.) presenti in natura, mineralizzate e ridistribuite attraverso i cicli elementari (Vaverková and Adamcová 2015).

La biodegradabilità di una bioplastica, dipende fortemente dalla struttura chimica della stessa, poiché sia le proprietà chimiche che fisiche del materiale influiscono sulla biodegradazione (Tokiwa et al. 2009). Queste proprietà fanno riferimento a: caratteristiche superficiali (superficie idrofobica o idrofila, area superficiale), le strutture di primo ordine (peso molecolare, distribuzione del peso molecolare, struttura e legami chimici) e le strutture di ordine superiore (cristallinità, modulo di elasticità, temperatura di transizione vetrosa, temperatura di fusione) (Tokiwa et al. 2009).

A tal riguardo se un polimero è altamente idrofobico (come i polimeri alifatici tra cui PE e PP) l'adesione dei microorganismi sulla sua superficie può risultare difficile (Shah et al. 2008). Allo stesso modo se il peso molecolare del polimero è estremamente elevato difficilmente si arriverà ad una completa mineralizzazione del materiale. Inoltre, alti pesi molecolari rendono i polimeri meno solubili sfavorendo l'attacco microbico (Shah et al. 2008).

Altri due aspetti che possono influenzare la biodegradabilità sono la lunghezza della catena polimerica (più corta è la catena, più facile risulta la degradazione) e la complessità strutturale (più complessa è la formula di struttura, meno il polimero risulta degradabile) poiché sono necessari diversi ceppi di microrganismi per attaccare le diverse funzioni del polimero (ad esempio i polimeri contenenti anelli aromatici risultano essere più difficili da degradare) (Massardier-Nageotte et al. 2006).

Un ultimo aspetto rilevante che ostacola la biodegradazione di un materiale è la tossicità conferita al polimero tramite l'aggiunta di additivi come antiossidanti (fenoli impediti stericamente, ammine aromatiche che possono eliminare i radicali liberi), coloranti (coloranti organici per colori trasparenti e pigmenti inorganici per colori opachi), plasticizzanti, ritardanti di fiamma (additivi a base di alogeni e antimonio), stabilizzanti di calore, stabilizzanti UV (benzofenoni e benzotriazoli), ecc. (Shah et al. 2008).

Più in dettaglio, la biodegradazione è un processo che avviene attraverso quattro step:

- **1° STEP** → Il microrganismo deve potersi attaccare e aderire alla superficie del materiale polimerico che va a degradare, aggregandosi a formare un biofilm (colonizzazione microbica), di conseguenza le proprietà meccaniche, chimiche e fisiche del materiale risultano cambiate a causa della crescita e della riproduzione continua dei microrganismi (biodeterioramento).

- **2° STEP** → Dopodichè il microorganismo inizia a secernere enzimi (ossidasi, depolimerasi) in grado di metabolizzare o rompere parzialmente le catene polimeriche del materiale a base di carbonio in materiali più piccoli, determinando un'erosione superficiale del materiale.
- **3° STEP** → Frammentazione (biofragmentazione) dei polimeri in composti di massa molecolare inferiore (oligomeri, dimeri e monomeri) utilizzabili come fonte di energia.
- **4° STEP** → Mineralizzazione: i precedenti step procedono riducendo in pezzetti sempre più piccoli i polimeri, rendendoli sempre più assimilabili dai microorganismi (bioassimilazione) fino ad arrivare ad una completa mineralizzazione del materiale, con formazione quindi di CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O e biomassa. Infatti, quando una sostanza viene decomposta, tutto il carbonio organico presente viene convertito in CO<sub>2</sub> o in CH<sub>4</sub>, mentre l'idrogeno in H<sub>2</sub>O (Shen et al. 2020). Gli step appena descritti sono sintetizzati nella Figura 3.

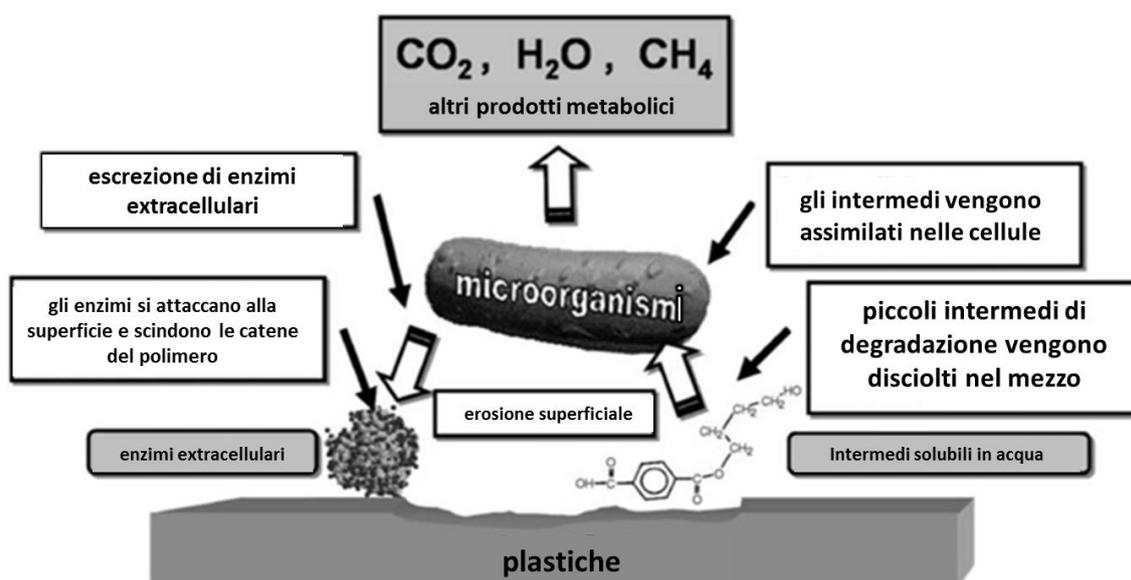


Figura 3. Schematizzazione del processo di biodegradazione (Shah et al. 2008).

La biodegradazione determinata da fattori biotici (microorganismi e relativi enzimi), può essere spesso innescata da processi di degradazione ambientale, dovuti ai fattori abiotici, tipici di un certo ambiente, quali umidità, temperatura, luce, disponibilità di ossigeno, radiazione UV e  $\gamma$  (Agarwal 2020).

Uno stesso polimero quindi, mostra differenti tassi di degradazione in diversi ambienti e matrici ambientali, come acqua, suolo e condizioni fisiologiche (Agarwal 2020).

La Figura 4 indica le distinzioni tra degradazione e biodegradazione.

## Degradabile vs. Biodegradabile

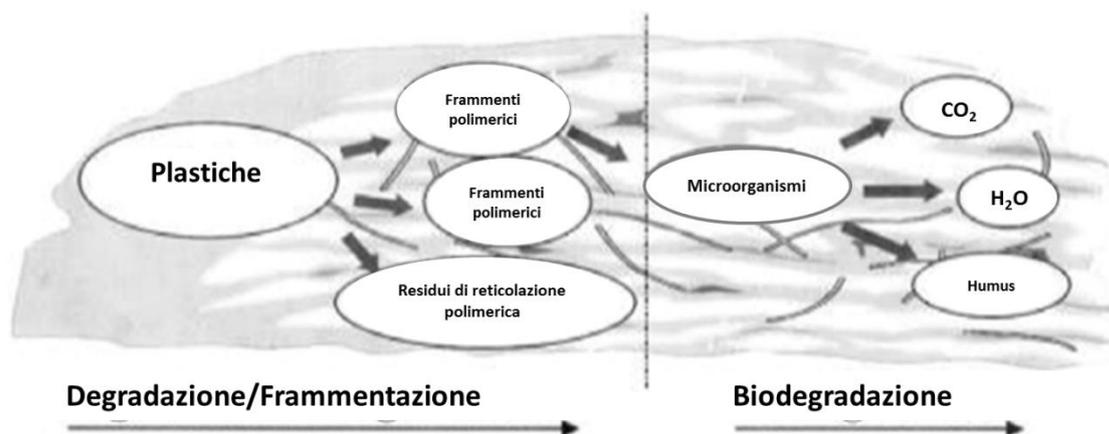


Figura 4. Degradazione VS. Biodegradazione (Mohee et al. 2008).

Diversi standard nel settore delle materie plastiche degradabili e biodegradabili sono stati inoltre sviluppati da Organismi di standardizzazione nazionali ed Organizzazioni internazionali, i quali sono attivamente coinvolti nello sviluppo di definizioni e test per la biodegradabilità e compostabilità in diversi ambienti (Bastioli 1998). Tutte le definizioni esistenti (ASTM, CEN, ISO) correlano la degradabilità di un materiale ad un ambiente di smaltimento specifico e ad un metodo standard specifico che simula questo ambiente in un certo periodo di tempo, che ne permette la sua classificazione (Bastioli 1998).

Secondo lo standard ASTM D5988-03 ad esempio, la biodegradabilità dei materiali plastici è stata definita come la capacità di subire la decomposizione in anidride carbonica, metano, acqua, composti inorganici o biomassa, principalmente per azione enzimatica dei microrganismi, tale standard richiede una decomposizione del 60–90% della plastica entro 60–180 giorni in un ambiente di compostaggio (Mohee et al. 2008).

Secondo lo standard ISO 17088: 2012 invece, una plastica può essere considerata biodegradabile se si verifica un cambiamento significativo nella struttura chimica, cioè degradazione del materiale esposto con formazione di anidride carbonica, acqua, composti inorganici e biomassa (nuovi costituenti delle cellule microbiche), ma nessun residuo visibile o tossico in condizioni di compostaggio. La norma CEN, EN 13432: 2000, per i materiali polimerici biodegradabili richiede anche che una sostanza venga convertita al 90% in anidride carbonica entro 6 mesi come condizione per il compostaggio in presenza di ossigeno. Per la degradazione anaerobica invece, questa norma specifica un minimo del 50% di conversione della sostanza in biogas in base al valore teorico, entro un massimo di 2 mesi.

In Tabella 2 sono indicati i principali standards ISO (Organizzazione Internazionale di Standardizzazione) in materia di biodegradazione delle plastiche.

Tabella 2. Principali standards ISO in materia di biodegradazione delle plastiche (Funabashi, Ninomiya, and Kunioka 2009).

ISO No.	TITOLO	Ambiente

14851	Determinazione della biodegradabilità aerobica di materiali plastici in un mezzo acquoso – Metodo applicato misurando la richiesta di ossigeno in un respirometro chiuso	acquoso
14852	Determinazione della biodegradabilità aerobica di materiali plastici in un mezzo acquoso - Metodo applicato mediante analisi dell'anidride carbonica sviluppata	
14855-1	Determinazione della biodegradabilità aerobica delle materie plastiche in condizioni di compostaggio controllate - Metodo applicato mediante analisi dell'anidride carbonica sviluppata Parte 1: Metodo generale	compost
14855-2	Determinazione della biodegradabilità aerobica delle materie plastiche in condizioni di compostaggio controllate - Metodo applicato mediante analisi dell'anidride carbonica sviluppata Parte 2: Misura gravimetrica dell'anidride carbonica sviluppata in un test su scala di laboratorio	
17556	Plastiche - Determinazione della biodegradabilità aerobica definitiva nel suolo misurando la richiesta di ossigeno in un respirometro o la quantità di anidride carbonica sviluppata	suolo
14853	Plastiche - Determinazione della biodegradazione anaerobica di materie plastiche in un sistema acquoso - Metodo applicato mediante misurazione della produzione di biogas	anaerobico
15985	Plastiche - Determinazione della biodegradazione e disintegrazione anaerobica in condizioni di digestione anaerobica ad alto contenuto di solidi - Metodo applicato mediante analisi del biogas rilasciato	

I test di biodegradazione inoltre, possono essere condotti sia in condizioni controllate (in laboratorio) che in condizioni ambientali (in ambiente): principalmente in acqua e suolo, ma comunque in tutti quei comparti ambientali dove può avvenire il rilascio incontrollato di questi materiali; tutto ciò culmina nell'osservazione del comportamento dei microorganismi degradanti nei confronti di questi materiali nelle condizioni stabilite e nella capacità di queste bioplastiche di essere biodegrate entro un certo periodo di tempo.

La questione aerobiosi o anaerobiosi fa riferimento fondamentalmente a differenti possibilità di smaltimento del materiale: smaltimento incontrollato in ambiente o impianti aerobici nel primo caso oppure in impianti di trattamento controllati con condizioni specifiche al fine di gestire questi materiali al fine vita nel secondo caso, oltre che ovviamente a costituire due tipi di trattamento biologico differente dei rifiuti, con differenti prodotti di reazione generati (Shah et al. 2008).

## 1.5. I POLIESTERI

I poliesteri sono una classe di polimeri caratterizzati da catene contenenti il gruppo funzionale estere (-COO-R).

I poliesteri possono essere preparati con metodi diversi, ad esempio attraverso una reazione di policondensazione di diacidi, idrossiacidi o anidridi e dioli o tramite una polimerizzazione ad apertura dell'anello di lattone (ROP), come ad esempio nel caso del PCL o del PLA (Zia et al. 2016a).

Inoltre, molti altri poliesteri termoplastici sono preparati da dioli ed acidi dicarbossilici, come il PET, il polibutilene tereftalato (PBT), il politrimetilentereftalato (PTT) (Zia et al. 2016a).

I poliesteri prodotti da fonti fossili sono PBS (polibutilene succinato), PCL, PBAT e PES (polietilene succinato), da biomassa invece PLA e PHA, mentre da entrambe le risorse PET e bio-

PET (Urbanek et al. 2020).

Tutti i poliesteri sono teoricamente considerati biodegradabili in quanto il processo utilizzato per la loro fabbricazione, cioè l'esterificazione, è un processo chimicamente reversibile e può essere invertito con un'azione enzimatica idrolitica (Satta and Shah 2020).

Tuttavia, sulla base dei tipi di monomeri presenti nella loro materia prima, i poliesteri possono essere alifatici, aromatici o copoliesteri: i poliesteri alifatici hanno una struttura a catena lineare e sono facilmente biodegradabili, i poliesteri aromatici sono scarsamente biodegradabili perché i microrganismi non sono in grado di attaccare il nucleo aromatico ed in particolare, di rompere il legame estere-aromatico (Urbanek et al. 2020), mentre i copoliesteri hanno proprietà di entrambe le classi, che non solo ne migliorano le caratteristiche fisiche e termiche, ma li mantengono biodegradabili allo stesso tempo (Satta and Shah 2020).

Una delle famiglie più importanti di polimeri biodegradabili è proprio quella dei poliesteri alifatici biobased, in quanto molti di essi hanno un'eccellente biodegradabilità e biocompatibilità e sono quindi una classe molto importante di polimeri biodegradabili: tra i più promettenti da un punto di vista della loro biodegradabilità e rinnovabilità si hanno i PHA ed il PLA (molte idrolasi microbiche sono state descritte come efficaci biocatalizzatori per la biodegradazione di materie plastiche di tipo poliestere) (Urbanek et al. 2020).

A seconda della struttura chimica inoltre, questi poliesteri possono costituire un materiale termoplastico o termoindurente.

I poliesteri sono usati principalmente nella laminazione di resine, stampa 3D, film, rivestimenti superficiali, gomme, fibre, plastificanti, compositi, ecc. (Zia et al. 2016b). Le loro applicazioni comprendono anche pellicole per pacciamatura, sacchi per compost, pellicole per il confezionamento di alimenti, tessuti in poliestere ed imballaggi (Urbanek et al. 2020).

Tuttavia, le applicazioni pratiche di questi materiali sono state spesso limitate dalla loro fragilità e dalla finestra di elaborazione ristretta, pertanto, la fusione, miscelazione o copolimerizzazione con altri polimeri è stata spesso riportata in letteratura al fine di migliorare le loro proprietà di lavorazione e di uso finale, oltre che ridurre i costi ('[www.polymerdatabase.com](http://www.polymerdatabase.com)').

### **1.5.1. POLIBUTILENE ADIPATO-CO-TEREFTALATO (PBAT)**

Il PBAT è un copoliestere alifatico-aromatico derivante da fonti fossili, biodegradabile e compostabile (secondo la specifica ASTM D6400) (Hernández-López et al. 2019).

Si tratta di un copoliestere semicristallino con co-cristallizzazione di dimeri BT (butilene tereftalato) e BA (butilene adipato) (Figura 5): il dominio alifatico (BA) è più sensibile all'idrolisi e alla biodegradazione rispetto al dominio aromatico (BT) (Kijchavengkul et al. 2010).

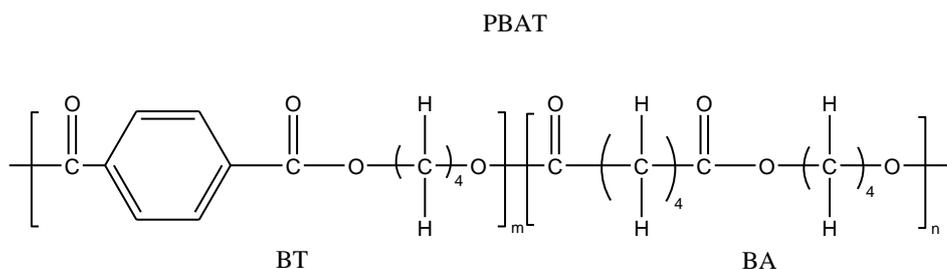


Figura 5. Struttura chimica del co-polimero PBAT.

Il PBAT è un polimero termoplastico caratterizzato da elevata viscosità e struttura chimica non polare (matrice idrofobica), molto duttile e con proprietà meccaniche e termiche competitive rispetto alla plastica convenzionale, sebbene sia circa tre volte più costoso del polietilene a bassa densità (LDPE) (Dammak et al. 2020).

Si tratta di un polimero flessibile, con modulo Young di 20–35 MPa, resistenza alla trazione 32–36 MPa e maggiore estensione a rottura (vicina al 700%) rispetto alla maggior parte dei poliesteri biodegradabili, come il PLA ed il PBS ad esempio (Ferreira et al. 2019). Queste proprietà meccaniche sono paragonabili a quelle del polietilene a bassa densità (LDPE) e fanno di PBAT un materiale biodegradabile molto promettente per una vasta gamma di potenziali applicazioni commerciali, come i dispositivi medici, film agricoli biodegradabili nel suolo (secondo EN 17033), sacchetti per rifiuti organici adatti al compostaggio (secondo EN 13432), imballaggi industriali, alimentari e biomedici, ma anche in prodotti per l'igiene, pellicole domestiche ed applicazioni di rivestimento o laminazione (Bojda, Piorkowska, and Pluta 2020; Ferreira et al. 2019; Hernández-López et al. 2019).

Herrera et al. (2002) hanno riportato che le proprietà meccaniche del polimero dipendono fortemente dal contenuto di tereftalato, osservando che il modulo di Young aumenta con il contenuto in unità di tereftalato, mentre l'estensione a rottura diminuisce (Ferreira et al. 2019).

Esso può essere processato in apparecchiature convenzionali per la lavorazione dei polimeri (miscelatori, estrusori, injection molding machines, ecc.) ed è abbastanza stabile in condizioni di lavorazione (Marinho et al. 2017).

I poliesteri in generale sono sintetizzati per policondensazione da combinazioni di dioli e acidi dicarbossilici (Ferreira et al. 2019), PBAT, in particolare, può essere prodotto mediante reazione di policondensazione di 1,4-butandiolo con acidi sia adipici che tereftalici (o butilene adipato) (Ferreira et al. 2019).

La preparazione di PBAT richiede tempi di reazione lunghi, condizioni di vuoto e temperatura generalmente superiore a 190 °C, queste condizioni sono necessarie per favorire le reazioni di condensazione e rimuovere le molecole più leggere (acqua) che si formano come sottoprodotto (Ferreira et al. 2019).

Questa bioplastica sintetica può essere prodotta anche mediante reazione di trans-esterificazione in condizioni controllate (Ferreira et al. 2019).

L'aggiunta di materiali a basso costo (fibre e riempitivi naturali o derivati della cellulosa) come agenti di rinforzo naturali, è stata segnalata come una valida opzione per sviluppare bioplastiche a base di PBAT più accessibili, con prestazioni meccaniche migliorate e con prezzo finale ridotto, ma mantenendo la biodegradabilità della matrice e del materiale stesso (Ferreira et al. 2019).

### 1.5.1.1. BIODEGRADAZIONE DEL PBAT

La degradazione di PBAT può verificarsi principalmente in due modi: per via enzimatica da batteri, funghi e alghe presenti nell'ambiente naturale e/o mediante un processo combinato di depolimerizzazione in cui la catena polimerica si rompe (ad esempio idrolisi chimica, degradazione termica, fotodegradazione) e metabolizzazione di questi intermedi da parte di microrganismi (Ferreira et al. 2019).

Nel caso di degradazione non enzimatica, la depolimerizzazione di PBAT si verifica principalmente attraverso la scissione del legame estere e, gli intermedi così generati, sono assimilati da microrganismi come *Pseudomonas cepacia* ed ulteriormente metabolizzati (Ferreira et al. 2019).

E' stato inoltre osservato da Kasuya et al. (2009) che il fungo mesofilo *Isaria fumosorosea* ceppo NKCM1712 contribuisce al degrado ed alla mineralizzazione del PBAT in ambienti naturali (Muroi et al. 2017), mentre non vi sono indicazioni sulla biodegradazione del PBAT nei sistemi acquatici per un periodo di almeno 1 anno (Bagheri et al. 2017).

Oltre all'attività microbica, l'idrolisi ha un'influenza sostanziale sulla biodegradazione, in particolare, la scissione idrolitica della catena relativamente ai legami estere riduce la dimensione delle catene di poliestere nella gamma dimensionale che i microrganismi possono assimilare (Kijchavengkul et al. 2010).

Herrera et al. (2002) hanno riferito che la degradazione del PBAT è stata notevolmente migliorata all'aumentare della temperatura del mezzo di degradazione, mentre l'uso di condizioni acide ha avuto un'influenza moderata. Altri autori (Ferreira et al. 2019; Bojda, Piorkowska, and Pluta 2020) hanno riportato invece, che il tasso di biodegradazione diminuisce con l'aumentare della concentrazione di acido tereftalico (la componente aromatica) nel polimero: si può stimare che il contenuto massimo di acido tereftalico affinché PBAT rimanga compostabile sia intorno al 60% in moli.

Uno studio di Kijchavengkul et al. (2009) atto a valutare la biodegradabilità aerobica di PBAT a temperatura ambiente in suolo, per una durata di 40 settimane ha determinato una biodegradazione del materiale del 48,5%.

In un altro studio di Kijchavengkul et al. (2010) dalla durata complessiva di 45 giorni, atto invece a valutare la biodegradabilità anaerobica di PBAT ad una temperatura di 58 °C ed all'interno di bioreattori contenenti tre tipi di compost rappresentativo commerciale, è stata determinata una biodegradazione del materiale variabile nei tre tipi di compost: 67%, 45% e 34%.

### 1.5.2. POLICAPROLATTONE (PCL)

Il policaprolattone (PCL) è un poliestere alifatico sintetico, idrofobo e semicristallino a base fossile, appartenente al gruppo dei poli- $\alpha$ -idrossiacidi (Figura 6), prodotto generalmente per policondensazione dell'acido 6-idrossiesanoico o per polimerizzazione ad apertura dell'anello di  $\epsilon$ -

caprolattone (ROP) tramite l'azione di catalizzatori anionici, cationici e di coordinazione (Chen et al. 2015; Urbanek et al. 2020).

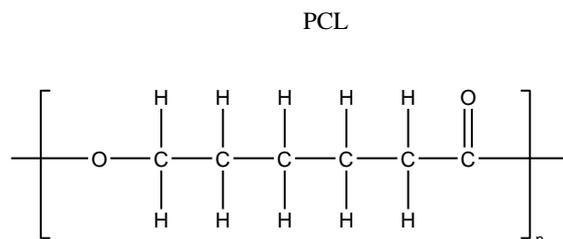


Figura 6. Struttura chimica del PCL.

Le sue proprietà fisico-chimiche e la disponibilità commerciale rendono PCL molto interessante non solo come sostituto dei polimeri non biodegradabili ma anche per applicazioni specifiche nel campo dell'imballaggio alimentare e nell'agricoltura (Campos, Marconato, and Martins-Franchetti 2012, Scaffaro et al. 2019).

PCL è utilizzato principalmente nelle resine per rivestimenti superficiali, adesivi, nell'ingegneria dei tessuti, pelli e tessuti sintetici, oltre che per realizzare irrigidimenti per scarpe, stecche ortopediche, buste, suture e fibre compostabili completamente biodegradabili (Funabashi, Ninomiya, and Kunioka 2009).

Le eccellenti proprietà termiche, viscoelastiche e l'elevata lavorabilità rispetto ad altri polimeri biodegradabili offrono dunque un'ampia gamma di elaborazione (anche mediante stampa 3D) a livello medico e biomedico (in particolare nei sistemi di somministrazione dei farmaci, suture, viti ossee, scaffold di ingegneria tissutale), in quanto il materiale risulta biocompatibile, biodegradabile e biorisorbibile (Funabashi, Ninomiya, and Kunioka 2009; Chen et al. 2015; Christen and Vercesi 2020).

Essendo biocompatibile dunque, PCL risulta sicuro quando posto a contatto con tessuti e fluidi umani: la degradazione dei dispositivi PCL impiantati comporta l'idrolisi dei legami estere delle catene polimeriche, con prodotti finali di degradazione ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ) che vengono totalmente eliminati dall'organismo (Christen and Vercesi 2020).

Si prevede altresì, che il basso punto di fusione del PCL (tra 59 e i 64 °C) gli permetta di essere adatto al compostaggio, poiché la temperatura ottenuta durante il compostaggio supera abitualmente i 60 °C (Funabashi, Ninomiya, and Kunioka 2009).

### 1.5.2.1. BIODEGRADAZIONE DEL PCL.

PCL può essere biodegradato dall'azione di microrganismi aerobici ed anaerobici che sono ampiamente distribuiti in vari ecosistemi (Tokiwa et al. 2009; Lu, Xiao, and Xu 2009). In particolare, la degradazione di questo poliesteri alifatico in ambiente, può derivare da un attacco enzimatico o dall'idrolisi chimica dei legami estere, o entrambi i meccanismi (Campos, Marconato, and Martins-Franchetti 2012).

La degradazione del PCL in natura è attribuita in particolare a microrganismi che secernono PCL

depolimerasi extracellulari come esterasi, cutinasi e lipasi (Murphy et al. 1996,1998; Tokiwa et al. 2009).

Tuttavia la sua biodegradabilità è influenzata dal peso molecolare e dal grado di cristallinità del polimero stesso: è stato dimostrato infatti, che la degradazione enzimatica di PCL da parte di *Aspergillus flavus* e *Penicillium funiculosum* risulta più rapida nella regione amorfa del polimero piuttosto che in quella cristallina (Tokiwa et al. 2009).

Per quanto riguarda invece l'influenza della dimensione delle particelle sulla biodegradazione del materiale, Yagi et al. (2012) hanno osservato che la biodegradabilità del PCL sotto forma di polvere è diminuita da 91 a 81% all'aumentare della dimensione delle particelle in condizioni di fango termofilo, dimostrando che le particelle di dimensioni inferiori si degradano più rapidamente a causa della superficie specifica più accessibile.

Uno studio di Massardier-Nageotte et al. (2006) atto a valutare la biodegradabilità aerobica di PCL ha mostrato nessuna biodegradazione del materiale in 28 giorni. In confronto Yagi et al (2009a), effettuando tale valutazione per un periodo di tempo maggiore (47 giorni), hanno ottenuto una degradazione del 92% di PCL a temperature termofile, usando fanghi di un impianto di biogas.

Ishigaki et al. (2004) hanno invece osservato una biodegradazione del PCL in condizioni aerobiche pari al 30% in 120 giorni.

### 1.5.3. ACIDO POLILATTICO (PLA)

L'acido polilattico (PLA) è un poliestere alifatico termoplastico a base biologica e biodegradabile (Figura 7) (Urbanek et al. 2020).

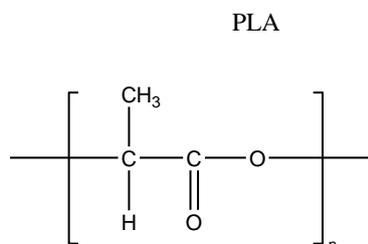


Figura 7. Struttura chimica del PLA.

Il suo monomero, l'acido lattico, utilizzato nei processi di polimerizzazione, viene comunemente prodotto su larga scala per fermentazione, a partire da risorse naturali rinnovabili (biomassa) come amido e zuccheri (Bátori et al. 2018; Reddy, Ghai, and Kalia 2003); esso è inoltre utilizzato come additivo alimentare.

L'acido lattico ha un prezzo di mercato relativamente basso, compatibile con i prodotti chimici ottenuti da fonti fossili (Tokiwa et al. 2009). Esso può essere prodotto inoltre in due configurazioni differenti, a seconda dell'organismo che viene utilizzato per la fermentazione: per produrre PLA si può decidere di utilizzare solo monomeri con la stessa configurazione, e quindi avremo un polimero con un'unica configurazione, oppure alternarli. Nel primo caso, il polimero viene chiamato isotattico (con struttura totalmente amorfa e flessibile), se invece si ottiene un

polimero utilizzando monomeri con entrambe le configurazioni, questo viene definito sindiotattico (con struttura semicristallina più rigida).

La struttura stereochimica del PLA dunque, può essere facilmente modificata polimerizzando una miscela controllata degli isomeri L o D: questo polimero esiste dunque sotto forma di tre stereoisomeri: poli (L-lattide)=(L-PLA), poli (D-lattide)=(D-PLA) e poli (DL-lattide)=(DL-PLA) (Tokiwa et al. 2009).

Sebbene il PLA sia costituito da materie prime a base biologica e biodegradabili (Hobbs et al. 2019), la sua produzione avviene mediante Ring-opening polymerization (ROP) del lattide: processo continuo a basso costo per sintetizzare sia il lattide che il PLA nella massa fusa. Il meccanismo comprende la condensazione dell'acido lattico acquoso per produrre un prepolimero di basso peso molecolare (~5000 Da), conversione (ciclizzazione intramolecolare) del prepolimero in una miscela di stereoisomeri del lattide e Ring-opening polymerization allo stato fuso con un catalizzatore organostannico per produrre un polimero ad alto peso molecolare (> 100000 Da) (Urbanek et al. 2020).

Dal punto di vista delle applicazioni commerciali, questo secondo processo è quello più utilizzato poiché è quello che permette di ottenere un polimero con caratteristiche chimico-fisiche molto simili a quelle dei polimeri fossili (PET e PP), mostrando proprietà di resistenza e biocompatibilità eccellenti (Urbanek et al. 2020). Il suo costo di produzione è però molto superiore (>4 €/kg) rispetto ai due polimeri fossili (0,5/1 €/kg) (Urbanek et al. 2020).

### **1.5.3.1. BIODEGRADAZIONE DEL PLA**

I legami esterei del PLA sono sensibili sia all'idrolisi chimica che enzimatica (Funabashi, Ninomiya, and Kunioka 2009).

Il PLA risulta dunque degradabile, però non essendo un polimero naturale ma sintetico deve essere prima idrolizzato a temperatura elevata (circa 58 °C) per ridurre il suo peso molecolare (idrolisi del legame estere), prima che possa avvenire la vera e propria biodegradazione, ciò avviene sia in condizioni di digestione aerobica, anaerobica e compostaggio (Hobbs et al. 2019). Sin et al. (2013) hanno affermato infatti, che la degradazione del PLA ha inizio attraverso un processo di idrolisi, seguito dalla digestione enzimatica da parte dei microrganismi (Samitthiwetcharong 2019).

Il PLA possiede strutture altamente cristalline che non sono facilmente degradabili in condizioni mesofile aerobiche ed anaerobiche (Samitthiwetcharong, Kullavanijaya, and Chavalparit 2017), soprattutto rispetto a condizioni di digestione termofila (Itävaara et al. 2002; Samitthiwetcharong, Kullavanijaya, and Chavalparit 2017).

Questo effetto accelerante della temperatura è attribuito sia all'aumentata mobilità delle catene disposte regolarmente in fase cristallina sia a quelle che si trovano in uno stato vetroso disordinato e dalle diverse composizioni della comunità microbica termofila (Marten et al. 2003; Ndazi & Karlsson 2011; Kolstad et al. 2012).

Sono stati riportati numerosi studi relativi alle diverse specie microbiche coinvolte nella degradazione del PLA, la maggior parte di queste proviene dalle famiglie batteriche *Thermoactinomycetaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* e *Bacillaceae* (Satti et al. 2017).

Tuttavia, studi ecologici sull'abbondanza di microrganismi degradanti del PLA in diversi ambienti, hanno confermato che i degradatori del PLA non sono ampiamente distribuiti, e quindi risulta essere meno suscettibile all'attacco microbico rispetto ad altri polimeri alifatici naturali e sintetici (Tokiwa et al. 2009).

Infatti, secondo Hobbs et al. (2019) solo il 7% del PLA si degrada in 90 giorni in condizioni di compostaggio industriale e affinché possa degradarsi completamente in ambiente occorrono da sei mesi a due anni.

Secondo lo studio di Massardier-Nageotte et al. (2006) invece, la biodegradazione aerobica del PLA è risultata del 4% in 28 giorni, comunque dimostratasi lenta.

Sono presenti molti studi relativi invece alla biodegradazione anaerobica del PLA: secondo Itävaara et al. (2002) il PLA è risultato biodegradato del 60% in 40 giorni in condizioni termofile; allo stesso modo in un altro studio, Yagi et al. (2009b) hanno misurato il 60% di biodegradabilità di PLA in 30 giorni, l'80% in 40 giorni e circa il 90% in 60 giorni in condizioni termofile.

Risultati simili sono stati ottenuti infine da uno studio realizzato da Yagi et al. (2012) sempre dalla durata di 60 giorni, nel quale la biodegradabilità dei film di PLA in condizioni anaerobiche termofile varia da 86 a 99% a seconda delle dimensioni dei campioni (Šmejkalová et al. 2016).

#### **1.5.4. POLIIDROSSIALCANOATI (PHA)**

I poliidrossialcanoati (PHA) sono una classe di poliesteri alifatici termoplastici, biosintetici, bio-based e biodegradabili, costituiti da acidi 3-, 4-, 5- e 6-idrossialcanoici (acidi R-idrossialcanoici) (Arcos-Hernández et al. 2015).

Questo polimero ha attirato la ricerca e l'interesse commerciale in tutto il mondo poiché può essere sintetizzato da materie prime rinnovabili a basso costo (materie prime di scarto di varia origine) e le polimerizzazioni sono gestite in condizioni di processo blande, con un impatto ambientale minimo, e altresì può essere biodegradato in ambienti aerobici e anaerobici, senza formare prodotti tossici (Tokiwa et al. 2009).

In particolare questi biopolimeri vengono accumulati nelle cellule di alcuni batteri (Gram-negativi e Gram-positivi) ed Archea, come riserve di energia (Koller et al. 2017; Kourmentza et al. 2017; Lu et al. 2009).

Questa riserva energetica è utilizzata dai batteri come fonte alternativa di acidi grassi, metabolizzata in condizioni di stress di crescita, ed è dunque il meccanismo chiave per la loro sopravvivenza in condizioni avverse (Kourmentza et al. 2017; Chen et al. 2011).

In particolare, questi biopolimeri vengono accumulati sotto forma di granuli insolubili o inclusioni intracellulari sferiche all'interno del citoplasma delle cellule batteriche, i quali possono arrivare a ricoprire fino all'80% del batterio (Urbanek et al. 2020) e talvolta possono raggiungere anche una concentrazione del 90% del peso secco della biomassa cellulare (Li and Wilkins 2020) (Figura 8).

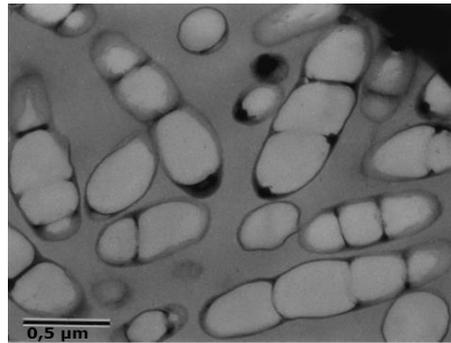


Figura 8. Immagine al microscopio elettronico delle inclusioni intracellulari di PHA.

Queste inclusioni hanno un nucleo in poliestere, circondato da fosfolipidi e proteine, e le loro dimensioni variano da 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  (De Grazia et al. 2017), con peso molecolare variabile da  $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  Da a seconda del tipo di specie microbica e delle condizioni di crescita (quali pH, condizioni di fermentazione, modalità di fermentazione, tipo e concentrazione della fonte di carbonio) (Anjum et al. 2016).

La figura 9 mostra la struttura in vivo delle inclusioni di PHA e componenti associate.

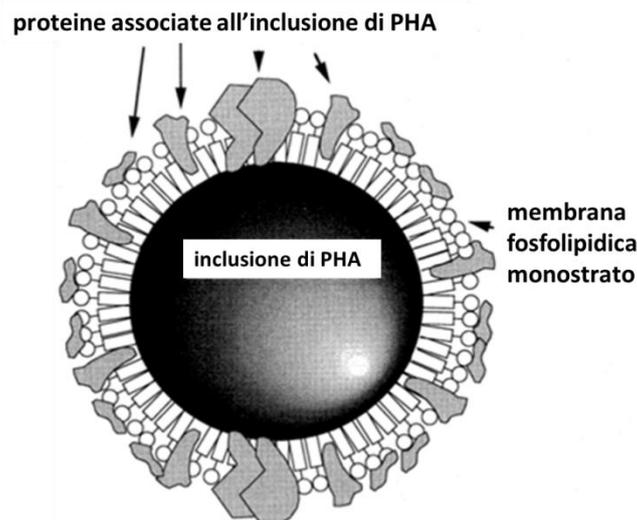


Figura 9. Modello rappresentativo che raffigura la struttura in vivo delle inclusioni di PHA e relative componenti associate (Sudesh, Abe, and Doi 2000).

La polimerizzazione del PHA viene dunque eseguita naturalmente direttamente dai batteri (Kourmentza et al. 2017). L'enzima che esegue la reazione di polimerizzazione è stato identificato come enzima chiave del processo di biosintesi: si tratta dell'enzima PHA sintasi, il quale determina il tipo di PHA sintetizzato dal microrganismo (Sudesh, Abe, and Doi 2000).

I poliidrossialcanoati hanno la formula generale mostrata nella Figura 10, dove "n" è uguale a 1 ed il gruppo "R" può variare da metil (C1) a tridecil (C13).

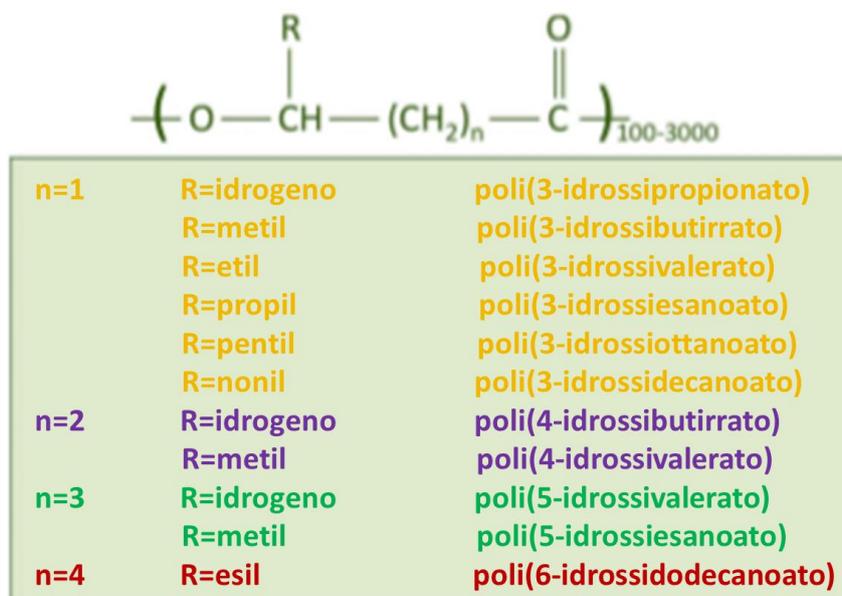


Figura 10. Formula di struttura generale dei poliidrossialcanoati

I monomeri di HA (idrossialcanoato) legati da legame estere, di cui sono costituiti tali poliesteri biodegradabili, hanno una catena laterale (R), spesso un gruppo alchilico saturo (Medeiros Garcia Alcântara et al. 2020). Tuttavia, questa catena può essere costituita anche da gruppi alchilici insaturi, gruppi alchilici ramificati o gruppi alchilici sostituiti, sebbene queste forme siano meno comuni (Tan et al. 2017). I monomeri di PHA possono essere anche composti da catene laterali aromatiche o particolari gruppi funzionali (Tarrahi et al. 2020).

I PHA sono fondamentalmente classificati in tre gruppi, in base al numero di atomi di carbonio nella catena laterale delle unità monomeriche: PHA a lunghezza di catena corta (SCL-PHA o short chain length-PHA), consistenti in 3-5 atomi di carbonio; MCL-PHA di lunghezza della catena media (o medium chain length-PHA), consistenti in 5 –14 atomi di carbonio; LCL-PHA a catena lunga (o long chain length-PHA) consistenti in un numero maggiore di 14 atomi di carbonio, tuttavia, gli LCL-PHA non sono molto comuni in natura (Raza et al. 2018).

In Figura 11 vengono rappresentate in maniera schematica, le strutture degli scl-PHA e mcl-PHA.

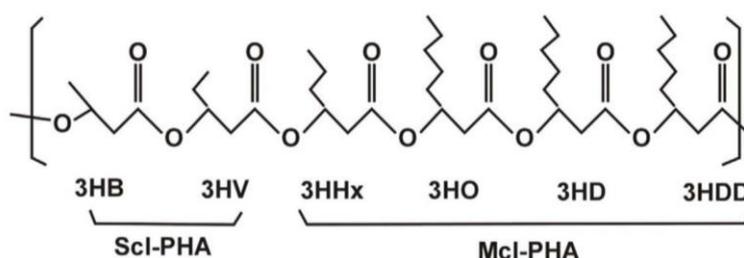


Figura 11. Strutture molecolari degli scl-PHA ed mcl-PHA dove 3HB = 3-idrossibutirrato, 3HV = 3-idrossivalerato, 3HHx = 3-idrossiesanoato, 3HO = 3-idrossiottanoato, 3HD = 3-idrossidecanoato e 3HDD = 3-idrossidodecanoato (Raza, Abid, and Banat 2018).

Le caratteristiche fisico-chimiche dei differenti PHA sono diverse e dipendono principalmente dalle specie batteriche produttrici, dalle condizioni di crescita, dal numero di atomi di carbonio in

un'unità monomerica e dalla struttura chimica dello stesso: la diversità dei monomeri disponibili (oltre 150 diversi tipi di composizione monomerica) potrebbe portare a molte applicazioni diverse, poiché ogni polimero risultante ha proprietà (meccaniche e termiche) del materiale differenti (Rehm, 2010; Nielsen et al. 2017; Kulkarni and Dasari 2018; Tarrahi et al. 2020; Medeiros Garcia Alcântara et al. 2020).

La lunghezza della catena laterale e del gruppo funzionale in particolare, hanno una grande importanza per le proprietà fisiche del materiale: gli SCL-PHA sono polimeri con un alto grado di cristallinità (60-80%), fragili e rigidi, con un alto punto di fusione ed una bassa temperatura di transizione vetrosa (da  $-50$  a  $4$  °C) (Padermshoke et al. 2005); al contrario, gli MCL-PHA risultano essere materiali flessibili ed elastici, mostrano bassa cristallinità (25%), elevata estensione a rottura, bassa resistenza alla trazione e basse temperature di fusione (inferiori alla temperatura ambientale) (Anjum et al. 2016).

Nonostante quanto detto, tuttavia la sua applicazione è ancora limitata a causa della sua bassa plasticità e bassa resistenza all'impatto, il che comporta molte difficoltà nella lavorazione di questi biopolimeri (Shen et al. 2020): le loro proprietà fisiche e la biodegradabilità allora, possono essere modificate e messe a punto miscelandoli con altri polimeri naturali, combinandone ed andandone ulteriormente a migliorare le caratteristiche (Adeleye et al. 2020).

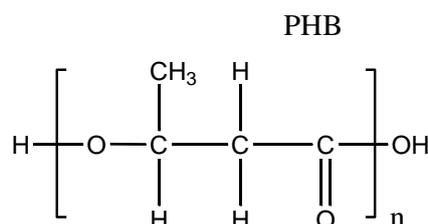
Solo pochi PHA ad oggi, principalmente poliidrossibutirrato (PHB), poli (3-idrossibutirrato-co-3-idrossivirerato) (PHBV) e poli (3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH), hanno proceduto alla fase di produzione (Kulkarni and Dasari 2018).

Una delle problematiche principali a tal riguardo, è l'attuale prezzo del PHA ( $>6$  €/kg) che però risulta inferiore ai circa 12 €/kg riportati all'inizio dell'ultimo decennio, quindi ciò evidenzia sicuramente delle migliorie tecnologiche, ma che ancora non sono considerati commercialmente competitivi rispetto ai polimeri tradizionali a base di petrolio, che in genere costano meno di 1 €/kg (Castilho, Mitchell, and Freire 2009; Chanprateep 2010; Gholami et al. 2016; Valentino et al. 2017).

Il così elevato prezzo di questo materiale è il risultato di una combinazione di tre fattori principali: coltivazione della comunità batterica, fonte di carbonio utilizzata come substrato ed estrazione del polimero, il quale viene stoccato all'interno delle cellule batteriche stesse e occorre dunque rompere la parete cellulare al fine di estrarlo (Reddy, Ghai, and Kalia 2003). Questi tre aspetti verranno affrontati con maggiore dettaglio nei paragrafi successivi dedicati alla produzione di PHA.

#### 1.5.4.1. POLIIDROSSIBUTIRRATO (PHB)

L'omopolimero contenente unità ripetitiva (R) -3-idrossibutirrato o (R) -3HB, ovvero PHB, è il più noto membro degli scl-PHA (Figura 12) (Anjum et al. 2016; Kulkarni and Dasari 2018).



**Figura 12. Formula di struttura del PHB.**

Il peso molecolare del PHB è generalmente compreso tra 10.000 e 3.000.000 Da a seconda del microrganismo produttore e delle condizioni di crescita: si è scoperto che le proprietà fisiche dell'omopolimero PHB possono essere migliorate producendo polimeri ad alto peso molecolare, ed è la via che oggi viene maggiormente percorsa, in quanto esso può raggiungere una massa molecolare sufficientemente elevata per avere caratteristiche polimeriche simili alle plastiche convenzionali come il polipropilene (Madison e Huisman, 1999; Anjum et al. 2016).

Da un punto di vista applicativo, ad esempio, il PHB, ha proprietà barriera (bassa permeabilità all'ossigeno, all'anidride carbonica e all'acqua) migliori rispetto al PP, il che lo rende superiore alla plastica commerciale nel confezionamento di prodotti sensibili all'ossigeno come alimenti e bevande (Pakalapati et al. 2018; Shen et al. 2020).

Perciò, è di rilevante importanza da un punto di vista applicativo, l'industria del packaging (film, contenitori, pellicole, bottiglie, sacchetti, fibre, rivestimenti), oltre che nel campo dell'igiene personale, vernici, toner e adesivi, dispositivi elettronici, articoli usa e getta ed anche applicazioni agricole, nonché nell'industria tessile, talvolta in sostituzione di polimeri sintetici come polipropilene, polietilene ecc. (Ojumu et al. 2004; Lee, 1996; Urbanek et al. 2020; Li and Wilkins 202; Pakalapati et al. 2018; Reddy, Ghai, and Kalia 2003).

Altro aspetto interessante sono le applicazioni mediche, biomediche, chirurgiche (come le suture) ed ortopediche, anche in questo caso la biodegradabilità e biocompatibilità ne consentono l'inserimento nel corpo umano senza necessità di essere rimossi, in quanto sono la conseguenza del metabolismo cellulare (Tarrahi et al. 2020). In un sistema biologico, i PHA possono essere degradati infatti attraverso depolimerasi microbiche nonché mediante idrolisi non enzimatica ed enzimatica, come ad esempio nei tessuti umani (Anjum et al. 2016), il tutto senza generazione di prodotti tossici per l'organismo (Pakalapati et al. 2018).

#### **1.5.4.2. BIODEGRADAZIONE DEI PHA**

La proprietà che distingue i PHA dalle plastiche convenzionali è proprio la loro biodegradabilità in vari ambienti (Reddy, Ghai, and Kalia 2003): la degradazione ambientale dei PHA, oltre che per via termica, procede attraverso una combinazione di idrolisi abiotica ed enzimatica, con quest'ultimo meccanismo che esercita la maggiore influenza (Woolnough et al. 2013).

La microscopia elettronica ha rivelato che in primo luogo la degradazione per idrolisi enzimatica avviene in superficie, direttamente osservabile per via dell'erosione superficiale del materiale (Sudesh, Abe, and Doi 2000), tale processo si sviluppa in due fasi: in primo luogo l'enzima si lega al substrato polimerico, quindi successivamente catalizza una scissione idrolitica (Shah et al. 2008).

La biodegradazione dei PHA, oltre che dalle particolari condizioni dell'ambiente di smaltimento (pH, temperatura, umidità, ecc.) e dal tipo di microrganismi presenti, è influenzata soprattutto dalle proprietà del materiale stesso (area superficiale, cristallinità, peso molecolare, struttura chimica e relativa composizione polimerica) (Anjum et al. 2016). La temperatura di fusione è un altro fattore importante da considerare quando si studia la biodegradazione di questi materiali: con l'aumento della temperatura di fusione, la degradabilità enzimatica diminuisce (Anjum et al. 2016).

A differenza della plastica derivata dal petrolio che impiega diversi decenni per degradarsi, i PHA possono essere completamente biodegradati entro un anno da una varietà di microrganismi presenti nel suolo, nel compost, nei sedimenti marini, nell'acqua di mare, nell'acqua di lago e nelle acque reflue, principalmente batteri e funghi, generando come prodotti acqua ed anidride carbonica in condizioni aerobiche e metano e anidride carbonica in condizioni anaerobiche (Anjum et al. 2016; Reddy, Ghai, and Kalia 2003; Pagliano et al. 2017).

In particolare, diverse specie batteriche anaerobiche ed aerobiche degradanti i PHA, sono state isolate da vari ambienti, come *Comamonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas lemoignei*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acidovorax faecalis*, *Aspergillus fumigatus* e *Variovorax paradoxus* nel suolo, *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas fluorescens* nei fanghi attivi e *Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas testosteroni* nelle acque di lago e funghi, come *Aspergillus fumigatus* (Pagliano et al. 2017; Reddy et al. 2003; Shimao, 2001).

Questi microrganismi secernono le PHA depolimerasi extracellulari per degradare (idrolizzare) i PHA in monomeri o esteri oligomericici idrosolubili (idrossiacidi), utilizzandoli come fonte di carbonio per la loro crescita (o metano in condizioni anaerobiche) (Pagliano et al. 2017; Briese, Jendrossek, and Schlegel 1994); i prodotti di idrolisi vengono dunque poi assorbiti dalle cellule e metabolizzati (Briese, Jendrossek, and Schlegel 1994).

Per quanto riguarda la biodegradazione aerobica di questi materiali, studi di Johnstone (1990) e Flechter (1993) hanno dimostrato che fino all'85% di PHA è stato degradato in 7 settimane in queste condizioni. È stato riportato ancora, che il PHA si degrada negli ambienti acquatici (Lago di Lugano, Svizzera) entro 254 giorni anche a temperature non superiori a 6 °C (Johnstone, 1990).

Uno studio di Zhang and Gu (2017) ha rilevato invece, che in un mezzo acquoso aerobico il PHB si è biodegradato molto più rapidamente rispetto ai casi citati precedentemente (80% in 90 giorni).

In linea con gli studi di Johnstone (1990) e Flechter (1993), Siracusa et al. (2008) ha dimostrato che i PHA sono in grado di degradarsi in anidride carbonica ed acqua in 5-6 settimane in condizioni aerobiche, ma in ambienti anaerobici il degrado è risultato più rapido e la produzione di metano vantaggiosa.

Anche Budwill et al. (1996) hanno riferito che il PHB è biodegradabile anaerobicamente in vari scenari, ed hanno suggerito che i digestori anaerobici municipali dei fanghi di depurazione erano adatti all'ambiente degradante del PHB al fine di generare biometano. In questo scenario, PHB ha dimostrato di biodegradare anaerobicamente in condizioni termofile per oltre il 90% in 10 giorni (Yagi et al. 2014). Un simile risultato è stato ottenuto da Budwill et al. (1992), dove PHB e PHBV (13 e 20% HV) hanno mostrato una biodegradazione dell'83-96% in 16 giorni in condizioni anaerobiche.

Una rapida biodegradazione anaerobica è stata altresì dimostrata in uno studio condotto da Shin et al. (1997), dove PHBV (8% HV) ha raggiunto circa l'85% di degradazione entro 20 giorni in fanghi anaerobici. Un risultato comparabile è stato ottenuto da Noda et al. (2009), dove poli (idrossibutirrato-co-3-idrossottanato) (PHBO) è stato biodegradato anaerobicamente fino a circa l'80% dopo 25 giorni.

### **1.5.4.3. PRODUZIONE DI PHA: COMUNITA' MICROBICA E FONTI DI CARBONIO**

Per la produzione di PHA sono stati proposti diversi tipi di processi, che possono essere raggruppati in tre classi principali: (i) microbiologici, (ii) enzimatici e (iii) chimici.

Tipicamente, i PHA commerciali sono prodotti attraverso una via microbiologica (Tan et al. 2017).

I fattori principali da prendere inizialmente in considerazione per la produzione di PHA su vasta scala sono diversi: il tipo di microorganismi da utilizzare come accumulatori di PHA, la fonte di carbonio da utilizzare come substrato e la modalità di fermentazione per la produzione del PHA.

Più di 90 generi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi sono stati classificati come produttori di PHA, in condizioni aerobiche e anaerobiche: batteri, come *Cupriavidus (C.) necator*, diverse specie *Pseudomonas (P.)* (*P. fluorescens*, *P. hydrogenovora*, *P. oleovorans*, *P. resinovorans*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina*), ceppi appartenenti alle specie *Azotobacter (A.)* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*), *Bacillus (B.) spp.*, *Escherichia (E.) coli* ricombinante e *Burkholderia (Bk.) spp.* (Pagliano et al. 2017; Strazzerà et al. 2018).

Per un confronto completo sull'accumulo e la produttività dei differenti microrganismi produttori di PHA il lettore è indirizzato alla review di Tan et al. 2014.

Per la produzione di PHA intracellulare in sistemi controllati inoltre, è possibile utilizzare un ceppo batterico singolo oppure comunità microbiche miste (MMC).

La possibilità di produrre PHA a basso costo ha motivato i progressi nell'uso della coltura microbica mista (MMC) come metodo di produzione (Cui et al. 2016). Questo approccio utilizza consorzi microbici misti aperti (in condizioni non sterili) e principi di selezione ecologica, dove i microrganismi in grado di accumulare PHA sono selezionati dalle condizioni operative imposte al sistema biologico (Kourmentza et al. 2017).

Per quanto riguarda le fonti di carbonio impiegate, tra i substrati maggiormente utilizzati troviamo: risorse rinnovabili come glucosio, acidi grassi volatili (VFA), amido, materie prime lignocellulosiche, cellulosa, saccarosio, triacilgliceroli, oli vegetali ed anidride carbonica, risorse fossili (metano, olio minerale, lignite, hard coal), ma anche sottoprodotti industriali e rifiuti organici (siero di formaggio, siero di latte, glicerolo, olii, melassa, ecc.) (Pagliano et al. 2017; Reddy, Ghai, and Kalia 2003; Adeleye et al. 2020). La biomassa di scarto in particolare, di solito è costituita da quantità massime di acidi grassi, carboidrati ed alcani, questa risulta dunque un'ottimale materia prima fonte di carbonio per la produzione di PHA (Pakalapati et al. 2018).

La scelta del substrato è di fondamentale importanza, sia perché influenza in maniera rilevante i costi di produzione, sia perché è probabilmente il fattore più importante che determina la composizione del polimero / copolimero prodotto (e relative proprietà chimico/fisiche), poiché le varie fonti di carbonio vengono metabolizzate attraverso distinte vie metaboliche, producendo diversi monomeri del PHA (Alvi et al. 2014; Leong et al. 2014; Medeiros Garcia Alcântara et al. 2020; Raza et al. 2018; Li and Wilkins 2020).

Inoltre, vi è anche una considerazione etica: la materia prima selezionata non dovrebbe competere con le fonti relative agli alimenti e ai mangimi (Medeiros Garcia Alcântara et al. 2020), ciò significa che l'utilizzo delle cosiddette materie prime di seconda generazione è fortemente incoraggiato, per prevenire l'aumento dei prezzi dell'offerta alimentare globale (Jiang et al. 2016; Koller and Braunegg, 2018).

La ragione principale dell'attuale costo elevato della produzione di PHA è dovuta proprio al fatto che i processi industriali si basano generalmente su colture di un singolo ceppo selezionato (es. *Cupriavidus Necator*) che, a sua volta, richiedono substrati specifici (es. glucosio) e un elevato costo energetico (es. sterilizzazione di substrati e attrezzature, alta densità cellulare) (Cui et al.

2016). D'altra parte, una produzione basata sull'uso di colture microbiche miste (MMC), consente sia una minore richiesta di energia sia di utilizzare materie prime a basso costo come i rifiuti organici (senza concorrenza con la catena alimentare), grazie alla loro capacità di adattamento nell'utilizzo di una vasta gamma di substrati dovuta alla diversità microbica, con il costo di produzione che potrebbe risultare ridotto drasticamente (Cui et al. 2016). Infatti il costo dei substrati puri comunemente usati (cioè zuccheri puri, acidi grassi, oli) è indicato in letteratura come il fattore principale che influenza il costo di produzione complessivo dei PHA e può rappresentare circa il 50% del costo totale (Karasavvas and Chatzidoukas 2020). Pertanto, l'utilizzo di colture MMC fornisce un'alternativa più sostenibile ed economica per la produzione di PHA (Kourmentza et al. 2017).

Sebbene l'utilizzo dei rifiuti sia vantaggioso, tuttavia la presenza di impurità e la variazione nella composizione dei rifiuti si traduce ogni volta in una variazione delle rese finali di produzione dei PHA (Raza, Abid, and Banat 2018). Queste impurità richiedono diverse procedure di lavaggio post recupero dei PHA che si traducono in un aumento dei costi del prodotto finale (Boynton et al. 1999; Holmes et al. 1980; Volova et al. 2003).

#### **1.5.4.4. PRODUZIONE DI PHA: STRATEGIE DI FERMENTAZIONE ED ACCUMULO**

Per quanto concerne le differenti modalità di fermentazione batterica utilizzate a livello industriale in sistemi controllati, per la produzione di PHA, generalmente queste si basano su una fase acquosa a temperature  $<40$  °C e a pressione atmosferica, in reattori in condizioni aerobiche e/o anaerobiche (Tarrahi et al. 2020; Adeleye et al. 2020).

In particolare, in base alla frequenza con cui l'impianto o il reattore viene alimentato con substrato, si distinguono processi discontinui (batch), processi continui e processi semicontinui (fed-batch).

La coltura in continuo è un sistema aperto alimentato in continuo, in cui nuovo terreno di coltura è immesso costantemente, con un tempo di permanenza medio del substrato nel reattore espresso dal tempo di residenza idraulico (HRT), mentre quello che si è esaurito è eliminato, generalmente attraverso due pompe.

La fermentazione in batch è al contrario, ciò che viene descritto come un "sistema chiuso", in base al quale il substrato ed i microrganismi produttori vengono aggiunti al sistema al tempo zero e non vengono rimossi fino al termine della fermentazione.

Il sistema fed-batch è invece un sistema semi-aperto e permette di prolungare il tempo di crescita dei microrganismi prima di raggiungere lo stato stazionario: il substrato limitante viene infatti continuamente addizionato alla coltura.

In particolare, una tecnica fed-batch molto diffusa è la cosiddetta modalità di coltivazione SBR (Sequencing Batch Reactor), anche in questo caso si parte da un batch, in cui però dopo aver lasciato il sistema chiuso per un certo periodo di tempo, si rimuove parte del contenuto del reattore, si immette substrato fresco e il sistema viene nuovamente chiuso (Li and Wilkins 2020).

Le strategie di coltura fed-batch sono la strategia di fermentazione più utilizzata per creare condizioni di limitazione dei nutrienti, deviare più fonti di carbonio nella formazione di PHA e

migliorare la densità cellulare e la produttività di PHA (concentrazione e contenuto) (Li and Wilkins 2020).

In corrispondenza di una coltura fed-batch viene generalmente utilizzato l'approccio feast-famine (ovvero abbondanza-carestia) come modalità di alimentazione dei reattori (Cui et al. 2016). Si tratta di una strategia di alimentazione dinamica aerobica (ADF) in cui i microrganismi vengono coltivati in un ambiente selettivo che alterna la presenza e l'assenza di substrato esterno. Il rapporto tra tempo di abbondanza e tempo di carestia ( $F / F$ ) è la pressione selettiva che regola l'attività competitiva dei batteri che immagazzinano o meno PHA. Poiché i batteri che accumulano PHA immagazzinano il substrato più velocemente durante il periodo di abbondanza, questo tipo di batteri stabilisce il suo vantaggio competitivo di crescita rispetto agli organismi che non immagazzinano PHA durante il periodo di carestia (Cui et al. 2016).

In particolare, i processi per la produzione di PHA con la strategia feast-famine, in presenza di colture miste vengono solitamente eseguiti in due fasi:

1. Fase di selezione e crescita della biomassa batterica PHA accumulatrice, aumentandone la concentrazione cellulare all'interno del reattore senza limitazione di nutrienti (Koller et al. 2017).
2. Fase di produzione ed accumulo intracellulare del PHA, dove viene introdotta una limitazione di nutrienti (ad esempio mancanza di fonte di azoto / fosforo), al fine di dirigere le vie metaboliche verso un accumulo di PHA (Koller et al. 2017).

Entrambe le fasi avvengono generalmente in due reattori aerobici differenti poiché il PHA è un metabolita secondario, cioè la sua formazione non avviene in concomitanza con la crescita cellulare, quindi non è possibile avere nello stesso reattore condizioni ottimali per la crescita cellulare e condizioni limite per stimolare la produzione di PHA (Medeiros Garcia Alcântara et al. 2020).

Più in dettaglio, la produzione di PHA viene favorita principalmente quando le cellule vengono coltivate in presenza di una fonte di carbonio in eccesso (ad esempio VFA), con elevata domanda chimica di ossigeno (COD) (nel primo reattore), con la loro crescita limitata poi dalla presenza in quantità limitata nel mezzo di coltivazione di un altro nutriente essenziale per la crescita, come azoto, fosforo, zolfo o ossigeno (nel secondo reattore) (Pagliano et al. 2017; Tarrahi et al. 2020; Kourmentza et al. 2017) o in seguito a variazioni di pH (Anjum et al. 2016), dunque in condizioni di stress culturale (selezionando i microrganismi adattati allo stress, che hanno dunque ottenuto un vantaggio selettivo).

Le colture microbiche miste tuttavia, possono avere una tolleranza maggiore per un ampio intervallo di pH (Li and Wilkins 2020).

Anche la temperatura sembra essere un parametro operativo importante durante la fase di arricchimento, per l'accumulo di PHA (Kourmentza et al. 2017). La limitazione di ossigeno invece, viene a volte incorporata nella strategia feast-famine per eseguire un regime di abbondanza aerobica ed un regime di carestia anossica per aumentare la produzione di PHA e ridurre l'uso di ossigeno (Li and Wilkins 2020).

Essendo il metodo di eccesso e limitazione dei nutrienti il più utilizzato, i rapporti carbonio / azoto ( $C / N$ ) ed anche carbonio / fosforo ( $C / P$ ) possono influenzare il contenuto di PHA nelle cellule e la composizione del monomero di PHA (Li and Wilkins 2020). Il rapporto  $C / N$  appropriato in particolare, varia a seconda del substrato e dei microrganismi utilizzati (Li and Wilkins 2020).

Infine, una volta raggiunto il contenuto massimo di PHA all'interno del reattore di accumulo, la biomassa batterica arricchita in PHA, verrà raccolta e avverrà il processo di recupero ed estrazione del polimero (Kourmentza et al. 2017).

#### **1.5.4.5. METODI DI ESTRAZIONE DEL PHA: ESTRAZIONE CON SOLVENTE E DISSOLUZIONE SELETTIVA NPCM (NON-PHA CELL MASS)**

Una volta che il PHA è stato accumulato per via intracellulare occorre estrarlo dalle cellule batteriche in diverse fasi: raccolta della biomassa, pretrattamento, recupero, accumulo, lavaggio ed essiccazione (Kourmentza et al. 2017).

La raccolta della biomassa consiste nella concentrazione della biomassa utilizzando tecniche come la filtrazione, centrifugazione o sedimentazione (Li and Wilkins 2020; Kourmentza et al. 2017). Il principale obiettivo del pretrattamento invece, è quello di facilitare il rilascio del PHA e quindi il suo recupero dalla biomassa microbica, fondamentalmente aumentando la permeabilità cellulare attraverso tecniche di essiccazione (liofilizzazione ed essiccazione termica), macinazione, pretrattamenti chimici e biochimici, ecc. (Kourmentza et al. 2017; Li and Wilkins 2020).

La fase di recupero e quindi di estrazione del PHA fa uso di due metodi principali: la solubilizzazione / recupero del PHA con solventi organici (estrazione con solvente) e dissoluzione selettiva della massa cellulare non PHA (NPCM) con sostanze chimiche (ad esempio tensioattivi o agenti chelanti) o enzimi (Samorì et al. 2015; Kourmentza et al. 2017).

Diversi fattori influenzano la selezione del metodo adeguato di estrazione e recupero del PHA: il ceppo o i ceppi di produzione utilizzati, il tipo e la composizione di PHA, il contenuto di PHA nella biomassa batterica, la purezza del prodotto richiesta, la disponibilità di sostanze chimiche per il recupero di PHA e l'impatto del processo stesso sulle proprietà fisiche finali del PHA (Li and Wilkins 2020).

L'estrazione del PHA con solvente in particolare, si basa su un processo di solubilizzazione dello stesso mediante apposito solvente, che è in grado di sciogliere il PHA ed estrarlo dal restante materiale cellulare che lo circonda e relativa biomassa batterica (Li and Wilkins 2020).

L'estrazione con solvente è la tecnica più comunemente utilizzata per l'estrazione di PHA grazie alla sua semplicità di funzionamento; questo tipo di estrazione viene utilizzata quando è richiesta un'elevata purezza poiché non degrada il polimero e rimuove anche le endotossine delle cellule (Jacquel et al. 2008).

Per il recupero del PHA dalle cellule batteriche si possono utilizzare ad esempio dei solventi organici, in cui il polimero risulta solubile (solubilizzazione / recupero): i più utilizzati e performanti sono i solventi clorurati (cloroformio, triclorometano, diclorometano, 1,2-dicloroetano, acetone, 1,2-propilene carbonato ed etilene carbonato), questo è dovuto al fatto che i PHA sono solubili in solventi alogenati (clorurati in particolare) (Tarrahi et al. 2020; Bugnicourt et al. 2014). Questi solventi però, sono responsabili dello smog fotochimico e sono cancerogeni, il cui utilizzo sarebbe dunque da limitare in quanto il loro smaltimento risulta impattante (Li and Wilkins 2020; Raza, Abid, and Banat 2018). Il cloroformio e il diclorometano sono i solventi organici più

performanti, ma per via di quanto appena detto sono indesiderabili per le applicazioni industriali (Samorì et al. 2015).

Per realizzare questo processo sono necessarie quantità significative di questi solventi impattanti ed input di energia, creando quindi un potenziale contrappeso alla sostenibilità ed alla commercializzazione di questo materiale (Kourmentza et al. 2017).

Negli ultimi anni sono state studiate tuttavia molte alternative ecologiche e più sostenibili rispetto ai solventi clorurati (ad esempio, carbonato di propilene, etil acetato, metilisobutilchetone, liquidi ionici e fluidi supercritici) (Samorì et al. 2015), a tal riguardo, l'1,2-propilene carbonato è il solvente preferito a causa della sua natura tossica inferiore rispetto agli altri menzionati (Raza, Abid, and Banat 2018).

Un solvente di particolare interesse in questo ambito è il dimetil carbonato (DMC): si tratta di un solvente verde completamente biodegradabile e meno dannoso per l'uomo e l'ambiente rispetto alla maggior parte dei solventi altrimenti utilizzati (Samorì et al. 2015). La procedura può essere applicata direttamente a fanghi microbici concentrati (slurry) o su biomassa secca (liofilizzato), senza alcun pretrattamento prima dell'estrazione (aggirando una fase ad alta intensità energetica e costosa), offrendo un recupero del polimero molto elevato (> 85%) ed un'eccellente purezza (> 95%), senza degradazione / decomposizione del polimero e con possibilità di riciclaggio dello stesso solvente (Samorì et al. 2015).

L'ultimo passaggio infine, dopo l'estrazione del polimero, consiste nell'essiccare il solvente che contiene il PHA solubilizzato (una volta separato dal restante materiale cellulare) per permettere l'ottenimento del polimero di PHA, il quale, al fine di migliorarne l'aspetto qualitativo, può essere sottoposto ad un processo di lavaggio per rimuovere eventuali residui cellulari, e purificato per creare il prodotto finale (Li and Wilkins 2020; Kourmentza et al. 2017).

La maggior parte degli attuali produttori di PHA su larga scala vende PHA come materia prima sotto forma di pellet e polvere, i quali possono essere lavorati mediante estrusione convenzionale, stampaggio a iniezione, termoformatura e soffiaggio di film, d'altra parte, alcune aziende commercializzano il proprio PHA direttamente come prodotto finale con un'applicazione definita (Dietrich et al. 2017).

In alternativa all'estrazione con solvente, si può applicare una dissoluzione selettiva della massa cellulare non-PHA (NPCM) con sostanze chimiche o enzimi: l'applicazione di questa tecnica può avvenire direttamente su colture ad alta densità cellulare (bypassando la fase di disidratazione della biomassa che comporterebbe ulteriori costi di processo), ma è richiesta una quantità di additivo molto elevata (Samorì et al. 2015). Anche in questo caso, lo svantaggio è relativo alle acque reflue che devono essere recuperate, purificate e riciclate per soddisfare gli standard normativi del trattamento delle acque reflue e per mantenere bassi i costi del processo (Samorì et al. 2015). Inoltre, questo approccio è influenzato da una minore purezza del polimero di PHA, quindi è spesso necessaria una fase di purificazione aggiuntiva, tuttavia permette un recupero del polimero senza alcuna degradazione dello stesso (Samorì et al. 2015).

Nel caso della dissoluzione NPCM con tensioattivi, è stata esplorata un'ampia gamma di composti, inclusi anionici come il sodio dodecil solfato (SDS) e carbossilati di acidi grassi usati come tensioattivi anionici commutabili (SAS), tensioattivi cationici come l'esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB) o tensioattivi non ionici (tensioattivo polisorbato, Tween 20 e Triton X-100) (Samorì et al. 2015).

La disponibilità di tecnologie verdi ed economiche per recuperare i poliidrossialcanoati (PHA) dalla biomassa microbica è di fondamentale importanza dunque per lo sviluppo di una catena di produzione affidabile e sostenibile (Samorì et al. 2015). Infatti, per l'isolamento del prodotto finale sono necessarie fasi di lavorazione a valle molto onerose (raccolta, essiccazione cellulare, estrazione, recupero del prodotto, purificazione, ecc.), il cui rispettivo costo di lavorazione, secondo studi di letteratura, potrebbe rappresentare oltre il 30% del costo totale di produzione del PHA (Karasavvas and Chatzidoukas 2020).

#### **1.5.4.6. L'IMPIANTO B-PLAS**

Il progetto B-PLAS mira a realizzare impianti che consentano di convertire rifiuti alimentari, fanghi della filiera agroalimentare, fanghi di scarto ed altri residui organici in poliidrossialcanoati (PHA). L'obiettivo è quello di sfruttare il carbonio residuo contenuto in questi fanghi di risulta, applicando una serie di tecnologie semplici, affidabili ed economiche, che trasformino un rifiuto in un valore aggiunto come la bioplastica. La produzione è a basso costo proprio perché avviene a partire da un rifiuto, che sarebbe altrimenti stato smaltito con annessi costi, fornendo allo stesso tempo al mercato bioplastiche in grado di competere con quelle a base fossile.

I fanghi di depurazione in particolare sono un rifiuto che presenta varie problematiche sia economiche che ambientali, oltre i costi di smaltimento vanno aggiunti anche quelli per la loro movimentazione, con conseguenti impatti sia economici che ambientali. I costi di smaltimento sono altissimi: variano tra 5 e 120 € per tonnellata di fango tal quale ([site.unibo.it/b-plas](http://site.unibo.it/b-plas)).

Le attuali soluzioni di smaltimento sono: l'utilizzo come ammendanti previa disidratazione (56%), l'incenerimento (27%) o il conferimento in discarica (17%) ([site.unibo.it/b-plas](http://site.unibo.it/b-plas)).

Il fango utilizzato nell'impianto B-PLAS è di origine agroalimentare, proveniente dall'impianto di digestione anaerobica dell'azienda Caviro Extra.

L'impianto B-PLAS e relative unità di processo sono raffigurate in Figura 13.

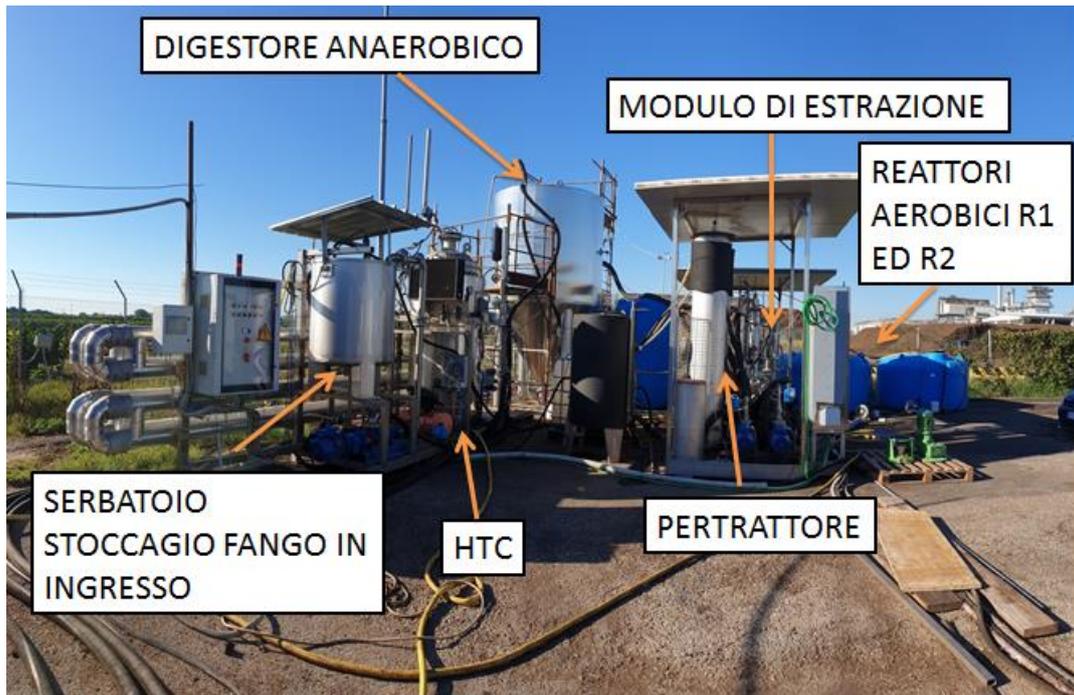


Figura 13. Impianto B-PLAS e relative unità di processo.

L'impianto B-PLAS più in dettaglio, si basa sull'integrazione di differenti unità di processo: un'unità di carbonizzazione idrotermale (HTC), un sistema di digestione anaerobica, un innovativo sistema di pertazione, un sistema di fermentazione aerobica costituito da due reattori in cui operano colture microbiche miste (MMC) ed un'unità di estrazione. Il fango di partenza di origine agroalimentare e proveniente dall'impianto di Caviro Extra, rappresenta in misura prevalente il digestato di risulta della digestione anaerobica, dunque già valorizzato per la produzione di biometano.

Le principali unità di processo facenti parte dell'impianto in questione sono:

1. Hydrothermal carbonization (HTC): trattamento idrotermale del fango proveniente direttamente dall'impianto di Caviro Extra; fango che viene prima accumulato all'interno di un recipiente da 1000 L integrato all'interno dell'impianto HTC.

Tale recipiente di accumulo del fango in ingresso è presentato in Figura 14.



Figura 14. Serbatoio di accumulo del fango in ingresso.

L'obiettivo di questa unità termochimica è quello di rendere biodisponibile la frazione di sostanza organica residua nel fango che diversamente non sarebbe utilizzabile ed accessibile ai microorganismi, determinando la solubilizzazione di circa la metà del COD presente nel flusso e fornendo sostanza organica prontamente fermentabile nella fase successiva.

Nel contesto B-PLAS tale materiale solubile viene utilizzato per la produzione di acidi grassi volatili (VFA), all'interno di un processo di fermentazione acidogenica.

Il reattore di carbonizzazione idrotermale consiste in un sistema che pressurizza il fango ad una pressione massima di 16-18 bar e lo porta ad una temperatura massima di 200 °C, lo mantiene miscelato e recupera il calore sensibile tramite uno scambiatore controcorrente (al fine di ridurre il consumo energetico). Il fango entra a temperatura ambiente e fuoriesce dal reattore a 60-65 °C, alimentando direttamente il digestore anaerobico.

Il reattore HTC è presentato in Figura 15.



Figura 15. Reattore HTC (Hydrothermal carbonization).

2. Digestore Anaerobico: serbatoio coibentato da 8,5 m<sup>3</sup> dotato di riscaldamento tramite resistenze elettriche. Un'immagine del digestore anaerobico dell'impianto è osservabile in Figura 16.



**Figura 16. Unità di digestione anaerobica per la produzione di VFA.**

L'impianto B-PLAS utilizza un sistema di digestione anaerobica per determinare la conversione della materia solubile in acidi grassi volatili (VFA): questo sistema viene alimentato con l'effluente della fase HTC per un tempo di residenza di circa 4 giorni, promuovendo la fermentazione acidogenica e la produzione di VFA, con ridotte produzioni di biogas. A partire dalle sperimentazioni di piccola scala, tale biogas da fermentazione acidogenica è principalmente composto da anidride carbonica, con quantità non rilevabili (<1%) di metano e idrogeno.

3. Pertrattore: il sistema innovativo di pertrazione ha lo scopo di estrarre selettivamente i VFA dalla soluzione arricchita degli stessi (brodo di coltura).

L'unità di pertrazione è mostrata in Figura 17.



**Figura 17. Modulo di pertrazione per l'estrazione selettiva di VFA.**

In pratica la pertrazione consiste nel trasferimento di un soluto, in questo caso acidi grassi volatili (VFA), da una soluzione lievemente acida (detta di alimentazione) ad una soluzione lievemente basica (detta ricevente), dalla quale questi vengono catturati e concentrati, tipicamente attraverso una membrana liquida selettiva. Nel contesto B-PLAS la soluzione di alimentazione è il contenuto filtrato del digestore anaerobico, mentre la soluzione ricevente è una soluzione alcalina ottenuta come acqua di risulta del processo stesso. Al fine di selezionare i VFA, l'impianto B-PLAS utilizza una "membrana liquida" di biodiesel (metil-esteri di acidi grassi C16-18 e C18 insaturi).

Da un punto di vista meccanico, si tratta di un sistema costituito da due recipienti di acciaio inossidabile da 300 L, collegati radialmente da due tubazioni orizzontali, a loro volta collegate radialmente da una tubazione verticale. Tale struttura viene riempita con le soluzioni di alimentazione e riceventi (che non vengono a contatto tra loro) e da biodiesel. Alle sommità dei recipienti vengono irrorate le due soluzioni, il che crea delle goccioline che si ricongiungono alla base del recipiente stesso, evitando il mescolamento della soluzione di alimentazione e della soluzione ricevente ed innescando una convezione naturale del biodiesel che si muove tra i due recipienti.

4. Due reattori aerobici (R1 ed R2): per la selezione e l'accumulo di batteri PHA-produttori.

Entrambi consistono in una vasca in polietilene da 5000 L, aerate tramite diffusori a bolle e continuamente miscelate.

I due reattori sono mostrati in Figura 18.



Figura 18. Reattori aerobici R1 e R2 per la selezione e l'accumulo di batteri PHA accumulatori.

Il reattore 1 (R1) viene inizialmente caricato con fango attivo prelevato dalle vasche aerobiche dell'impianto di depurazione di Caviro Extra (verrà valutata in alternativa, al fine di velocizzare lo start-up dell'impianto, l'uso di inoculo liofilizzato derivante dalla sperimentazione di laboratorio) e progressivamente alimentato in modo pulsato con la soluzione di VFA estratti nella fase precedente ed una soluzione contenente nutrienti (azoto e fosforo solubilizzati in acqua di pozzo) per la crescita batterica. Tale sospensione contiene una comunità microbica mista di batteri ambientali, definita fango PHA accumulatore. Tuttavia, in virtù delle modalità di alimentazione, tali batteri subiscono una selezione e si specializzano progressivamente nella capacità di accumulare PHA, producendo una comunità batterica relativamente stabile.

La selezione di questa comunità batterica, inducendo quest'adattamento di tipo ecologico in modo controllato, in particolare avviene attraverso l'applicazione di cicli feast-famine (descritto in dettaglio nei paragrafi precedenti), cioè alternanza di periodi di abbondanza e carestia derivanti dalla somministrazione intermittente di VFA e nutrienti.

In una fase successiva della sperimentazione, anziché acqua di pozzo potrà essere utilizzata un'aliquota del prodotto del processo B-PLAS, ovvero il surnatante del fango uscente (flusso) dalla digestione anaerobica, che risulta già arricchito di ammoniaca e permetterebbe di ridurre il consumo di azoto dell'impianto nonché l'utilizzo di soluzioni ammoniacali.

Successivamente, un'aliquota corrispondente di sospensione batterica viene trasferita, tramite un troppo pieno, al reattore aerobico 2.

Nel reattore 2 (R2) invece, i batteri selezionati vengono ulteriormente alimentati e fatti arricchire ancor più di PHA, tale sospensione infatti, incontra un'ulteriore aliquota di VFA e nutrienti, determinando la produzione di un fango arricchito di PHA.

Al termine di un tempo prefissato dalla già menzionata alimentazione, viene interrotta l'aerazione e la miscelazione del recipiente, causando la sedimentazione della biomassa arricchita in PHA. Al termine della sedimentazione, la sospensione sedimentata viene prelevata ed ulteriormente concentrata tramite un sistema di filtrazione tangenziale, determinando dunque la produzione di un fango più concentrato (il cosiddetto "fango rosa" o "slurry") e di una soluzione filtrata. Quest'ultima viene poi ricircolata all'interno del processo.

Lo slurry concentrato si presenta come un materiale pompabile ma significativamente viscoso che rappresenta il punto di partenza per l'estrazione del PHA. Lo slurry, attraverso una valvola di non ritorno, giunge nel sistema di estrazione pressurizzato a 4 bar, in tale sistema esso incontra un

quantitativo proporzionale di solvente dimetilcarbonato (DMC) che si miscela allo stesso attraverso il passaggio di opportune tortuosità nel sistema di estrazione.

5. Unità di estrazione (Figura 19): consiste in un sistema di estrazione in flusso pressurizzato, ovvero un insieme di reattori tubolari e scambiatori di calore, all'interno del quale avviene l'immissione del "fango rosa" già pressurizzato e del dosaggio del solvente organico utilizzato per l'estrazione (DMC).



**Figura 19. Sistema di estrazione del polimero PHA.**

Di seguito avviene la miscelazione delle fasi eterogenee (miscela eterogenea di PHA disciolto in DMC e fango rosa estratto, in rapporto 1:1) ed il riscaldamento della miscela a 110°C in un sistema pressurizzato. La miscela viene mantenuta a tale temperatura per un tempo di residenza prefissato (5-10 min) ed infine raffreddata tramite uno scambiatore controcorrente e portata alla temperatura di 40°C, necessaria alla fase successiva (la filtrazione).

In pratica il solvente DMC pressurizzato a caldo, è in grado di solubilizzare selettivamente il PHA all'interno dei batteri e, tramite semplice evaporazione sotto vuoto il PHA viene isolato dal solvente, che viene riciclato, restituendo come output il polimero puro.

Il DMC viene stoccato, nella misura di 10 L, all'interno di un apposito serbatoio di acciaio inossidabile, che funge anche da sistema di separazione (per decantazione) dell'acqua di sovrasaturazione.

La fase di filtrazione successiva, collegata al modulo di estrazione, consiste in un sistema di separazione solido / liquido che comprende una sequenza di filtri in acciaio sinterizzato in grado di separare la sospensione acquosa contenente i batteri estratti (centrato) e il PHA disciolto all'interno del solvente organico (filtrato). Il concentrato rappresenta il residuo del processo che viene inviato alla camera di stripping, la quale ha lo scopo di rimuovere e recuperare il solvente residuo tramite evaporazione e successivamente inviarlo in testa al processo (digestore anaerobico), al fine di convertire la sostanza organica residua e le tracce di DMC in VFA, a loro volta recuperati dal processo.

Il filtrato, che invece contiene il DMC, PHA ed umidità residua, viene depressurizzato tramite una backpressure valve e convogliato in una camera sottovuoto, dove il DMC e l'umidità residua evaporano rapidamente raffreddando la miscela e causando la formazione di un gel PHA/DMC.

Successivamente il DMC residuo viene lentamente rilasciato formando pellet o chips schiumosi di PHA (il prodotto finale dell'impianto), che si depositano sul fondo di un cestello rimovibile posto alla base dell'estrattore.

La camera sottovuoto contenente il PHA accumulato, viene riportata successivamente a pressione atmosferica tramite il flussaggio con una piccola quantità di azoto gassoso (99% v/v) o eventualmente CO<sub>2</sub> ottenuta dal processo (in un'ottimizzazione successiva).

Il sistema necessario a determinare la generazione del vuoto atto all'evaporazione del DMC, sia all'interno dell'essiccatore sottovuoto che all'interno della camera di strippaggio è una pompa centrifuga nota con il nome di eiettore Venturi.

## 1.6. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente studio di tesi riguarda il monitoraggio dell'impianto B-PLAS, un sistema innovativo di conversione dei rifiuti di origine agroalimentare (in particolare fanghi di depurazione della filiera agroalimentare) in poliidrossialcanoati (PHA). L'obiettivo generale del progetto è la produzione di una bioplastica potenzialmente idonea a varie applicazioni commerciali, competitiva in termini economici con altre bioplastiche presenti ad oggi sul mercato ed inserita in un contesto più ampio di economia circolare poiché prodotta a partire da scarti.

Nel contesto B-PLAS la produzione di PHA si basa sull'integrazione di 4 diverse tecnologie aventi un diverso grado di maturità industriale:

- 1) Carbonizzazione idrotermale (HTC);
- 2) Digestione anaerobica;
- 3) Produzione di PHA tramite colture microbiche miste (MMC);
- 4) Estrazione del PHA.

In Figura 20 è rappresentata una raffigurazione schematica dell'impianto in questione.

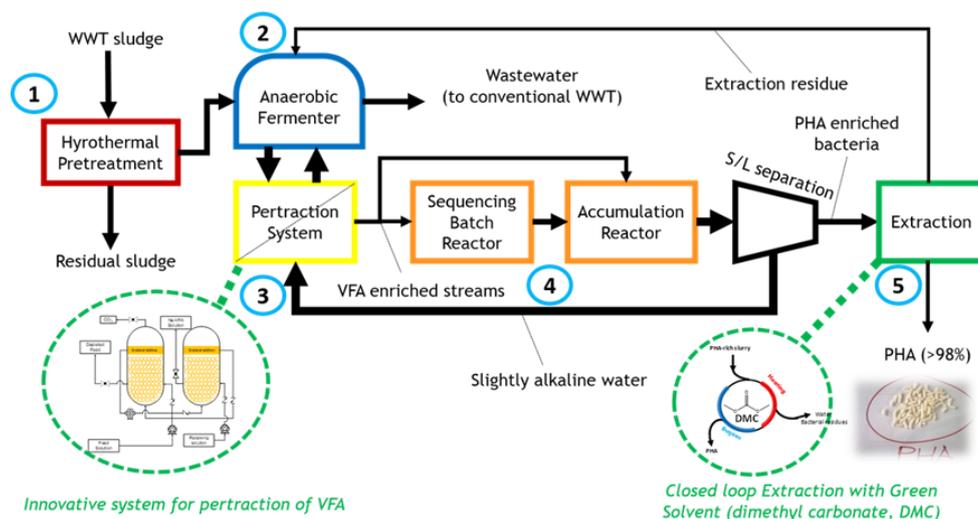


Figura 20. Schema dell'impianto B-PLAS.

Il monitoraggio dell'impianto è stato effettuato su tutte le sue fasi di produzione e processi aventi luogo all'interno di ogni singola unità produttiva, valutandone l'efficienza attraverso lo studio di parametri indicativi, con particolare attenzione al COD: tale parametro indica la frazione di carbonio organico disponibile per i microorganismi sia anaerobici che aerobici, ed è quindi strettamente correlato alle rese globali di processo.

Il PHA così ottenuto è stato estratto e sottoposto a caratterizzazione mediante determinazione del peso molecolare e delle proprietà termiche, aspetti di particolare interesse ai fini dell'applicabilità commerciale del polimero stesso.

Infine, il polimero ottenuto come output dall'impianto B-PLAS è stato quindi sottoposto ad uno studio comparativo in termini di biodegradabilità in condizioni aerobiche ad anaerobiche, ponendolo a confronto con altri biopolimeri quali: polibutilene adipato-co-tereftalato (PBAT), policaprolattone (PCL) e acido polilattico (PLA).

## CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI

### 2.1. SOLVENTI E REAGENTI

Tutti i reagenti ed i solventi utilizzati nel presente lavoro di tesi sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich ed utilizzati senza ulteriori purificazioni.

- Acetone ( $C_3H_6O$ )  $\geq 99.5\%$ , Sigma Aldrich;
- Acetonitrile ( $CH_3CN$ ) 99,8% , Sigma Aldrich;
- Acido 2-etilbutirrico ( $C_6H_{12}O_2$ ) 99%, Sigma Aldrich;
- Cloruro d'ammonio ( $NH_4Cl$ )  $\geq 99,5\%$ , Sigma Aldrich;
- Cloruro di calcio anidro ( $CaCl_2$ )  $\geq 93\%$ , Sigma Aldrich;
- Cloruro di sodio ( $NaCl$ ) 99,8 %, Sigma Aldrich;
- Cloruro ferrico esaidrato ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 97%, Sigma Aldrich;
- Diidrogeno ortofosfato di potassio ( $KH_2PO_4$ )  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich;
- Dimetil carbonato ( $C_3H_6O_3$ ) 99%, Sigma Aldrich;
- Idrogeno ortofosfato di dipotassio ( $K_2HPO_4$ )  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich;
- Idrogeno ortofosfato di disodio biidrato ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ )  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich;

- Solfato di magnesio eptaidrato ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )  $\geq 99,5\%$ , Sigma Aldrich;
- Le bioplastiche testate, sono state fornite dalla Prof.ssa. Chiara Gualandi del Dipartimento di Chimica “Giacomo Ciamician”.

## 2.2. MONITORAGGIO DELL’IMPIANTO B-PLAS

Per un’accurata descrizione del funzionamento dell’impianto B-PLAS si rimanda al paragrafo “1.5.4.6. L’IMPIANTO B-PLAS”.

Il monitoraggio dell’impianto B-PLAS è consistito nell’indagine e valutazione giornaliera di specifici parametri di interesse per ogni unità di processo del suddetto impianto, al fine di monitorare il funzionamento e l’andamento dei processi che hanno luogo all’interno delle stesse e relativa efficienza.

Il monitoraggio comprendeva il prelievo di campioni da ogni unità di processo, la preparazione di determinati campioni sul posto per una successiva analisi in laboratorio ed infine l’analisi dei campioni presso i laboratori “R. Sartori” dell’Università di Bologna, sede di Ravenna.

I campioni venivano riposti in apposite bottiglie in vetro e trasportati al fresco in un mini-frigo portatile, in modo tale da preservare e conservare al meglio i campioni per le analisi in laboratorio.

I campioni prelevati ed analizzati sono indicati e descritti in Tabella 3.

Tabella 3. Descrizione dei campioni prelevati ed analizzati per il monitoraggio dell’impianto B-PLAS.

DESCRIZIONE CAMPIONE	FOTO CAMPIONE	PUNTO DI CAMPIONAMENTO
Fango di depurazione in ingresso all’impianto		

<p>Fango post trattamento termico HTC</p>		
<p>Fango post digestione anaerobica</p>		
<p>Fango aerobico presente nel reattore aerobico 1 (R1) dove avviene la crescita e selezione dei batteri in grado di accumulare PHA</p>		
<p>Fango aerobico presente nel reattore aerobico 2 (R2), ricco di batteri che hanno accumulato PHA</p>		

Le analisi sul posto prevedevano, per ogni campione:

- Misura del pH mediante apposito pHmetro e preparazione di microvial per l'analisi dei VFA in laboratorio, questo per stabilizzare il campione ed evitare che durante il tragitto i batteri consumassero VFA e dunque ottenere risultati non indicativi.

L'analisi dei VFA è stata svolta mediante GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) (Figura 21).



Figura 21. Immagine del GC-MS utilizzato per le analisi dei VFA.

Le altre analisi in laboratorio consistevano nella determinazione di:

- COD (domanda chimica di ossigeno) totale e solubile (CODt e CODs) mediante lo strumento LAR's COD analyzer QuickCODlab (attraverso una curva di calibrazione costruita con glucosio come sostanza di riferimento) (Figura 22).



Figura 22. LAR's COD analyzer QuickCODlab per la determinazione del COD totale e solubile e relativa siringa di iniezione.

- Metapirolisi (solo per campioni di R1 ed R2) e successiva analisi mediante GC-MS per la determinazione della % di PHA (e relativa composizione polimerica) accumulata all'interno dei batteri PHA accumulatori ivi presenti.
- Estrazione con solvente (DMC) dello stesso PHA intracellulare, procedura svolta in scala di laboratorio al fine di valutare e testare delle strategie alternative di estrazione da ottimizzare, con lo scopo poi di implementare in impianto la strategia più biocompatibile.

- Caratterizzazione del polimero estratto, attraverso la determinazione del peso molecolare e relative proprietà termiche del materiale, rispettivamente mediante GPC (Gel Permeation Chromatography) e DSC Q2000 (Differential Scanning Calorimetry), realizzate presso i laboratori del Dipartimento di Chimica Industriale dell'Università di Bologna.

## **2.2.1. MONITORAGGIO FANGO DI DEPURAZIONE IN INGRESSO E TRATTAMENTO HTC**

Il monitoraggio del fango proveniente dai trattamenti anaerobici di CAVIRO EXTRA ed utilizzato come input dell'impianto B-PLAS, comprende in particolare, la determinazione del pH sul campo, VFA, COD<sub>t</sub> e COD<sub>s</sub>.

Il monitoraggio del pH viene realizzato semplicemente come parametro iniziale di controllo del fango, il quale in base alla sua provenienza si prevede sia vicino alla neutralità, in quanto un pH eccessivamente acido o basico potrebbe compromettere l'intero processo di produzione, sia in termini di danneggiamento delle componenti meccaniche che delle MMC anaerobiche ed aerobiche presenti nei successivi moduli del processo.

Per quanto riguarda invece la procedura di preparazione del campione per l'analisi dei VFA, essa consiste nel disporre 100 µl di campione appena prelevato dal serbatoio di stoccaggio del fango dell'impianto in dei microvial da GC, con aggiunta di 100 µl di standard interno (2-etil butanoato a 1000 ppm), 100 µl di KHSO<sub>4</sub>, 100 µl di NaCl ed 1 ml di DMC (dimetil-carbonato). Il campione verrà poi caricato in GC-MS per la quantificazione dei VFA.

In questo caso, l'analisi dei VFA viene effettuata semplicemente come controllo, in quanto il fango in questione è proveniente dall'impianto di digestione anaerobica di CAVIRO EXTRA, e dunque essendo stato già sottoposto a trattamento di digestione anaerobica ha già determinato la produzione di VFA (nella fase intermedia del processo, chiamata fermentazione acidogenica).

L'analisi dei CODs consisteva invece nel prelevare un'aliquota di campione di fango e disporla in delle provette, centrifugarle per 3 min a 5000 rpm, prelevarne il surnatante e diluirne il contenuto in maniera opportuna con acqua distillata e, di questo, 100 o 200 µl (in base alla curva di calibrazione utilizzata, rispettivamente alta o bassa) per ogni campione, sono stati iniettati nello strumento (LAR's COD analyzer QuickCODlab) mediante un'apposita siringa di precisione attraverso l'apposito setto di iniezione, realizzando due repliche per ogni analisi.

La procedura per l'analisi del COD<sub>t</sub> è la medesima, ma non è richiesta la centrifugazione dell'aliquota del campione.

In particolare, lo strumento LAR's COD analyzer QuickCODlab permette di misurare il COD (sulla base del metodo standard ASTM D6238-98) in maniera rapida (in soli 3 min), accurata, economica, senza l'uso di reagenti e catalizzatori, utilizzando temperature (1200 °C) elevate anziché sostanze chimiche per ossidare il campione. A 1200 °C tutti i composti organici vengono completamente ossidati, consentendo un'analisi completa della richiesta di ossigeno. Il campione viene dunque iniettato direttamente nel reattore, ossidato e misurato accuratamente con un rilevatore di gas O<sub>2</sub>.

Il COD<sub>s</sub> è uno dei parametri più significativi all'interno dell'impianto B-PLAS, in quanto indica la frazione di materia organica in input (rispetto a quella totale, definita appunto dal COD<sub>t</sub>) disponibile per i microorganismi per la conversione di quest'ultima in VFA (obiettivo del digestore

anaerobico) e successivamente nell'output dell'impianto ossia il PHA (ad opera dei microorganismi aerobici presenti in R1 ed R2).

La differenza tra CODt e CODs restituisce il COD insolubile, ovvero quella parte di frazione solida della materia organica non disciolta e che non è quindi disponibile per i microorganismi.

Per quanto concerne l'HTC, il monitoraggio del fango sottoposto a trattamento di carbonizzazione idrotermale ha visto valutati, il CODt e CODs, sempre attribuendo particolare importanza al COD solubile, in quanto il trattamento HTC ha proprio l'obiettivo di solubilizzare ancor più la materia organica presente nel fango fungendo da moltiplicatore del COD solubile, andando ad incrementare dunque il valore di tale parametro e rendendo biodisponibile anche quella parte della materia organica che altrimenti sarebbe stata inaccessibile per i microorganismi nella fase successiva di digestione anaerobica.

### **2.2.2. MONITORAGGIO DIGESTORE ANAEROBICO**

Per quanto concerne il monitoraggio del sistema di digestione anaerobica si è come sempre provveduto alla misurazione del pH, in questa situazione importante per garantire una certa stabilità di processo di produzione di VFA.

Dopodichè appunto, il parametro di maggiore interesse sono i VFA stessi, in quanto l'obiettivo del digestore anaerobico (ottimizzato in questo caso per una fermentazione acidogenica) è proprio quello di convertire il CODs in VFA, che sono i precursori metabolici dei PHA e dunque, facilmente poi convertibili in PHA dalla MMC presente nei due reattori aerobici.

Un altro aspetto rilevante da monitorare è la stessa composizione e distribuzione dei VFA, in quanto questi possono influenzare la composizione dei monomeri costituenti il PHA finale, dove VFA con un numero pari di atomi di carbonio tendono a produrre PHB mentre VFA con atomi di carbonio dispari tendono a produrre copolimeri PHB/HV ad esempio, con diverse frazioni molari % di HV.

Infine, non può mancare la determinazione del CODt e CODs, in quanto come detto, in questo processo è proprio il CODs che viene convertito in VFA dai microorganismi e dunque è possibile valutare una resa di conversione dello stesso CODs in VFA, stabilendo l'efficienza del sistema.

### **2.2.3. MONITORAGGIO DEI BIOREATTORI AEROBICI R1 ED R2**

Anche nei due reattori aerobici R1 ed R2, il punto di partenza del monitoraggio è il pH, il cui livello ottimale è sempre un valore vicino alla neutralità, atto a mantenere stabilità metabolica ed efficienza di conversione dei VFA, somministrati come fonte di carbonio, in PHA, evitando un'eventuale inibizione di tale attività.

Il CODt e CODs, oltre che il COD della frazione solida, sono allo stesso modo monitorati all'interno di queste due unità: il COD della frazione solida in particolare, in questo caso non è altro che la quantità di biomassa batterica presente all'interno di ogni reattore, mentre il CODs sarà

definito invece dalla concentrazione di VFA disciolti e biodisponibili in un dato momento, forniti come fonte di carbonio, per la conversione in PHA.

Le procedure di preparazione dei campioni prelevati da R1 ed R2 e relativa determinazione del CODt e CODs, sono le medesime descritte nei precedenti paragrafi.

Il monitoraggio prosegue poi con la determinazione del contenuto di PHA all'interno della biomassa batterica (e relativa resa di PHA dell'impianto), estrazione dello stesso e determinazione del suo peso molecolare e proprietà termiche.

### **2.2.3.1. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI PHA**

Nei due reattori aerobici R1 ed R2 avviene rispettivamente la selezione e crescita batterica della comunità microbica in grado di accumulare PHA, ed un ulteriore accumulo di PHA intracellulare. Al fine di determinare il contenuto di PHA in ciascuno dei due reattori, i campioni prelevati da R1 ed R2 sono stati inoltre sottoposti al processo di metapirolisi.

I campioni, come primo passaggio sono stati posti in delle provette previamente tarate (10 ml di ciascuno in ogni singola provetta), centrifugati per 5 min a 5000 rpm, ciò determina la formazione di un pellet o slurry (biomassa batterica PHA accumulatrice) (Figura 23) sul fondo della provetta che verrà riposto in freezer per 1 h, mentre il surnatante formatosi verrà gettato in quanto non di interesse ai fini di questa analisi.



**Figura 23. Pellet formato durante la centrifugazione dei campioni contenenti biomassa batterica PHA accumulatrice.**

Le suddette provette con la biomassa batterica sono poi state poste in liofilizzatore per 2 h (Figura 24), ciò permette l'eliminazione dell'acqua dalla sostanza organica, con il minimo deterioramento possibile della stessa e delle sue componenti. Sono state realizzate due repliche per ogni provetta.



Figura 24. Campioni durante il processo di liofilizzazione e posti in relativo liofilizzatore.

Una volta liofilizzati, i campioni verranno nuovamente pesati e trasferiti in dei vial in vetro da 4 ml il cui tappo era avvolto con della carta bagnata per evitarne l'eccessivo surriscaldamento.

I campioni vengono quindi posti su una piastra a 350 °C per 20 min per la realizzazione del processo di metapirolisi (Figura 25): questo metodo utilizza le linee base della pirolisi analitica ma evita l'utilizzo di un pirolizzatore e consente in maniera rapida e poco costosa di determinare la quantità di PHA presente nella biomassa.

Si tratta di un processo di decomposizione termochimica dei materiali organici, ottenuto attraverso la somministrazione di calore in assenza di un agente ossidante (ossigeno). Quindi, riscaldando il materiale in condizioni anossiche, questo subisce la scissione dei legami chimici originari con formazione di molecole più semplici.



Figura 25. Campioni sottoposti al processo di metapirolisi.

Una volta lasciati raffreddare i campioni, sono stati introdotti nei rispettivi vial, 100 µl di standard interno (2-etilbutirrato ad una concentrazione di 5000 ppm in acetonitrile) e 2 ml di acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), si agita il tutto e si attende la decantazione del pellet. Da ogni vial è stato poi prelevato 1

ml della soluzione e trasferito in microvial da GC al fine di determinare la quantità di PHA contenuta e la composizione del polimero PHA prodotto, attraverso GC-MS.

Un esempio di un cromatogramma ottenuto da una corrispondente analisi è presentato in Figura 26.

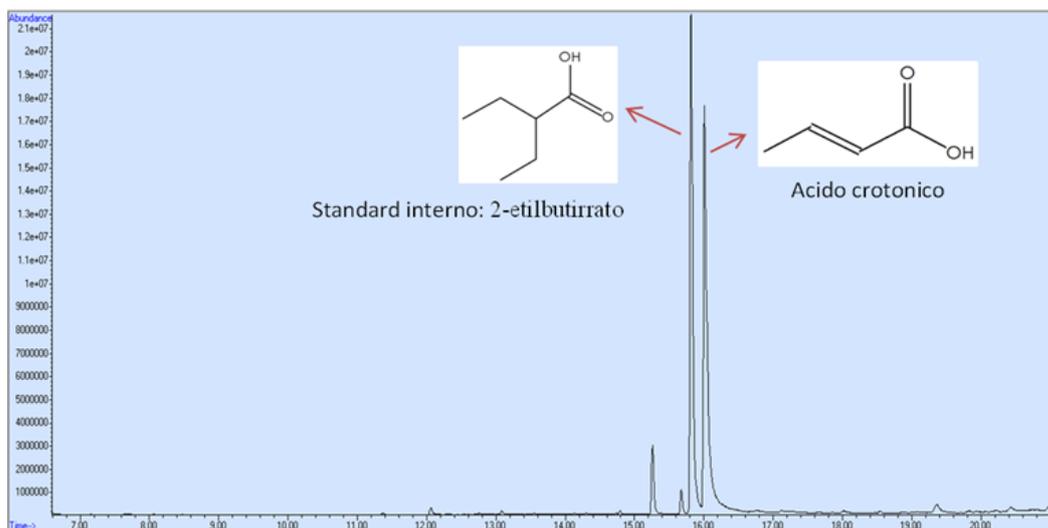


Figura 26. Un esempio di cromatogramma atto utilizzato per la quantificazione della % di PHA.

La quantificazione del contenuto di PHA viene effettuata attraverso la determinazione della quantità del principale prodotto di termolisi del PHA, ossia l'acido crotonico (o acido butenoico) nel nostro caso, in funzione dello standard interno (2-etilbutirrato). Nel presente cromatogramma, essendo presente solo l'acido crotonico come prodotto di termolisi, il tipo di PHA generato è il PHB (poliidrossibutirrato). In presenza invece, anche di un altro prodotto come ad esempio l'acido pentenoico, si evidenzia la presenza di un comonomero di idrossivalerato (HV) e quindi produzione di copolimero PHB-HV (poliidrossibutirrato-co-idrossivalerato), come si è altresì verificato in impianto.

Mediante tutti questi parametri è possibile infine, avendo una visione completa dell'impianto, determinare la resa di PHA prodotta come output dall'impianto B-PLAS e relativa resa di conversione del COD in ingresso nell'impianto in tutti i passaggi e le unità di processo precedentemente descritte, mediante un diagramma di Sankey.

### 2.2.3.2. ESTRAZIONE DEL PHA

L'estrazione del PHA dalla biomassa batterica è stata realizzata in laboratorio, al fine di individuare la procedura di estrazione ottimale sia in termini di efficienza che di biocompatibilità, ottimizzarla ed implementarla poi nel sistema di estrazione dell'impianto.

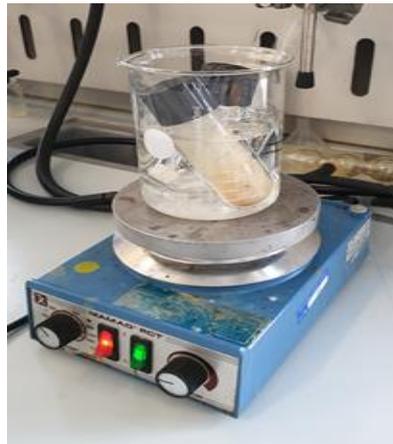
Il fango aerobico (1-5 L) è stato inizialmente centrifugato per 5 min a 5000 rpm in apposite provette Falcon fino ad ottenere uno slurry con il 10-20 wt% di contenuto secco (Figura 27).



**Figura 27. Slurry batterico ottenuto dalla centrifugazione di R2.**

Un'aliquota di slurry (pesata) è stata posta in vial da 4 ml, congelata in freezer per 1 h e posta poi in liofilizzatore per 2 h per determinare il contenuto di acqua del campione e di conseguenza il relativo peso secco.

Il restante slurry viene pesato ed inserito all'interno di un provettone di vetro ed addizionato con dimetil carbonato (DMC), in quantità da definire in tale processo di ottimizzazione. Il tutto è posto in agitazione a caldo (100 °C) (Figura 28).



**Figura 28. Processo di estrazione con solvente del polimero.**

Una volta completata questa operazione, il DMC contenente il PHA solubilizzato estratto dalla biomassa microbica risulterà ben separato da essa.

A questo punto, con una pipetta pasteur in vetro, si provvede a recuperare quanto più solvente possibile e porlo in un recipiente che sarà poi sottoposto ad essiccazione sotto flusso di azoto (Figura 29).



Figura 29. DMC con polimero solubilizzato separato dalla biomassa batterica e posto sotto flusso di azoto.

Una volta essiccato tutto il solvente, sarà osservabile la formazione di un film di PHA, che sarà lavato con acetone per eliminare eventuali impurezze (Figure 30 e 31).

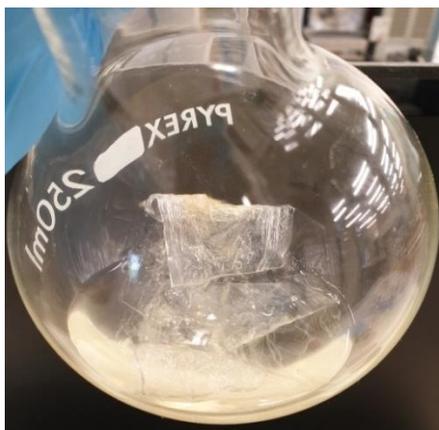


Figura 30. Polimero estratto sottoposto a lavaggio con acetone.



Figura 31. Polimero finale ottenuto dal processo di estrazione.

Lo stesso procedimento è stato applicato a campioni liofilizzati o per i quali è stato prima aggiunto un agente flocculante di varia natura che facilita la precipitazione in breve tempo ed un miglior recupero della biomassa solida. In quest'ultimo caso la procedura è stata applicata previa flocculazione del campione, aggiungendo l'agente flocculante al fango in rapporto 1:20 (Figura 32).



Figura 32. Processo di flocculazione in seguito ad aggiunta dell'agente flocculante nel fango prelevato da R2.

Con tutti i dati ottenuti attraverso queste operazioni, è stata poi determinata la quantità di biomassa secca presente nel campione, la massima quantità di polimero potenzialmente estraibile (considerando una resa di estrazione del 100%) e quindi la resa effettiva di estrazione del PHA attraverso questa procedura.

### **2.2.3.3. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE E DELLE PROPRIETA' TERMICHE DEL POLIMERO**

Il polimero estratto è stato poi sottoposto ad una caratterizzazione del materiale, al fine di determinare le sue principali proprietà e potenzialità applicative, in primo luogo attraverso la valutazione del peso molecolare mediante Gel Permeation Chromatography (GPC) (Figura 33) ed in secondo luogo mediante la valutazione delle sue proprietà termiche, con particolare attenzione alla temperatura di fusione ( $T_m$ ), attraverso Differential Scanning Calorimetry (DSC) (Figura 34).

E' stato testato sia il polimero estratto da R1 che da R2, confrontandoli con il valore del peso molecolare e della  $T_m$  di un PHB commerciale.



Figura 33. Immagine del GPC utilizzato per la determinazione del peso molecolare del polimero estratto.



Figura 34. Immagine del DSC utilizzato per la determinazione delle proprietà termiche del polimero.

In un'analisi in GPC, il campione di polimero viene prima disciolto in apposito solvente (in questo caso cloroformio), iniettato nella fase mobile a flusso continuo dello stesso solvente (1 ml/min) mediante un'apposita siringa di iniezione e quindi pompato attraverso una colonna costituita dalla fase mobile stessa e da una fase stazionaria di particelle porose, tutte impaccate all'interno della colonna; queste fungono da filtro trattenendo via via le molecole di minori dimensioni, separando il materiale in base alle dimensioni delle molecole polimeriche. Tale strumento utilizza poi un singolo rivelatore di concentrazione ad indice di rifrazione differenziale, il quale indica la quantità di materiale eluita dalla colonna in un dato tempo di ritenzione. Questo dato viene quindi convertito in peso molecolare e relativa distribuzione, mediante l'uso di una curva di calibrazione, generata dal comportamento di eluizione di 3 standard polimerici monodispersi di polistirene (PS) dal peso molecolare noto, utilizzati appunto per la calibrazione.

Per l'analisi DSC, i campioni sono stati sottoposti a 2 cicli termici passando da  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un flusso di calore di  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , il primo atto a rimuovere la storia termica del materiale ed il secondo dedicato allo studio delle proprietà senza la presenza di eventuali picchi anomali che sono stati dunque rimossi dal primo riscaldamento.

Per transizioni termiche si intendono: la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), la temperatura di cristallizzazione ( $T_c$ ) e la temperatura di fusione ( $T_m$ ), tutte e tre influenzanti le proprietà meccaniche dei polimeri, tuttavia ai fini di questo studio risulta di maggiore interesse la  $T_m$ .

I polimeri semicristallini (come nel nostro caso) possiedono dunque sia una fase amorfa che una cristallina, e quindi tutte e 3 le transizioni termiche indicate sono osservabili.

Nel termogramma risultante dell'analisi in GPC infatti, per la  $T_m$  in particolare (fenomeno endotermico), osserveremo un picco rivolto verso l'alto che corrisponde proprio all'aumento del flusso di calore in quanto, oltre una certa  $T$ , l'agitazione molecolare è tale da vincere le forze di coesione nei cristalli i quali dunque si rompono (fondono) assorbendo calore.

## 2.3. TEST DI BIODEGRADAZIONE AEROBICA

Il poliidrossibutirrato (PHB), il polibutilene adipato-co-tereftalato (PBAT), il policaprolattone (PCL) e l'acido polilattico (PLA) sono stati selezionati per i test di degradazione aerobica ed anaerobica.

Nel test di biodegradazione aerobica è stato utilizzato un mezzo minerale acquoso preparato secondo il Protocollo OECD 301F (301 A) costituito da 4 soluzioni stock:

### SOLUZIONE A:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2,125 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 5,4375 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 7,5056 g
- $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 0,125 g
- Sciolti in  $\text{H}_2\text{O}$  di rubinetto e portati a 250 ml in beuta grande.

### SOLUZIONE B:

- $\text{CaCl}_2$ : 0,6875 g
- Sciolti in  $\text{H}_2\text{O}$  di rubinetto e portati a 25 ml in beuta piccola.

### SOLUZIONE C:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5625 g
- Sciolti in  $\text{H}_2\text{O}$  di rubinetto e portati a 25 ml in beuta piccola.

### SOLUZIONE D:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0,00625 g
- Sciolti in  $\text{H}_2\text{O}$  di rubinetto e portati a 25 ml in beuta piccola.

Dopodichè 10 ml della soluzione A sono stati inseriti in 800 ml di acqua di rubinetto e di seguito sono stati aggiunti: 1 ml di B, 1 ml di C ed 1 ml di D, infine il tutto è stato portato ad 1 L con acqua di rubinetto.

100 ml di questa soluzione sono stati poi prelevati ed inseriti in una beuta assieme a 0,24 g di batteri liofilizzati, provenienti dall'impianto di depurazione di Ravenna (Dicembre 2019) (inoculo).

Un'ancoretta magnetica è stata poi posizionata all'interno della beuta disposta su di una piastra magnetica, al fine di esercitare agitazione magnetica alla soluzione per l'attivazione dei batteri stessi (per 7 giorni) e con lo scopo di farli acclimatare a temperatura ambiente.

Infine è avvenuta la preparazione di 12 bottiglie di vetro con all'interno di ognuna 250 ml della soluzione stock finale (acqua+A+B+C+D) con aggiunta di circa 100 mg di bioplastica (sotto forma di polvere o film) pesata mediante bilancia elettronica e 5 ml della soluzione con batteri attivati posta precedentemente in agitazione; le bottiglie sono state poi tappate con dei tappi in tessuto che permettevano il passaggio di aria, garantendo dunque le condizioni aerobiche.

Sono stati inoltre realizzati due bianchi da utilizzare come confronto, costituiti esclusivamente da 250 ml soluzione stock + 5 ml di soluzione con batteri attivati.

Le bioplastiche in polvere vengono pesate ed inserite tal quali nelle bottiglie in vetro, mentre per quanto riguarda i campioni in film, questi sono stati realizzati a partire dalle polveri stesse, solubilizzate in cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ ) che è stato poi fatto evaporare.

Una volta completata l'operazione di preparazione dei campioni, le bottiglie sono state sistemate al buio e a temperatura ambiente per un giorno, per una loro stabilizzazione; dopodichè sono state collocate in stufa a 55 °C per lo studio della biodegradazione aerobica delle bioplastiche in esse presenti, da parte della comunità batterica mista presente nell'inoculo (Figura 35).



**Figura 35. Campioni per lo studio della biodegradabilità aerobica posti in stufa.**

Per la valutazione della biodegradabilità di queste bioplastiche, è stata svolta in primo luogo un'attività periodica di monitoraggio del COD solubile, del contenuto di ogni bottiglia, previa centrifugazione del campione.

Una volta completato il test, al fine di valutare la biodegradazione dei materiali testati, il contenuto di ciascuna bottiglia è stato filtrato sottovuoto ed il filtro è stato estratto con cloroformio (Figura 36) al fine di recuperare il polimero.



**Figura 36. Processo di filtrazione sotto vuoto dei campioni aerobici.**

Prima dell'estrazione con solvente, ogni filtro è stato tagliato in 4 parti uguali e posto all'interno di un vial con 40 ml di cloroformio ed un'ancoretta magnetica: il campione è stato dunque sottoposto ad agitazione magnetica su apposita piastra per 2 giorni, permettendo la solubilizzazione e quindi l'estrazione da parte del solvente dei residui polimerici post biodegradazione (Figura 37).



**Figura 37. Processo di estrazione con solvente (cloroformio) dei filtri contenenti i residui polimerici.**

La soluzione (solvente + polimero estratto) è stata essiccata sotto flusso di azoto e determinato poi il peso del residuo polimerico estratto; se all'interno della bottiglia invece, risultava ancora presente il polimero fisicamente quasi integro e dunque poco degradato, questo è stato prelevato a parte dal resto della soluzione e pesato: la differenza in peso rispetto a quello del polimero iniziale è un'indicazione della perdita in peso per ogni materiale.

I campioni polimerici estratti sono stati poi sottoposti ad analisi elementare (CHNS) mediante Organic Elemental Analyzer Flash 2000 Thermo Scientific (Figura 38), a scopo di confronto con la medesima analisi elementare svolta prima del test di biodegradazione.

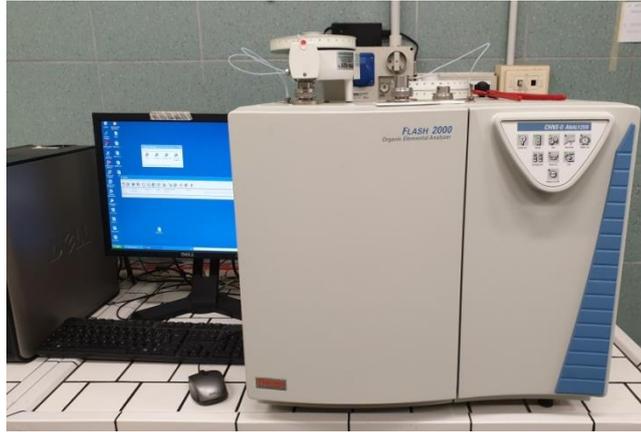


Figura 38. Analizzatore elementare utilizzato per la determinazione della % di C, H, N, e S.

## 2.4. TEST DI BIODEGRADAZIONE ANAEROBICA

In un primo test di degradazione anaerobica sono state testate bioplastiche sotto forma di polvere, mentre in un successivo test i campioni sotto forma di film per valutare l'effetto dello stato fisico del materiale polimerico sulla sua suscettibilità alla degradazione.

In questo caso, il fango attivo in ingresso nell'impianto B-PLAS è stato utilizzato come inoculo per la realizzazione del test, previa filtrazione attraverso una doppia retina, per l'eliminazione della frazione più grossolana.

20 ml di questo fango filtrato (inoculo) + circa 100 mg di bioplastica sono stati inseriti in ciascuna siringa (reattore).

Sono stati realizzati inoltre dei bianchi da utilizzare come confronto, con siringhe contenenti solo 20 ml di fango, ogni reattore è stato realizzato in duplicato.

Una volta completata la preparazione dei reattori, questi sono stati incubati in stufa a 55 °C (termofilia) in assenza di ossigeno (condizioni anaerobiche) (Figura 39).



Figura 39. Reattori anaerobici per lo studio della biodegradabilità anaerobica poste in stufa.

Erano inizialmente a disposizione campioni in polvere e dunque a partire da questi sono stati realizzati i film attraverso la medesima procedura illustrata nel paragrafo precedente.

A differenza delle altre bioplastiche, la preparazione del film di PHB ha necessitato di scaldare la soluzione di cloroformio a 50 °C per avere una solubilizzazione del polimero ottimale.

Nel presente studio, il monitoraggio di biodegradazione è stato eseguito mediante la valutazione della produzione di biogas (metano ed anidride carbonica) nel tempo, da parte della comunità microbica mista in ciascun reattore, oltre che mediante l'analisi dei CODs del contenuto di ogni reattore e la determinazione della produzione di VFA all'interno dello stesso.

La misurazione del volume di biogas prodotto in ogni reattore è stata effettuata grazie all'apposita scala graduata presente su ogni siringa e, se tale volume consisteva almeno in 10 ml di biogas questo veniva prelevato mediante apposita siringa ed iniettato ed analizzato in GC-TCD (Gas chromatography - thermal conductivity detector).

Analogamente al test di degradazione aerobica, è stato valutato il COD solubile nel tempo e la produzione di VFA mediante GC-MS.

## CAPITOLO 3 – RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1. MONITORAGGIO FANGO DI DEPURAZIONE IN INGRESSO E TRATTAMENTO HTC

L'attività di monitoraggio ha avuto inizio a partire dall'input dell'impianto, ossia il fango proveniente dall'impianto di digestione anaerobica di CAVIRO EXTRA: tutti i parametri di interesse determinati sono riportati nel Grafico 1.

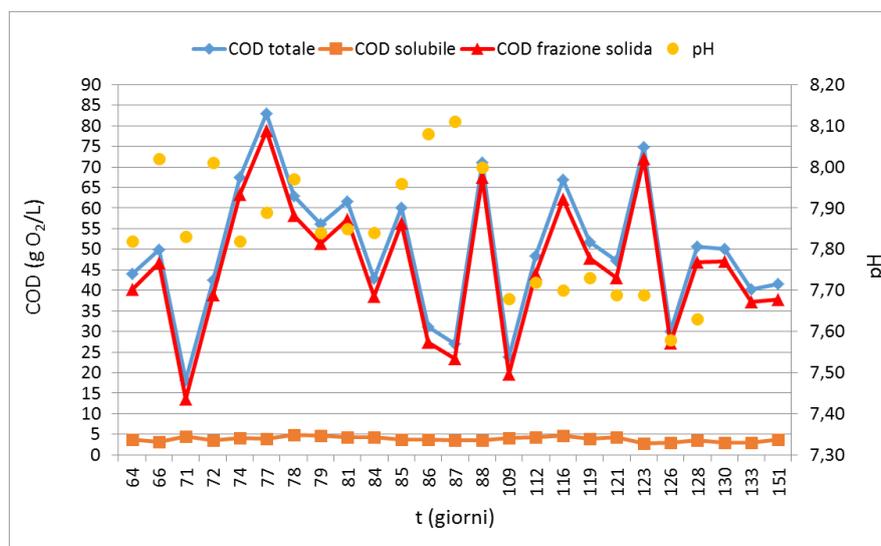


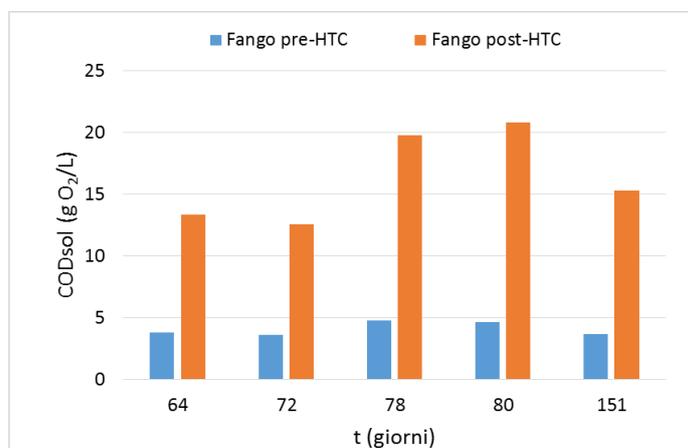
Grafico 1. Monitoraggio nel tempo del COD (g O<sub>2</sub>/L) e del pH del fango attivo in ingresso nell'impianto B-PLAS.

**COD.** Il contenuto di materia organica totale (definita dal COD<sub>t</sub>) del fango varia da 20 a 80 gCOD/L, poiché il campione di fango proviene dalla digestione anaerobica di rifiuti di origine agroindustriale, la cui composizione può essere inevitabilmente variabile e risentire della stagionalità delle attività produttive del sito di Caviro. Al contrario, il COD<sub>s</sub>, che è il parametro di maggiore interesse per le questioni sopra indicate, resta abbastanza costante ( $4,12 \pm 0,57$  gO<sub>2</sub>/L).

**pH.** Il pH (7,60 – 8,10) rimane anch'esso abbastanza stabile attorno a valori neutri o minimamente alcalini, e ciò è ottimale e non implica alcuna compromissione del processo di produzione dell'impianto o eventuale correzione del pH.

**VFA.** Come ipotizzabile, data la natura del fango in ingresso (già sottoposto al processo di digestione anaerobica), l'analisi dei VFA ha evidenziato una totale assenza di questi intermedi chimici.

Questo fango viene poi convogliato dal recipiente di stoccaggio al sistema di carbonizzazione idrotermale (HTC), il quale ha l'obiettivo di incrementare il COD<sub>s</sub> andando a solubilizzare ulteriore materia organica altrimenti inaccessibile ai microorganismi, riducendo quindi in egual misura il COD della frazione solida. Questo step risulta di fondamentale importanza nel trasformare il fango in ingresso indigeribile (poiché già frutto di un processo di fermentazione anaerobica) in una fonte di carbonio ulteriormente fermentabile in VFA da batteri anaerobici. In tal senso, la solubilizzazione del COD ad opera del processo di HTC, relativamente ad alcuni esempi indicativi, è rappresentata nel Grafico 2.



**Grafico 2. Solubilizzazione del COD ad opera del processo HTC.**

Come si può osservare, a partire da un valore di COD<sub>s</sub> medio del fango in ingresso nel sistema HTC di  $4,12 \pm 0,57$  gO<sub>2</sub>/ L, si ottiene in seguito a trattamento di carbonizzazione idrotermale un COD<sub>s</sub> medio di  $16,36 \pm 3,75$  gO<sub>2</sub>/ L, con un aumento di tale parametro di circa 4 volte, grazie all'effetto moltiplicatore svolto dal sistema HTC.

Grazie al trattamento HTC quindi le macromolecole presenti nel fango in input possono essere termo-chimicamente "rotte" in monomeri/oligomeri solubili in acqua e maggiormente accessibili alle comunità microbiche.

### 3.2. MONITORAGGIO DIGESTORE ANAEROBICO

Nel digestore anaerobico avviene il processo di fermentazione acidogenica che determina quindi la conversione della materia organica biodisponibile (determinata dai CODs) in VFA.

I parametri in questione derivanti dall'attività di monitoraggio sono presentati nel Grafico 3.

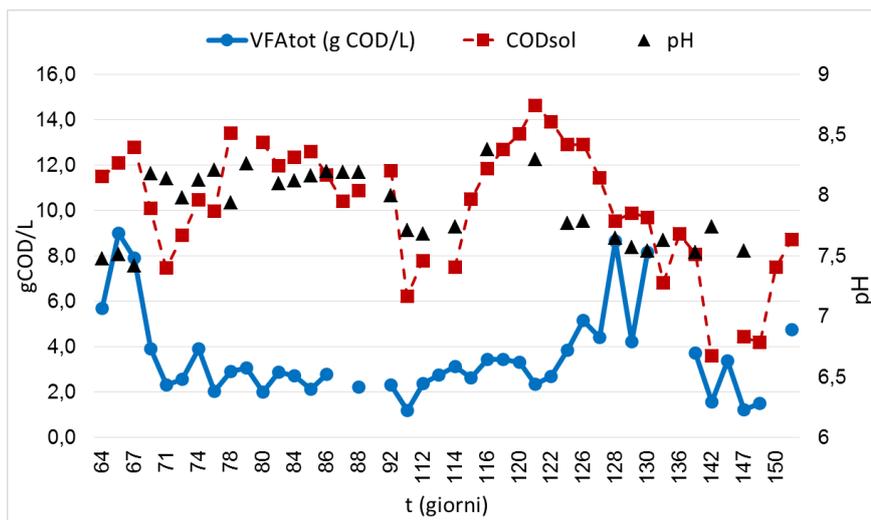


Grafico 3. Monitoraggio nel tempo del CODsol, VFAtot e pH nel digestore anaerobico.

*pH.* Come nel precedente caso, il pH è un fattore critico estremamente importante per garantire una normale attività metabolica da parte delle comunità microbiche anaerobiche del digestore, infatti la maggior parte degli enzimi non riesce a tollerare ambienti ostili acidi ( $\text{pH} < 3$ ) o alcalini ( $\text{pH} > 12$ ); al contrario l'attività enzimatica risulta più efficiente a pH vicini alla neutralità.

Il pH come si può osservare, si è mantenuto ad un intervallo ottimale tra i 7,4 ed 8,3 (neutro-minimamente alcalino) e non ha influenzato o inibito quindi l'attività metabolica di conversione della materia organica disciolta in VFA.

*COD.* L'andamento del COD solubile del fango presente nel digestore anaerobico risulta molto variabile nel tempo (da 3,60 a 14,60 gCOD/L), assumendo un valore medio di  $10,21 \pm 2,76$  gCOD/L, che risulta dunque minore rispetto a quello del fango post trattamento HTC: la ragione principale è che una parte (variabile) del CODs liberato dal processo di HTC viene trasformata in biogas.

*VFA.* Allo stesso modo l'andamento dei VFA risulta molto variabile (da 1,2 a 9 g COD/L), con un valore medio di  $3,55 \pm 1,95$  gCOD/L, ciò dipende sia dall'andamento del CODs che dalla capacità del sistema di digestione anaerobica di convertire di volta in volta il CODs in VFA.

Il Grafico 4 riporta la conversione (%) del COD solubile in VFA ad opera del sistema di digestione anaerobica.

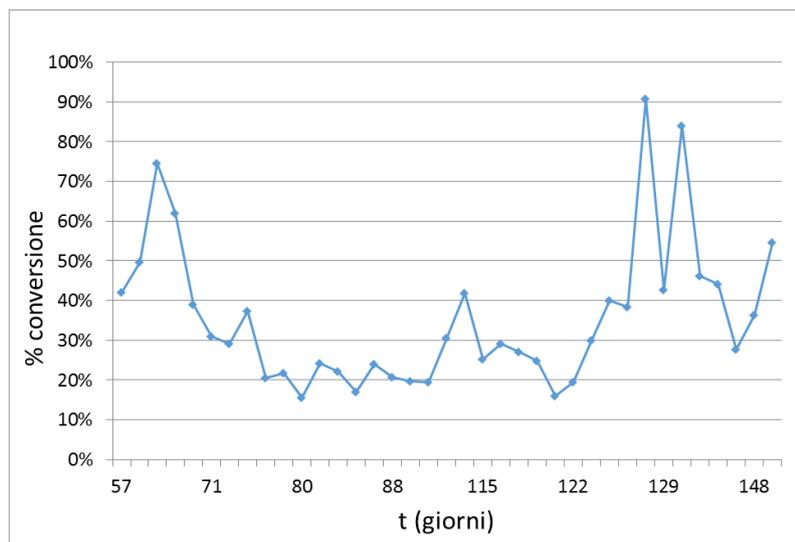


Grafico 4. Resa % di conversione del COD solubile in VFA.

La conversione (%) del CODs in VFA ad opera delle comunità microbiche anaerobiche è molto variabile (20-90%), fenomeno attribuibile sia all'operatività variabile dell'impianto che all'attività microbica, in quanto quella parte di CODs non convertita in VFA è probabilmente in parte convertita in biogas ed in parte semplicemente non consumata dai microorganismi; altro fattore determinante è sicuramente una certa variabilità nella composizione del fango in ingresso nell'impianto B-PLAS. Tale resa di conversione, ad oggi in media è del 35%.

Nel Grafico 5 viene indicata invece, relativamente ad alcuni esempi, la tipica composizione di VFA prodotti nel processo in questione, aspetto importante che può influenzare la composizione dei monomeri costituenti il PHA finale in uscita dall'impianto.

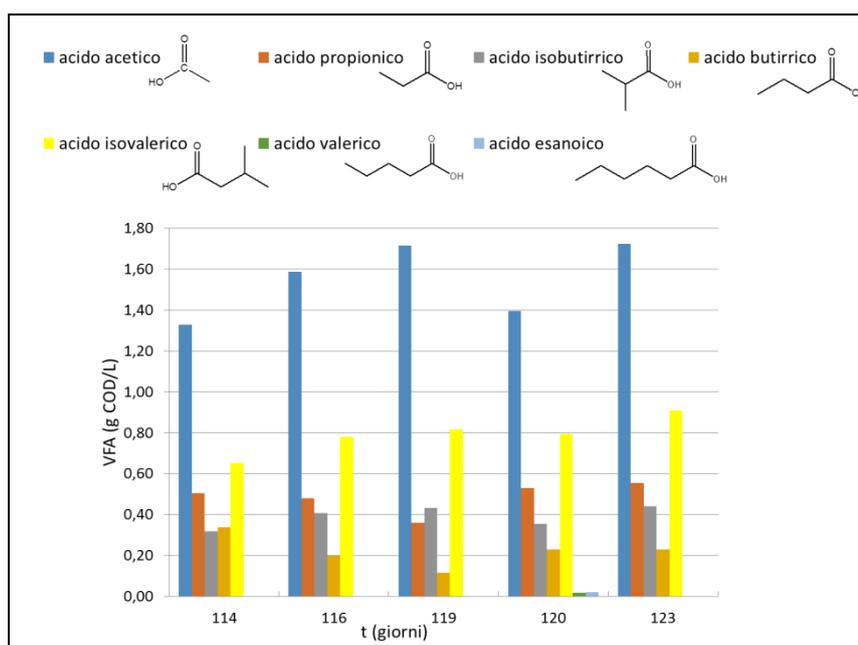


Grafico 5. Composizione tipica di VFA prodotti nel processo di fermentazione acidogenica.

Dal grafico in questione si evince che gran parte della materia organica solubile viene convertita in acido acetico (45%) ed in secondo luogo in acido isovalerico (23%), dopodichè in misura minore e più variabile troviamo acido propionico, acido isobutirrico ed acido butirrico; talvolta sono osservabili in tracce anche acido valerico ed acido esanoico.

Una review di Atasoy et al. (2018) sulla composizione tipica di VFA prodotti da differenti flussi di rifiuti (compresi quelli di origine agroindustriale) in sistemi di digestione anaerobica, ha indicato come il tipo di substrato, gli enzimi chiave che prendono parte al processo e le condizioni operative abbiano un ruolo determinante sulla composizione di VFA prodotti in un sistema di colture microbiche miste.

L'acido acetico rappresenta il 30-80% dei VFA prodotti da questi flussi e costituisce il componente maggiormente prodotto. L'acido isovalerico e gli altri tipi di VFA sono generalmente prodotti in quantità relativamente basse (<17%). La ragione della differenza nella composizione dei VFA prodotta dai flussi di rifiuti può essere spiegata dalle caratteristiche del contenuto di materia organica: è stato dimostrato che mentre i flussi di rifiuti ricchi di carboidrati supportano la produzione di acido propionico e butirrico, la produzione di acido valerico ed iso-valerico è supportata da flussi di rifiuti ricchi di proteine (Garcia Aguirre et al. 2017; Shen et al. 2014). Il fatto che i substrati ricchi di proteine supportino la produzione di acido valerico, è stato confermato in uno studio con substrati ricchi di proteine, tofu e albume d'uovo, dove l'acido valerico rappresentava il 18-25% di VFA totale prodotto, essendo il secondo più alto dopo l'acido acetico (Shen et al. 2017).

L'acido propionico è supportato invece da acque reflue ricche di glicerolo: è stato osservato che il flusso di rifiuti con l'84,7% del carbonio organico totale sotto forma di glicerolo producevano VFA costituiti prevalentemente da acido propionico al 90,5% (Shen et al. 2014). Tuttavia, un altro studio di Silva et al. (2013) ha mostrato risultati contrastanti per il flusso di rifiuti di glicerolo, dove l'80% dei VFA prodotti era acido acetico, con acido propionico che rappresentava meno del 20% (Silva et al. 2013), tuttavia è stato dimostrato che le condizioni operative avrebbero potuto spiegare tale differenza.

Per quanto riguarda l'acido esanoico infine, esso non viene mai rilevato in quantità significative.

### **3.3. MONITORAGGIO DEI BIOREATTORI AEROBICI R1 ED R2**

Il monitoraggio di R1, reattore in cui avviene la selezione dei batteri accumulatori di PHA alimentato con i VFA prodotti dal precedente passaggio di fermentazione acidogenica, si basa sulla determinazione dei parametri pH, CODs e biomassa batterica (Grafico 6).

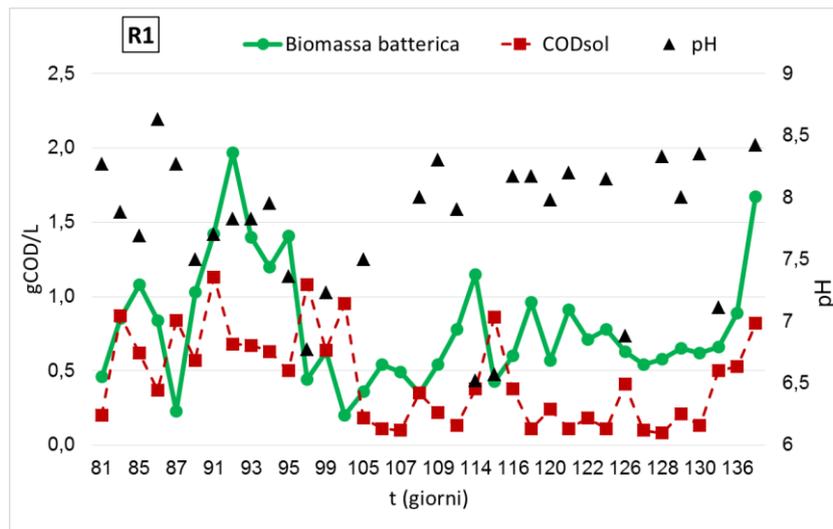


Grafico 6. Andamento del pH, Biomassa batterica e COD solubile in R1.

*pH.* Il pH (6,5 – 8,5) è rimasto all'interno dell'intervallo ottimale affinché ci possa essere una stabilità della composizione della comunità microbica (Villano et. al 2010); è necessario tenere inoltre in considerazione il fatto che la maggior parte dei batteri non estremofili cresce in un ampio intervallo di valori di pH (da 5,5 a 9,0), mantenendo un pH citoplasmatico nel ristretto intervallo di 7,4-7,8, che è compatibile con integrità funzionale e strutturale ottimale delle proteine citoplasmatiche che supportano la crescita batterica (Pittmann and Steinmetz 2017).

*COD.* Il CODs in questo caso è costituito di fatto dai VFA provenienti dal digestore anaerobico forniti come fonte di carbonio ai microorganismi, biodisponibili in un dato momento e che verranno potenzialmente convertiti in PHA intracellulare.

I valori di CODs in questione assumono un'ampia variabilità (0,1-1,13 gO<sub>2</sub>/L) ma ciò dipende dal dato momento in cui è stato effettuato il campionamento e quindi dai VFA (sotto forma di CODs) rimanenti nel reattore che ancora non sono stati convertiti in PHA, in relazione ad esempio ad un differente metabolismo dei vari ceppi presenti nella comunità batterica mista; il valore medio durante il periodo in esame è stato di 0,44 ±0,31 gO<sub>2</sub>/L.

*Biomassa batterica.* Tale parametro non è altro che il COD della frazione solida, di fatto costituita appunto dalla comunità batterica PHA accumulatrice presente nel reattore ed è dunque possibile osservare nel grafico, mediante questo parametro, la crescita stessa della comunità batterica nel tempo. Il valore medio della biomassa batterica presente nel bioreattore 1 è di 0,79 ±0,41 gO<sub>2</sub>/L, con picchi massimi di 2 gO<sub>2</sub>/L.

Il monitoraggio esattamente degli stessi parametri ha avuto luogo per il bioreattore di accumulo R2, in cui i batteri aerobici dovrebbero arricchirsi in PHA intracellulare (Grafico 7).

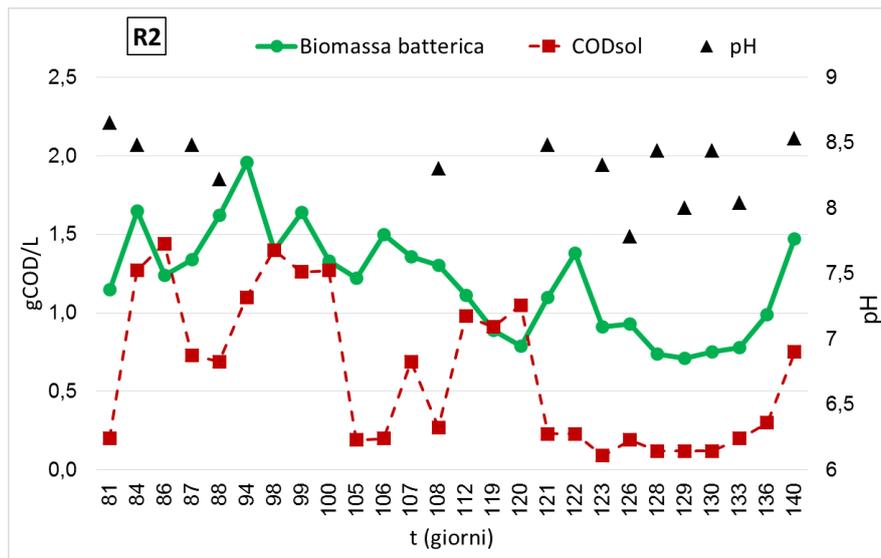


Grafico 7. Andamento del pH, Biomassa batterica e COD solubile in R2.

*pH.* Il pH (7,8 – 8,6) si è mantenuto abbastanza costante per tutta la durata del monitoraggio, all'interno dello stesso range ottimale per l'attività metabolica. In particolare, Pittmann and Steinmetz (2017), studiando l'effetto del pH sulla resa di accumulo di PHA, hanno indicato tipicamente una maggiore produzione di polimero quando il pH è controllato nell'intervallo da 8 a 9.

*COD.* Il COD solubile è leggermente maggiore rispetto a R1 ( $0,62 \pm 0,48$  gO<sub>2</sub>/L, con picchi fino a 1,5 gO<sub>2</sub>/L) in quanto questo valore risente sia del CODs proveniente dal fango che da R1, attraverso un troppo pieno, viene convogliato in R2, che da un'ulteriore aliquota di CODs (sotto forma di VFA) che in alcune fasi dello studio è stata somministrata dal digestore anaerobico a R2 stesso al fine di determinare un accumulo ulteriore di PHA.

*Biomassa batterica.* La biomassa batterica sembra essere più stabile e non subire un andamento altalenante come accade invece in R1. Questo probabilmente, è dovuto a un certo grado di selezione determinata dallo step precedente. Essa altresì assume un andamento ed un corrispondente valore medio superiore rispetto a R1 ( $1,20 \pm 0,33$  gO<sub>2</sub>/L) con picchi sempre fino a 2 gO<sub>2</sub>/L per la medesima motivazione precedente.

*Contenuto di PHA in R1 e R2.* Il contenuto di PHA nei batteri aerobici è valutato mediante quantificazione dell'acido crotonico, monomero principale ottenibile dalla degradazione termica a 350 °C del PHB, o dell'acido crotonico e acido pentenoico ottenibili dal copolimero PHB-HV.

Nel Grafico 8 viene mostrato il confronto tra l'andamento giornaliero del contenuto di PHA (wt%) in R1 ed R2.

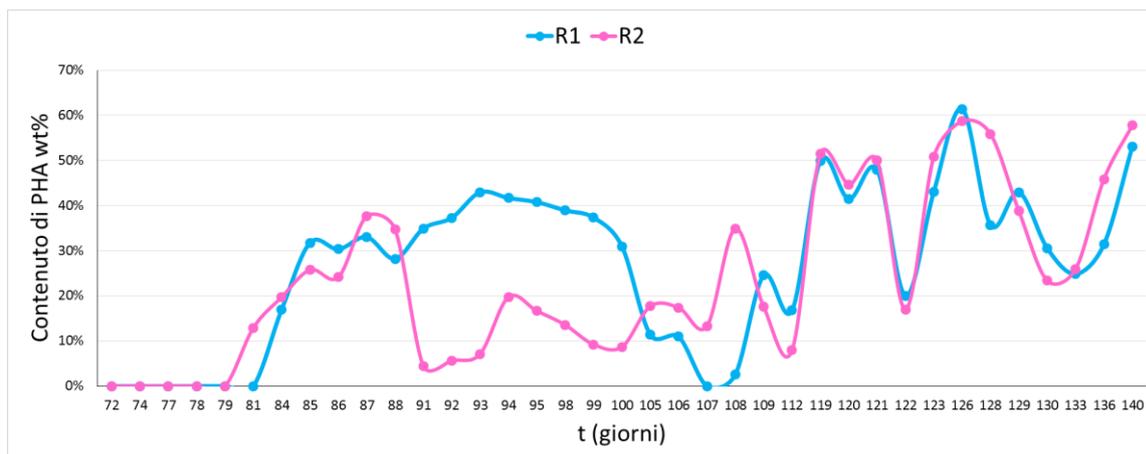
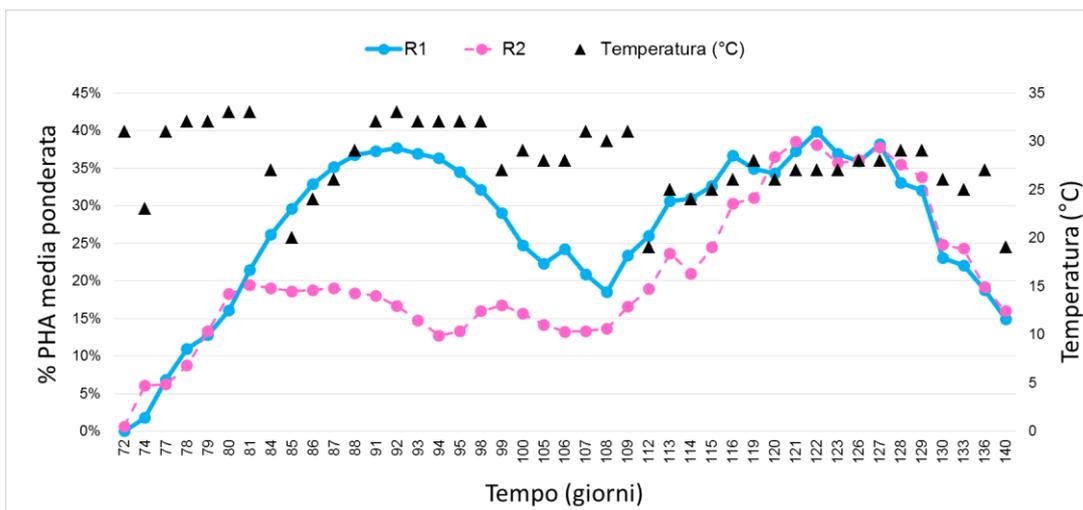


Grafico 8. Confronto tra l'andamento giornaliero della % di PHA in R1 ed R2.

I valori massimi ottenuti sono di circa il 60% per entrambi i reattori, con una media del 31% per R1 e del 27% per R2. In particolare il range di variazione per R1 è stato 0-61%, mentre per R2 0-59%. Tali valori risultano comunque piuttosto variabili nell'arco del tempo considerato, sia perché si tratta di un risultato dipendente da tutti i processi in testa (e quindi in fase di ottimizzazione e sviluppo) che per il fatto che trattandosi di una comunità batterica mista, la composizione e le performance della comunità microbica possono cambiare nel tempo. Inoltre, i VFA utilizzati come substrato per i batteri di R1 e R2 prodotti all'interno del digestore anaerobico sono generati a partire da un fango la cui composizione può essere variabile, il che influenza, a sua volta, le rese finali di PHA.

Un altro aspetto importante da considerare come causa di variabilità è che in R1 il tempo di residenza (HRT) del fango è di 2,5 giorni, quindi si può osservare uno sfasamento tra condizioni operative e dato analitico (e.g. contenuto di PHA); al fine di rimuovere effetti transitori sul contenuto di PHA presente in ciascun reattore, può essere utile calcolare una media ponderata di tali valori, in modo tale da spalmare tale resa su più giorni (10 giorni), sapendo quanto COD solubile sotto forma di VFA è entrato ogni giorno nel sistema, riducendo dunque l'effetto della variabilità giornaliera o plurigiornaliera.

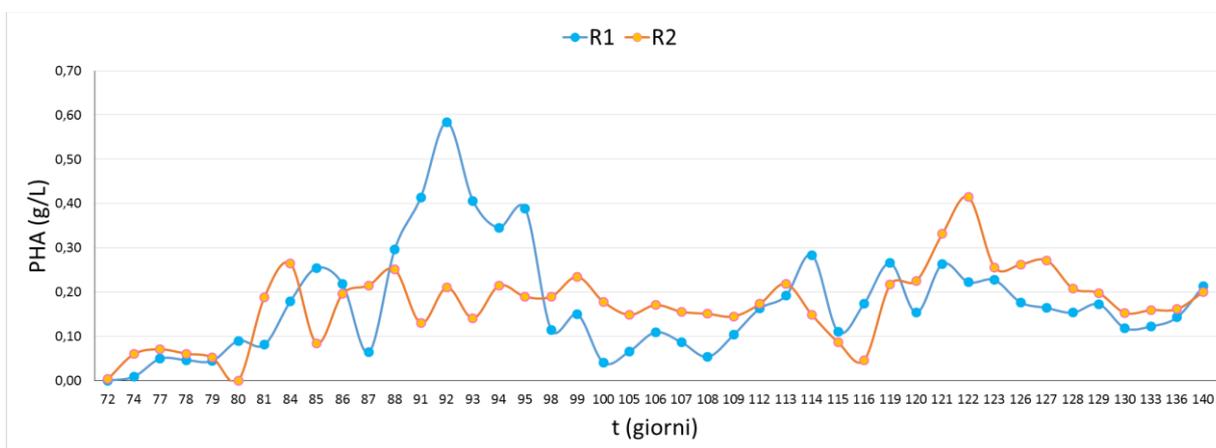
Osserviamo dunque nel Grafico 9, l'andamento del contenuto di PHA basato sulla media ponderata appena descritta e relativa temperatura media ambientale giornaliera.



**Grafico 9. Confronto tra l'andamento del contenuto di PHA (media ponderata su 10 giorni) in R1 ed R2 e relativa temperatura media ambientale giornaliera.**

Come possiamo osservare dal presente grafico, l'andamento del contenuto di PHA in R1 ed R2 sembra essere più stabile nel tempo rispetto al grafico precedente, con dei valori massimi che si avvicinano al 40% per entrambi i reattori ed una media di 27% di PHA in R1 e 21% in R2.

Sulla base di questa media ponderata e conoscendo il COD della biomassa batterica otteniamo il seguente grafico (Grafico 10), che mostra la concentrazione di PHA (g/L) nel medesimo periodo.



**Grafico 10. Confronto tra la concentrazione (g/L) di PHA in R1 ed R2.**

In media sia per R1 che per R2 si osserva una concentrazione di 0,20 g/L durante il periodo monitorato, con picchi di 0,60 g/L per R1 e 0,40 g/L per R2.

Data la natura dei due bioreattori R1 ed R2 (R1 ha l'obiettivo di selezionare e determinare la crescita dei batteri PHA accumulatori, mentre R2 ha l'obiettivo di determinare un maggiore accumulo di PHA intracellulare che sarà poi estratto) ci si dovrebbe aspettare un maggiore contenuto di PHA in R2 piuttosto che in R1, ma da quanto è possibile osservare nei due grafici in questione, questo non sempre si è verificato.

Ciò può avere avuto luogo a causa dell'instaurazione in R1 di una comunità batterica PAO (polyphosphate-accumulating organisms) – GAO (glycogen accumulating organisms).

Questi microorganismi hanno avuto potenzialmente la capacità di selezionarsi in R1 poiché a differenza di altri ceppi presenti nella MMC, possiedono la capacità di consumare semplici composti di carbonio come fonte di energia (VFA) accumulandoli sotto forma di PHA intracellulare, senza la presenza di un accettore di elettroni esterno (come nitrato o ossigeno) generando energia dalla scissione di un'altra riserva energetica presente all'interno delle loro cellule in condizioni anaerobiche o microaerofile: polifosfati nel caso dei PAO, con conseguente rilascio di fosfato nella cellula e glicogeno nel caso dei GAO (Serafim et al. 2008).

In presenza di ossigeno (condizioni aerobiche) invece, PAO e GAO utilizzano il PHA immagazzinato (degradandolo) per la crescita, il mantenimento e il rifornimento del pool di glicogeno (nel caso dei PAO con fosfato assorbito in eccesso per il rifornimento anche del pool di polifosfato) (Serafim et al. 2008).

Essendo però in presenza di un reattore areato in modo attivo, si può presumere che si siano generate condizioni microaerofile (scarsità di O<sub>2</sub>) a seguito di motivazioni differenti. La prima parte dello studio è stata svolta in corrispondenza dell'estate, con temperature che hanno raggiunto frequentemente, seppur per poche ore, i 40 gradi. Si è inoltre osservato un fenomeno di *fouling* diffuso sugli erogatori a microbolle installati in impianto. Temperature così elevate possono facilmente decrementare la solubilità dell'ossigeno a tal punto da rendere inefficace un sistema di aerazione progettato per lavorare a 15-25 C° e parzialmente danneggiato dal *fouling*. In presenza di una performance decrescente è possibile che solo R2, caratterizzato da un volume e da una profondità delle vasche ridotta, sia stata ossigenata adeguatamente, mentre R1, più grande e profondo, abbia visto l'instaurarsi di condizioni microaerofile.

Un altro fattore importante che può avvalorare tale teoria è che nel periodo di tempo in cui questo si è osservato, dalle analisi in GC-MS dei prodotti di metapirolisi si evidenziava la presenza, oltre che al picco dell'acido crotonico, anche del picco relativo all'acido pentenoico, quindi con presenza del comonomero (HV) all'11-12%: il copolimero prodotto era dunque P(HB-co-HV) e questo aspetto è tipico delle comunità PAO-GAO (Dai et al. 2007).

Le condizioni che potrebbero aver portato alla selezione di una comunità microbica PAO-GAO sembrano tuttavia essere venute meno negli ultimi giorni di campionamento e sembrano dunque essersi ripristinate le condizioni iniziali, con contenuto di PHA generalmente maggiore in R2 (salvo una certa variabilità).

Tuttavia, la produzione del copolimero continua ad avvenire in maniera sporadica, questo è però dipendente soprattutto dalla composizione dei VFA forniti come fonte di nutrimento.

### **3.3.1. ESTRAZIONE DEL PHA**

Il processo di estrazione del PHA dalla biomassa microbica è stato studiato in laboratorio al fine di trovare la tecnica di estrazione più economica, efficiente e ecocompatibile (ossia che implichi il minor utilizzo di solvente ed utilizzi le alte temperature per minor tempo possibile), ottimizzarla ed applicarla poi in impianto: tutti questi aspetti riportati su vasta scala sono estremamente importanti ai fini del successo di un impianto come B-PLAS volto alla realizzazione di processi sostenibili.

Tali differenti procedure di estrazione sono state realizzate sia su campioni sotto forma di slurry, liofilizzato o slurry con agente flocculante, sia di R1 che di R2 (Tabella 4).

L'estrazione sullo slurry è la strategia per la quale è stato predisposto l'impianto, quindi attuata sul fango concentrato, mentre l'eventuale aggiunta di un agente flocculante facilita la precipitazione in breve tempo della biomassa solida ed un suo miglior recupero. Viene inoltre testata l'estrazione sul liofilizzato per valutare le potenzialità di quest'ulteriore possibilità da applicare eventualmente in futuro in impianto.

Tabella 4. Confronto tra le varie procedure di estrazione testate in laboratorio.

<b>PROCEDURA DI ESTRAZIONE DEL PHA</b>				
<b>TIPO CAMPIONE</b>	<b>PHA (wt%)</b>	<b>secco (wt%)</b>	<b>recupero (%)</b>	<b>DESCRIZIONE</b>
<b>SLURRY</b>	35%	17%	69%	doppio peso DMC rispetto allo slurry per 180 min a 100°C
	47%	23%	66%	triplo peso DMC rispetto allo slurry per 60 min a 100°C (ripetuto 3 volte)
	15%	14%	49%	pari peso DMC e slurry per 30 min a 100°C, poi doppio volume DMC per 5 min
	24%	20%	56%	pari peso DMC e slurry per 30 min a 100°C, poi triplo volume DMC per 5 min
	12%	17%	39%	metà peso DMC rispetto allo slurry per 30 min a 100°C, poi triplo volume DMC per 5 min
<b>LIOFILIZZATO</b>	29%	100%	40%	0.2 g liofilizzato + 5 mL DMC a caldo (100°C) per 180 min
	29%	100%	76%	0.2 g liofilizzato + 5 mL DMC + 0,5 mL H <sub>2</sub> O a caldo (100°C) per 180 min
<b>SLURRY CON FLOCCULANTE (F04650)</b>	35%	7%	37%	doppio peso DMC rispetto allo slurry per 180 min a 100°C
	13%	12%	27%	pari peso DMC e slurry per 30 min a 100°C, poi doppio volume DMC per 5 min

Campioni di R1 ed R2 sotto differenti forme (slurry, liofilizzato, slurry con flocculante), con differenti contenuti di PHA intracellulare e differenti % di biomassa secca hanno determinato rese di estrazione (recupero % del polimero) differenti. Questo a causa delle diverse strategie di estrazione testate (Tabella 4): differenti volumi di DMC (rispetto al peso del campione) a differenti tempi di estrazione (100 °C ed agitazione magnetica) sono stati testati.

L'estrazione sullo slurry vanta rese di estrazione elevate (talvolta anche maggiori del 60%), le quali però aumentano all'aumentare della quantità di solvente (DMC) utilizzato nonché all'aumentare del tempo di estrazione ad alte temperature: aspetti entrambi ancora infatti in fase di ottimizzazione; inoltre dai test svolti è evidente che maggiore è il contenuto di PHA iniziale e maggiore è il recupero.

Questa strategia di estrazione è quella per la quale l'impianto è stato inizialmente progettato, in quanto più energeticamente efficiente poiché viene eliminato il trattamento di liofilizzazione del fango, che comporterebbe ulteriori costi energetici, a fronte di rese di estrazione non significativamente più elevate: questa tecnica di estrazione verrà dunque implementata in impianto una volta definitivamente ottimizzata su scala di laboratorio.

L'estrazione sul liofilizzato infatti, oltre a mostrare un'elevata variabilità (40 - 76%), col valore più alto nel secondo caso dovuto probabilmente a causa dello shock osmotico della parete cellulare per l'aggiunta di H<sub>2</sub>O, non mostra rese per le quali convenga convertire l'impianto a tale pratica.

Quando invece è stato aggiunto allo slurry un agente flocculante (F04650) con l'obiettivo di concentrare maggiormente la biomassa, applicando procedure analoghe a quelle utilizzate per lo slurry tal quale, la resa è risultata del 37% e 27%, inferiore rispetto alle alternative precedentemente descritte.

Gli aspetti però da valutare in questo caso sono molteplici: la compatibilità dell'agente flocculante con il solvente (DMC), con i batteri e con le componenti meccaniche, la capacità dello stesso di determinare la flocculazione in tempi brevi, che non influenzi la resa e le proprietà del polimero finale e che sia sufficientemente solubile nel fango (su vasta scala una sua scarsa solubilità determinerebbe un uso di importanti quantitativi di solvente, con costi elevati).

Oltre all'agente flocculante F04650 (una poliammide), sono stati testati anche altri agenti flocculanti quali chitosano, CaO, MgO, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ma ognuno di questi ha presentato almeno una delle problematiche sopra indicate ed è dunque stato scartato.

Con l'avanzamento e la stabilizzazione dell'attività dell'impianto, nonché il decremento delle temperature ambientali, la sedimentabilità del materiale batterico è aumentata significativamente, rendendo non più necessario l'utilizzo del flocculante.

### 3.3.2. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE E DELLE PROPRIETÀ TERMICHE DEL POLIMERO

La determinazione dei pesi molecolari mediante GPC (Gel Permeation Chromatography) e della temperatura di fusione (T<sub>m</sub>) mediante DSC (Differential Scanning Calorimetry), è stata effettuata su un campione di film di P(HB-co-HV) con 11% di comonomero HV estratto da R1 ed un campione di film di P(HB-co-HV) con 12% di comonomero HV estratto da R2. I risultati così ottenuti sono stati poi confrontati con i medesimi parametri misurati su un campione di PHB commerciale.

I risultati dei pesi molecolari, essendo in presenza di una distribuzione di pesi molecolari, sono indicati in termini di M<sub>w</sub> (peso molecolare medio ponderale) e PDI (indice di polidispersione).

La Tabella 5 mostra i risultati ottenuti dalle suddette analisi.

Tabella 5. Risultati relativi al peso molecolare, indice di polidispersione e temperatura di fusione dei polimeri testati.

Campione	M <sub>w</sub> (Da)	PDI	T <sub>m</sub>
P(HB-co-HV) da R1	4,20	2,94	168 °C
P(HB-co-HV) da R2	3,50	3,10	168 °C
PHB commerciale	0,80	5,90	172 °C

Dalla tabella così ottenuta si evince che i due polimeri estratti dai due reattori aerobici dell'impianto B-PLAS risultano avere un peso molecolare di 4,20 MDa per R1 e 3,50 MDa per R2, da 4 a 5 volte maggiore rispetto al PHB commerciale (0,8 MDa).

In letteratura i pesi molecolari di P(HB-co-HV) prodotti da colture miste presentano valori notevolmente più bassi: uno studio di Albuquerque et al. (2011) infatti, mostrava valori di Mw tra 0,22-0,65 MDa, in linea con un precedente studio di Dai et al. (2008) (Mw 0,39-0,56 MDa).

Valori leggermente più elevati rispetto a questi sono stati invece rilevati da Bengtsson et al. (2010b) (Mw 0,85 MDa) e da uno studio di Albuquerque et al. (2007) (Mw 0,35-0,9 MDa).

Questo così elevato peso molecolare rilevato nel presente studio è dunque estremamente positivo dal punto di vista delle potenziali applicazioni del polimero, in quanto all'aumentare del peso molecolare migliorano le proprietà meccaniche (quali maggiore flessibilità, minore rigidità, maggiore resistenza a rottura e alla trazione) dunque i polimeri ad alto peso molecolare sono preferibili da un punto di vista industriale (Anjum et al. 2016).

L'indice di polidispersione (PDI), che fornisce una misura dell'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari (polidispersità dei pesi molecolari) è un parametro altresì importante per determinare le caratteristiche del polimero, poichè le proprietà dei polimeri sono molto influenzate dalla frazione ad alti pesi molecolari.

Valori di PDI vicini ad 1 indicano un campione monodisperso, mentre in questo caso i valori di PDI per il polimero di R1 ed R2 sono molto maggiori di 1 (rispettivamente 2,94 e 3,10), ciò indica che ci sono molte molecole differenti con pesi molecolari differenti e dunque che il PHA prodotto è eterogeneo.

I PHA in generale sono polidispersi, hanno infatti un indice di polidispersione molto maggiore di 1 (come osservabile anche dal valore di 5,90 misurato nel PHB commerciale), indicando un'elevata distribuzione del peso molecolare, questo probabilmente dovuto alla modalità di polimerizzazione, nel nostro caso ad opera di microorganismi che dunque non risultano possedere dei meccanismi di controllo riguardo la lunghezza del polimero generato, questa è anche la motivazione per la quale i valori di Mw e PDI dei due polimeri estratti da R1 ed R2 sono leggermente differenti.

Tuttavia, il maggiore peso molecolare di P(HB-co-HV) ed il suo quindi minore indice di polidispersione rispetto al PHB puro, indicano una maggiore uniformità di distribuzione dei pesi molecolari ed una più ampia frazione di molecole ad alti pesi molecolari.

Per quanto riguarda invece il comportamento termico, la DSC mette in luce la presenza di una fase cristallina rilevante per P(HB-co-HV), con una fusione a temperature leggermente minori (168 °C) rispetto al PHB puro (172 °C). Questo è compatibile con il comportamento di un copolimero in cui il secondo monomero (idrossivalerato) è presente in quantità non trascurabili (per esempio in campioni con meno del 4% non si vede una variazione così rilevante del comportamento termico).

La temperatura di fusione è un parametro molto importante ai fini delle applicazioni industriali dei materiali polimerici: essa definisce il limite superiore di temperatura permesso durante la fase di lavorazione del polimero in relazione alle sue differenti applicazioni; dunque dai risultati ottenuti si evince che per P(HB-co-HV) questo limite superiore è leggermente minore rispetto al PHB puro: questo è molto importante sia per stabilire le condizioni ottimali di lavorazione e avere il controllo di processo, sia per determinare l'intervallo di utilizzo del materiale finito in riferimento alle varie possibili sue applicazioni.

### **3.4. TEST DI BIODEGRADAZIONE AEROBICA**

Per la determinazione ed il confronto della biodegradabilità aerobica dei biopoliesteri sopra citati con uno stesso metodo di valutazione, si è provveduto ad un monitoraggio periodico (dalla durata totale di 47 giorni) del COD solubile; gli andamenti ottenuti sono raffigurati nel Grafico 11.

Il presente test ha riguardato lo studio di bioplastiche sia sotto forma di polvere che di film.

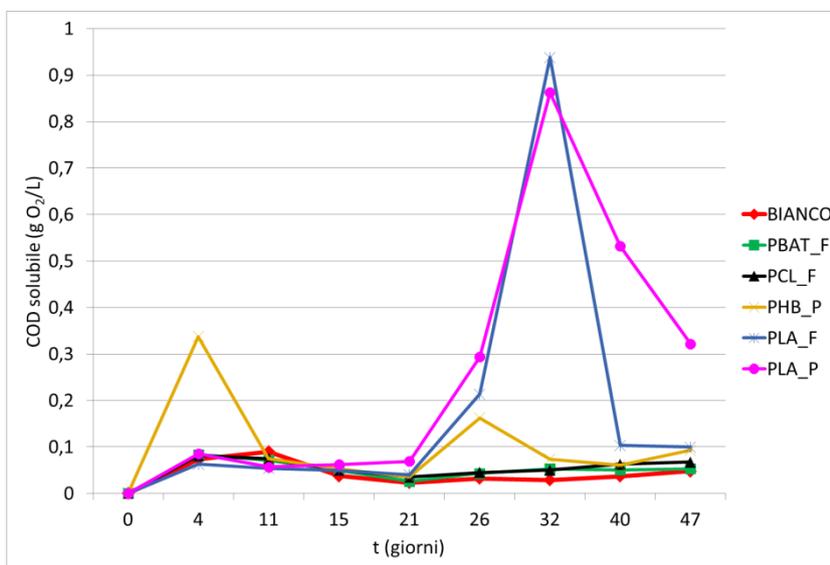


Grafico 11. Monitoraggio nel tempo del COD solubile nel test di biodegradazione aerobico.

Il CODs indica la frazione di materia organica disciolta disponibile per i microorganismi, quindi potenzialmente utilizzabile come fonte di carbonio ed energia e dunque biodegradabile. Un eventuale picco nell'andamento del COD solubile in particolare, indica che il polimero è stato via via idrolizzato ad opera dell'attività dei microorganismi che hanno colonizzato la superficie del polimero e che oligomeri sempre più corti passano da essere insolubili in acqua a solubili, diventando dunque potenzialmente biodegradabili. Tutto ciò dunque, se osservato, è indicativo del potenziale inizio dell'attività biodegradativa dei microorganismi sulla bioplastica in questione e dunque costituisce il primo step del monitoraggio svolto.

Dal grafico ottenuto osserviamo l'andamento del Bianco (in rosso) utilizzato come confronto, ed è possibile notare che il suo andamento è pressochè analogo a quello di PBAT e PCL, dunque è presumibile che la biodegradazione non sia avvenuta per queste due bioplastiche; d'altro canto è altresì possibile che un eventuale picco di CODs non sia stato rilevato poiché eventualmente verificatosi nell'intervallo di tempo trascorso tra un'analisi e l'altra.

Per il PHB osserviamo ben due picchi di CODs, seppur meno intensi rispetto al PLA (0,32 e 0,15 gO<sub>2</sub>/L), che però dimostrano che l'attività di idrolisi ha avuto inizio e che via via frazioni di polimero diventano solubili e potenzialmente biodegradabili.

Per il PLA in polvere e il PLA film osserviamo invece un solo picco, vicino ad 1 g/L, al giorno 32, dunque ci si aspetta che una buona porzione del polimero sia divenuta biodisponibile e sia stata quindi potenzialmente biodegradata.

Una volta completato il test, si è provveduto all'estrazione con solvente dei residui polimerici presenti all'interno di ogni campione e, come ad esempio nel caso di PBAT e PCL al prelievo del

polimero fisicamente quasi integro all'interno del campione (Figura 40, Figura 41), con presenza però, come evidente in PCL, di piccoli fori generati dall'attività microbica.

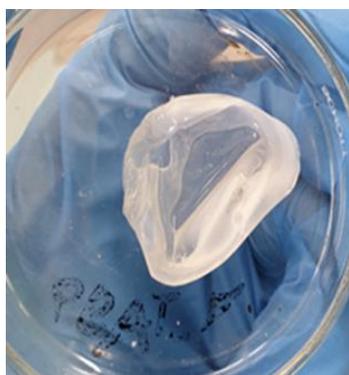


Figura 40. Film PBAT post-biodegradazione.

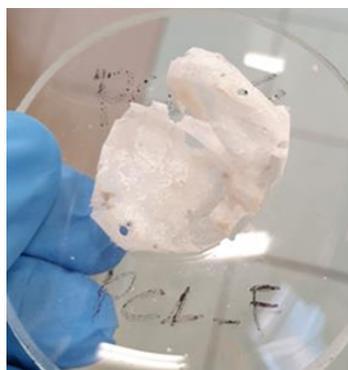


Figura 41. Film PCL post-biodegradazione.

La perdita in peso così determinata, approssimabile alla % di biodegradazione, è dunque riportata in Tabella 6.

Tabella 6. % di perdita in peso post-biodegradazione delle bioplastiche testate.

CAMPIONE	PERDITA IN PESO (%)
PBAT_F	1%
PCL_F	9%
PHB_P	16%
PLA_F	58%
PLA_P	90%

Come ci si aspettava, in base ai risultati del COD solubile oltre al fatto che i polimeri sono rimasti fisicamente quasi integri dopo i 47 giorni, sia PBAT che PCL sono risultati biodegradati in maniera poco rilevante (1% per PBAT e 9% per PCL) e la lievemente maggiore biodegradazione del PCL rispetto al PBAT è riscontrabile in particolare dalla presenza di piccoli fori sulla superficie del polimero.

Tutti gli altri polimeri sono invece risultati frammentati o disciolti.

A tal riguardo infatti, uno studio di Kijchavengkul et al. (2009) ha determinato una biodegradazione del PBAT (stimata mediante perdita del peso %) solo del 48,5% in 40 settimane, a conferma del lento tasso di biodegradazione aerobica. Per quanto riguarda invece la biodegradazione aerobica del PCL, Ishigaki et al. (2004) hanno rilevato una perdita in peso del 30% in 120 giorni, potenzialmente in linea con il presente studio in proiezione futura.

La % di biodegradazione del PHB è invece risultata del 16% in 47 giorni, in linea con i due picchi di bassa intensità rilevati dall'analisi del COD solubile. A tal riguardo invece, uno studio

di Zhang and Gu (2017) ha rilevato che in condizioni aerobiche il PHB si è biodegradato dell'80% in 90 giorni.

Infine, per quanto riguarda i due campioni di PLA, ci si aspettava, in base al COD solubile una biodegradazione sicuramente molto maggiore rispetto agli altri materiali testati, e così è stato: il film di PLA si è biodegradato del 58%, mentre il PLA in polvere fino al 90%, ciò è inoltre in linea col fatto che il PLA in polvere presenta una maggiore area superficiale rispetto al film di PLA, e dunque risulta più facilmente attaccabile dai microorganismi. Secondo lo studio di Massardier-Nageotte et al. (2006) la biodegradazione aerobica del PLA è risultata del 4% in 28 giorni, tuttavia nel nostro studio picchi significativi del CODs, che indicano il potenziale inizio dell'attività biodegradativa, si sono verificati in corrispondenza del giorno 32 e quindi potenzialmente lo studio in questione può risultare in linea con il presente.

I residui polimerici estratti con solvente sono stati poi sottoposti ad analisi elementare per la determinazione della percentuale di C, H, N, e S ed osservare dunque un eventuale cambiamento della composizione chimica del materiale polimerico in seguito al processo di biodegradazione.

In Tabella 7 viene riportata la medesima analisi elementare svolta sugli stessi poimeri prima del processo di biodegradazione, a scopo di confronto.

**Tabella 7. Analisi elementare dei campioni di bioplastica pre-biodegradazione.**

<b>ANALISI ELEMENTARE PRE-BIODEGRADAZIONE</b>				
	<b>N (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>S (%)</b>
<b>PBAT</b>	0,16	65,28	7,22	-
<b>PCL</b>	0,00	62,87	9,48	-
<b>PHB</b>	0,11	56,70	7,61	-
<b>PLA</b>	0,00	48,80	5,73	-

La Tabella 8 riporta invece i risultati dell'analisi elementare svolta sui residui polimerici dopo la biodegradazione.

**Tabella 8. Analisi elementare dei residui polimerici dei campioni di bioplastica post-biodegradazione.**

<b>ANALISI ELEMENTARE POST-BIODEGRADAZIONE</b>				
	<b>N (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>S (%)</b>
<b>PBAT_F</b>	0,32	22,00	3,18	0,10
<b>PCL_F</b>	0,70	13,80	3,14	0,15

<b>PHB_P</b>	0,32	40,67	5,79	0,00
<b>PLA_F</b>	0,70	7,37	2,39	0,12
<b>PLA_P</b>	0,05	9,04	1,08	0,15

Facendo un confronto tra le due tabelle, si denota che in tutti i casi c'è stata un'importante variazione della composizione chimica, con i polimeri che da idrofobici, in seguito all'attività microbica, sono diventati un pò più idrofilo e dunque la struttura molecolare risulta molto cambiata, seppur rimanendo in alcuni casi fisicamente integri come nel caso di PBAT e PCL; tuttavia, la perdita di carbonio è risultata meno significativa per PHB, rispetto agli altri polimeri. Nella seconda tabella in questione (analisi elementare post-biodegradazione) in particolare, tutta l'altra parte di polimero mancante per arrivare al 100% in termini di composizione elementare, può essere imputabile all'O<sub>2</sub> e ad eventuali materiali inorganici che non sono stati stimati per mancanza di campione. Il lieve aumento dell'azoto e dello zolfo può essere invece attribuito alla presenza di residui proteici dei microorganismi che avevano aderito sulla superficie dei frammenti polimerici.

### 3.5. TEST DI BIODEGRADAZIONE ANAEROBICA DI POLIMERI IN POLVERE

Ai fini della determinazione ed il confronto della biodegradabilità anaerobica delle bioplastiche (PBAT, PCL, PHB e PLA) attraverso un medesimo metodo di valutazione, è avvenuto un monitoraggio periodico (dalla durata totale di 40 giorni), nel quale prima della determinazione del CODs e dei VFA, era prevista la determinazione della quantità di biogas (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) prodotto in ogni reattore e calcolo della corrispondente % di biometanazione (approssimabile alla % di biodegradazione), ossia la quantità di metano prodotta in relazione alla massima teorica producibile per ogni bioplastica, andando a quantificare mediante GC-TCD il metano e l'anidride carbonica prodotta.

Questo primo test riguardava esclusivamente bioplastiche sotto forma di polvere.

La Tabella 9, riporta per ogni campione, il volume di biogas prodotto e relativa % di biometanazione.

**Tabella 9. Volume di biogas prodotto e relativa % di biometanazione dei campioni anaerobici in polvere.**

<b>CAMPIONE</b>	<b> BIOGAS PRODOTTO (ml)</b>	<b>% th BMP</b>
<b>PBAT_P</b>	6	0
<b>PCL_P</b>	0	0
<b>PHB_P</b>	100	88
<b>PLA_P</b>	93	100

Per quanto riguarda PBAT e PCL, la produzione di biogas e quindi la biodegradazione non ha di fatto avuto luogo (salvo per i 6 ml di biogas prodotto da PBAT) o comunque non è stata completata; la produzione di VFA avvenuta in entrambi i casi, come vedremo di seguito, è indice di questa seconda ipotesi.

Al contrario, in uno studio di Kijchavengkul et al. (2010) atto a valutare la biodegradabilità anaerobica di PBAT all'interno di bioreattori contenenti tre differenti inoculi, per una durata complessiva di 45 giorni, ha determinato una biodegradazione del materiale del 67%, 45% e 34%, di molto maggiori rispetto a quella riscontrata nel presente studio. Per il PCL invece, uno studio di Massardier-Nageotte et al. (2006) ha mostrato risultati esattamente in linea con quelli osservati nel presente studio, ovvero nessuna biodegradazione avvenuta in condizioni anaerobiche in 28 giorni. Al contrario, uno studio di Yagi et al (2009a) ha mostrato una biodegradazione anaerobica del 92% in 47 giorni, mostrando quindi risultati contrastanti.

Per quanto riguarda invece il PHB (Grafico 12) e il PLA (Grafico 13), che sono stati i due polimeri che si sono biodegradati maggiormente, ne possiamo osservare l'andamento del volume di biogas prodotto e della % di biometanazione.

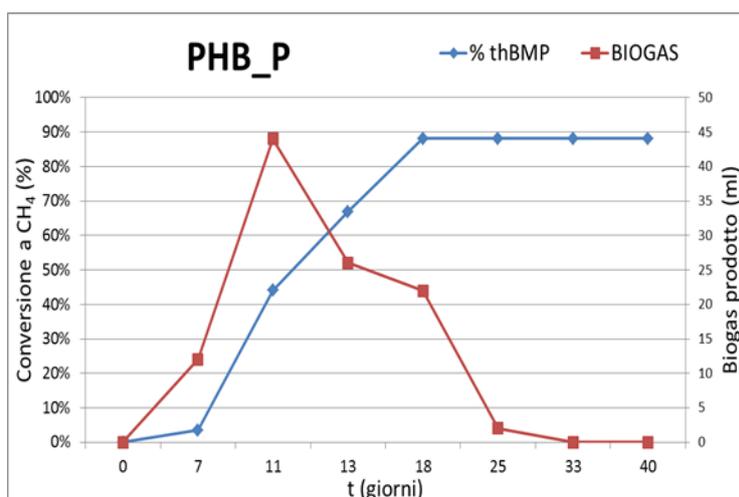


Grafico 12. Volume di biogas prodotto e relativa % di biometanazione del campione PHB in polvere.

Il PHB ha raggiunto una % di biodegradazione dell'88% già nel giorno 18, con una produzione complessiva di biogas pari a 100 ml. Yagi et al. (2014) hanno invece osservato una biodegradazione del 90% in soli 10 giorni per PHB in condizioni anaerobiche, confermando la rapida biodegradazione di questo materiale in queste condizioni.

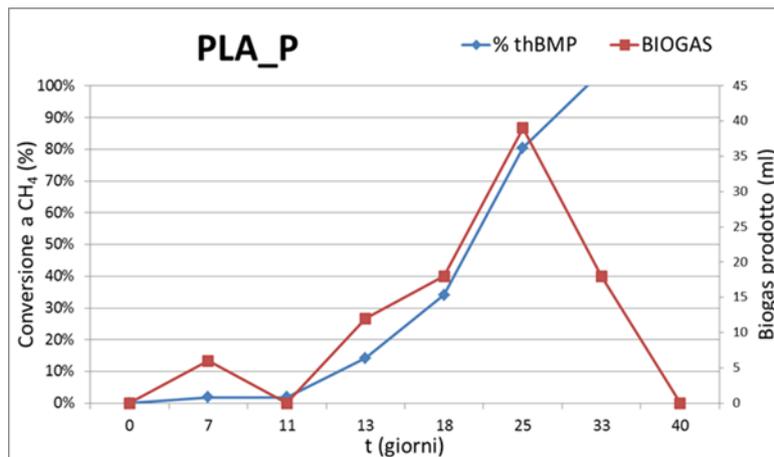


Grafico 13. Volume di biogas prodotto e relativa % di biometanazione del campione PLA in polvere.

Il PLA invece, è risultato essersi biodegradato completamente già nel giorno 33, con una produzione complessiva di biogas pari a 93 ml. Yagi et al. (2009b) hanno misurato invece il 60% di biodegradazione di PLA in 30 giorni, l'80% in 40 giorni e il 90% in 60 giorni in condizioni anaerobiche, con velocità di biodegradazione inferiore rispetto al presente studio, ma comunque considerevole.

Successivamente la sperimentazione ha previsto il monitoraggio del COD solubile, i cui andamenti sono rappresentati nel Grafico 14.

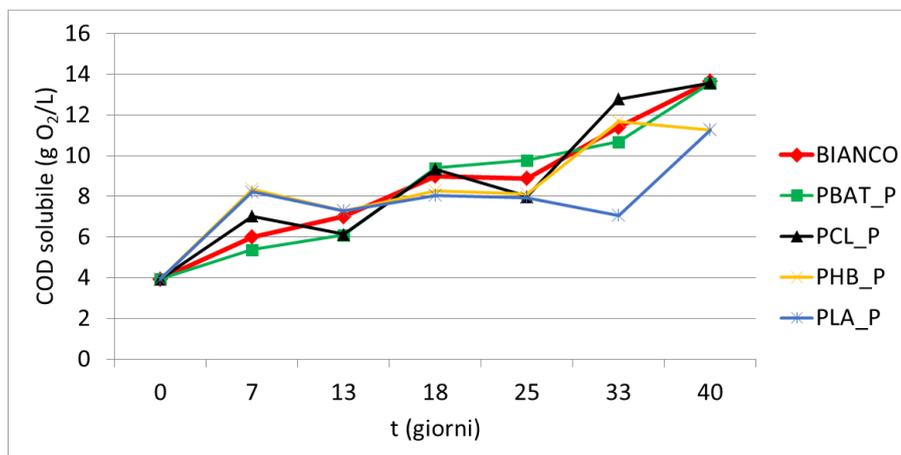


Grafico 14. Andamento del COD solubile dei campioni anaerobici sotto forma di polveri.

Dal grafico in questione è possibile osservare il Bianco (in rosso) che ha un andamento pressochè simile a quello degli altri campioni di bioplastiche in termini di COD solubile, ad eccezione del giorno 7, dove PCL, PHB e PLA possiedono dei picchi fino a 2 g/L maggiori rispetto al Bianco, ciò accade anche per lo stesso PCL al giorno 33 e per PBAT al giorno 25 (con picco non superiore ad 1 g/L rispetto al Bianco), dunque presumibilmente può essere accaduto che frazioni di polimero in prossimità di questi picchi siano passate in soluzione e divenute disponibili per i microorganismi e quindi potenzialmente l'attività di biodegradazione ha potuto avere inizio.

Anche in questo caso, come nel test aerobico, c'è da considerare che potenziali picchi potrebbero non essere stati rilevati perché verificatisi nell'intervallo di tempo trascorso tra un'analisi e l'altra.

L'ultimo parametro valutato è stato poi quello relativo alla produzione di VFA da parte dei microorganismi degradanti presenti in ogni reattore: una volta che il polimero è passato in soluzione ed è divenuto potenzialmente biodisponibile per l'attività di biodegradazione, se questa ha effettivamente avuto inizio lo si denota proprio dalla produzione di VFA, che avviene come fase intermedia (acidogenesi) del processo di biodegradazione anaerobica. I risultati relativi alla produzione di VFA sono raffigurati nel Grafico 15.

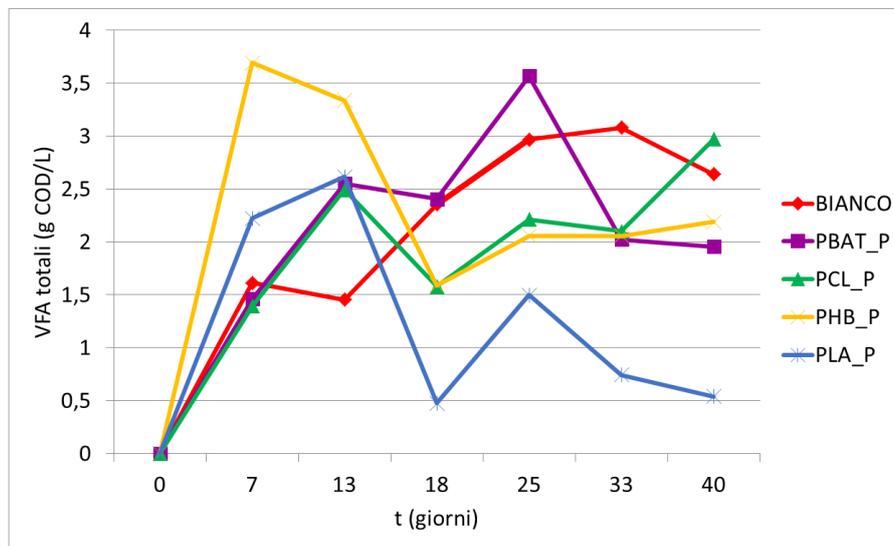


Grafico 15. Andamento della produzione di VFA relativo ai campioni anaerobici in polvere.

La produzione di VFA è stata già al giorno 7 molto elevata sia per PLA ma soprattutto per PHB e, nei giorni seguenti anche PBAT e PCL hanno mostrato dei picchi di produzione di VFA al di sopra del bianco; tutto ciò dunque lascia presumere che la biodegradazione abbia avuto inizio per tutti i campioni di bioplastica.

Nel Grafico 16, osserviamo inoltre la composizione % media dei VFA prodotti da ogni singola bioplastica.

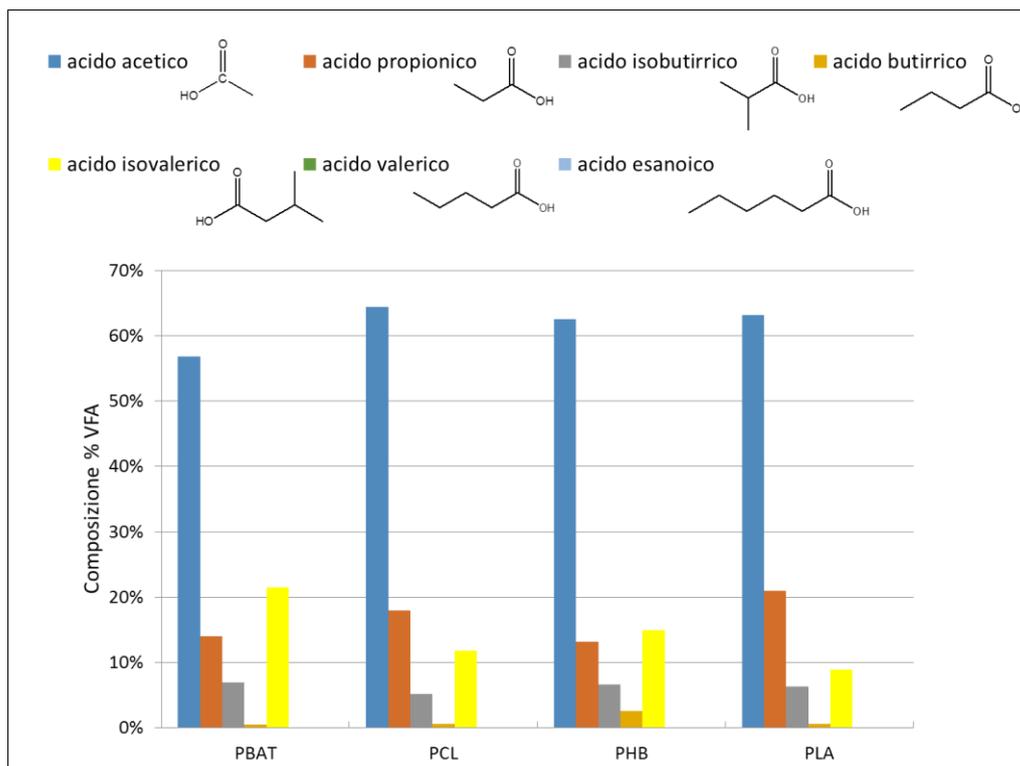


Grafico 16. Andamento della produzione di VFA relativo ai campioni anaerobici in polvere.

Risulta evidente che per tutte le bioplastiche in questione, l'acido acetico costituisce il componente maggiormente presente (57-64%), come secondo componente troviamo in maniera piuttosto variabile l'acido propionico (13-21%) o l'acido isovalerico (9-22%), seguiti dall'acido isobutirrico (5-7%) ed in tracce dall'acido butirrico (1-3%); l'acido valerico e l'acido esanoico non sono stati rilevati.

### 3.6. TEST DI BIODEGRADAZIONE ANAEROBICA DI POLIMERI IN FILM

Il medesimo test di biodegradazione anaerobica è stato poi applicato a campioni di PBAT, PCL, PHB e PLA sotto forma di film, per un periodo complessivo di 47 giorni.

Anche in questo test, in prima istanza ha avuto luogo il monitoraggio della produzione di biogas ed annessa % di biometanazione (Tabella 10).

Tabella 10. Volume di biogas prodotto e relativa % di biometanazione dei campioni anaerobici sotto forma di film.

CAMPIONE	BIOGAS PRODOTTO (ml)	% th BMP
PBAT_F	12	11
PCL_F	24	10
PHB_F	12	0

PLA_F	53	48
-------	----	----

Contro ogni aspettativa il PHB in film non si è biodegradato nell'arco dei 47 giorni: tuttavia la produzione di VFA è comunque indice di un processo di biodegradazione che ha avuto comunque inizio. Il PBAT, che presenta la stessa produzione di biogas (12 ml) rispetto allo stesso PHB, ha mostrato al contrario una % di biodegradazione pari all'11%.

Il PCL, con il doppio di volume di biogas prodotto (24 ml) rispetto ai precedenti, ha invece mostrato una biodegradazione del 10%.

Per quanto riguarda infine il PLA, osserviamo l'andamento della produzione di biogas e relativa % di biometanazione nel Grafico 17.

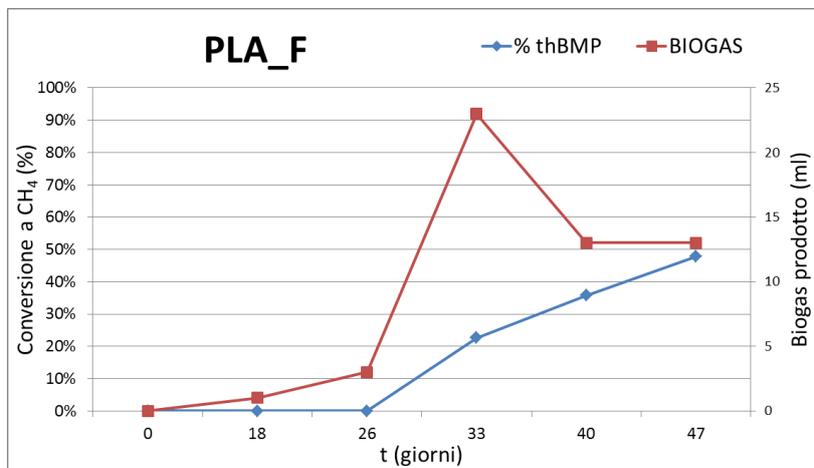


Grafico 17. Volume di biogas prodotto e relativa % di biometanazione del campione film PLA.

Il PLA, con una biodegradazione del 48% ed una produzione complessiva di biogas di 53 ml, maggiori di tutti gli altri polimeri, ha dunque rispettato le aspettative in base a quanto osservato dal COD solubile e dalla produzione di VFA.

Anche in questo test, in secondo luogo ha avuto luogo il monitoraggio appunto del COD solubile, i cui risultati sono riportati nel Grafico 18.

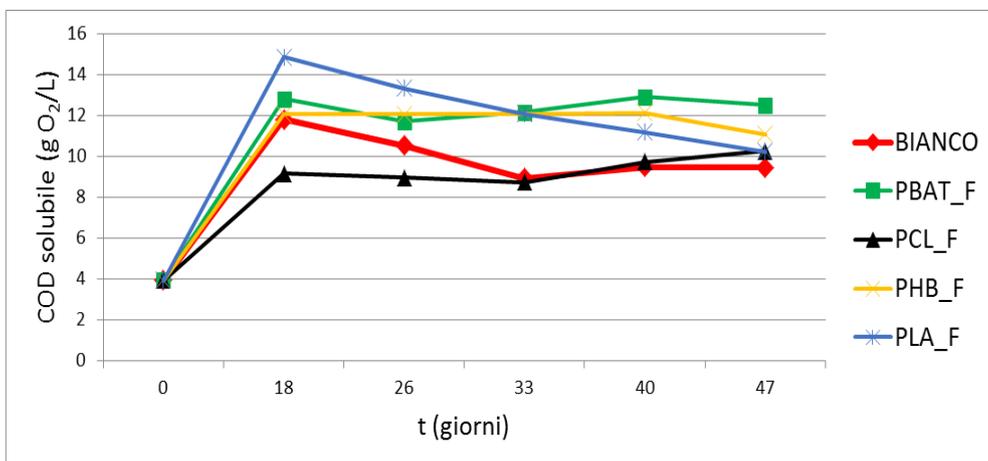


Grafico 18. Andamento del COD solubile dei campioni anaerobici sotto forma di film.

E' possibile notare come nell'intero intervallo di tempo, tutti i campioni, ad eccezione di PCL, abbiano assunto dei valori di COD solubile al di sopra del valore del Bianco, lasciando presumere che ciò sia determinato dal fatto che frazioni di polimero siano passate in soluzione ed entrate a far parte del COD solubile, divenendo disponibili per una loro biodegradazione. Tuttavia, non è da trascurare, come nei test precedenti, il fatto che eventuali picchi di COD solubile al di sopra del Bianco, soprattutto per lo stesso PCL, si siano verificati nell'arco di tempo trascorso tra un'analisi e l'altra e che dunque non siano stati rilevati.

Il valore di COD solubile del PLA (pari a 15 g/L) è sicuramente quello più intenso e dunque ci si aspetta che questo sia stato il polimero maggiormente biodegradato, come appunto è stato osservato.

Per avvalorare questa teoria si procede poi con il monitoraggio della produzione, per ogni reattore, dei VFA, che attesta di fatto se la biodegradazione abbia avuto o meno inizio (Grafico 19).

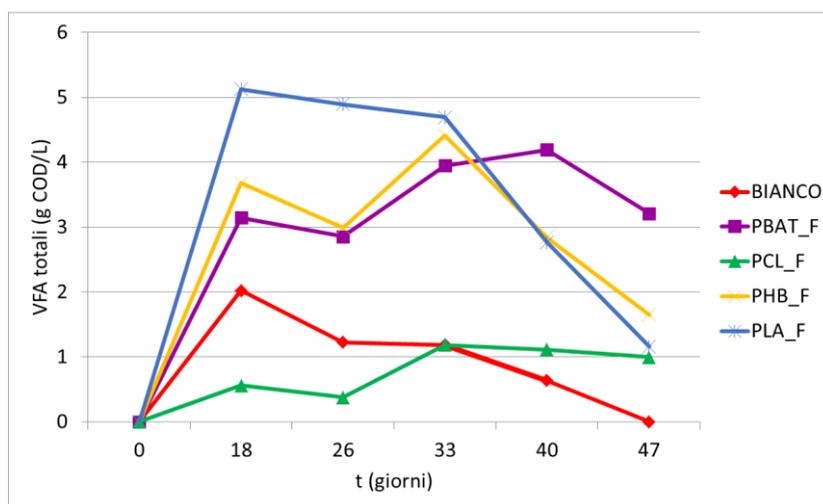


Grafico 19. Andamento della produzione di VFA relativo ai campioni anaerobici sotto forma di film.

Dall'osservazione del grafico in questione si evince, anche in questo caso, che con molta probabilità sia stato proprio il PLA ad essersi maggiormente biodegradato (come di fatto è accaduto), grazie alla sua notevole produzione di VFA rispetto al Bianco, tuttavia anche PBAT e PHB hanno determinato un'importante produzione di VFA, che attesta l'inizio del loro processo di biodegradazione, anche lo stesso PCL, a partire dal giorno 40 mostra valori superiori del Bianco, fino ad 1 g/L.

In via definitiva è possibile fare un confronto tra la biodegradabilità anaerobica delle medesime bioplastiche sotto forma di polvere e di film: il PHB\_P ha mostrato una biodegradazione dell'88% in 40 giorni in confronto con uno 0% per il PHB\_F in 47 giorni, ciò è in parte attribuibile alla maggiore area superficiale della polvere rispetto al film e che dunque risulta più facilmente attaccabile dai microorganismi, tuttavia la differenza tra le due è molto ampia.

La stessa cosa è accaduta per PLA dove PLA\_P è risultato completamente biodegradato già in corrispondenza del giorno 33, mentre PLA\_F in 47 giorni ha mostrato una biodegradazione inferiore, fino al 48%.

Per quanto riguarda invece PBAT\_P e PCL\_P, non sono risultati biodegradati nell'arco dei 40 giorni, mentre i corrispettivi PBAT\_F e PCL\_F hanno mostrato una biodegradabilità rispettivamente dell'11% e 10% in 47 giorni, l'esatto contrario dei due casi precedenti.

In via definitiva dunque, sembra essere proprio il PLA il polimero che mostra migliori proprietà di biodegradabilità in etrambe le sue forme.

## CAPITOLO 4 - CONCLUSIONI

### 4.1. VALUTAZIONE GENERALE DELLE RESE DI PROCESSO TRAMITE COD

Avendo una completa visione dei processi aventi luogo in impianto ed avendo a disposizione tutti i parametri necessari, è possibile determinare, mediante un diagramma di Sankey, le rese di ogni processo in relazione al valore medio di COD totale del fango anaerobico in input nell'impianto (Figura 42).

E' dunque possibile osservare la trasformazione del COD totale (suddiviso in solubile ed insolubile) dal momento del suo ingresso nell'impianto e come questa varia in relazione ai processi cui il fango è sottoposto nei vari moduli dell'impianto e dove il COD viene dissipato. Tale analisi permette di valutare potenziali strategie volte all'ottimizzazione del processo dunque migliorare la resa finale di PHB.

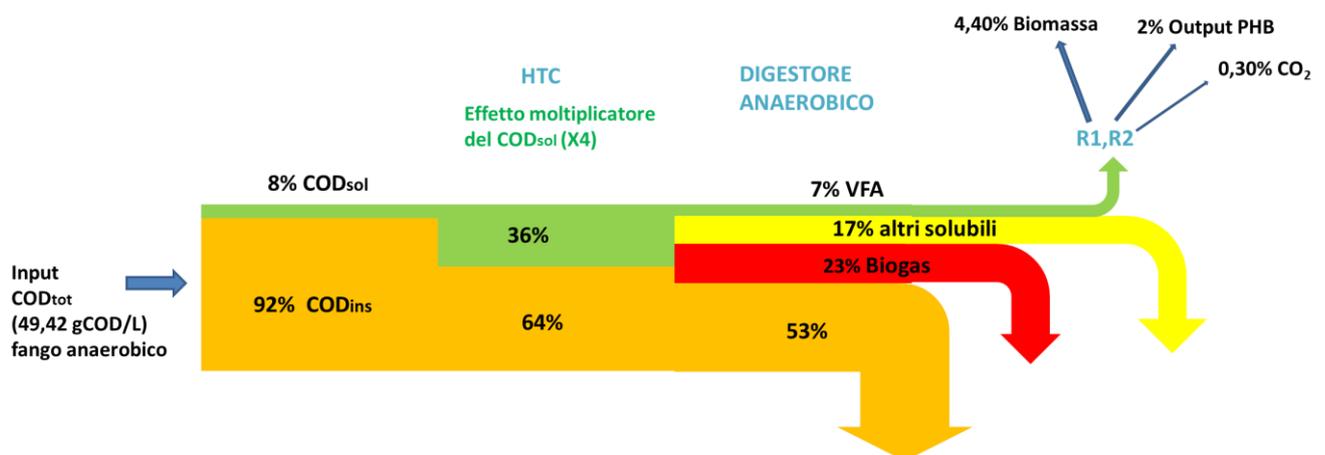


Figura 42. Diagramma di Sankey utilizzato per la valutazione delle rese di impianto.

Il presente diagramma di Sankey mostra l'andamento del COD, in termini di resa, per ogni unità di processo dell'impianto:

- il COD totale del fango anaerobico in input è pari a 49,42 gCOD/L, di cui solo una frazione irrisoria (8%) costituisce il COD solubile, che è però il parametro più importante potenzialmente convertibile in VFA prima e PHB poi (il COD insolubile corrisponde al COD della frazione solida, 92%);
- in seguito a trattamento HTC si ottiene un aumento di circa 4 volte del COD solubile a scapito dell'insolubile (effetto moltiplicatore del COD solubile da parte del trattamento HTC);
- nel digestore anaerobico solo il 7% del COD totale (19% del solubile) viene convertito in VFA (utili poi per i passaggi successivi), mentre il restante COD solubile esce dal sistema come “altri solubili” non convertiti dal sistema. Il COD totale rimanente esce invece dal sistema sotto forma di biogas (23%) e sotto forma di COD insolubile (53%);
- i VFA generati vengono infine somministrati a R1 ed in continuo a R2 (diluiti in rapporto variabile con acqua di pozzo) e convertiti per il 30% in PHB (output dell'impianto), per il 66% in biomassa. Il 4% del COD iniziale viene ossidato a CO<sub>2</sub> tramite respirazione cellulare nei reattori aerobici.

Le rese di VFA e PHB osservate durante l'avvio dell'impianto sono risultate modeste, pari al 7% del COD totale entrante nel sistema (19% del solubile) per i VFA e pari al 2% del COD totale entrante nel sistema o il 5,5% del COD solubilizzato dell'HTC per il PHB. Da un'analisi del diagramma di Sankey mostrata in Figura 42 risulta evidente come la principale dissipazione avviene nel corso della digestione anaerobica, con produzione di Biogas. Alla luce del minor valore del Biogas rispetto al PHB in termini economici e utilitaristici, risulterebbe conveniente l'inibizione parziale o totale dell'attività dei batteri metanogeni attraverso inibitori o applicando particolari condizioni al sistema, in modo tale da ridurre la produzione di biogas, che di fatto è COD biodegradabile e quindi potenzialmente convertibile in VFA e che potrebbe dunque andare ad arricchire la resa in VFA. Tale intervento da solo è potenzialmente in grado di aumentare la resa finale di VFA di un fattore 4, portando la resa finale di PHB a valori prossimi al 8-10%. Tali rese rappresentano il target finale operativo raggiungibile con semplici aggiustamenti di processo.

Altro punto di miglioramento è rappresentato dall'ottimizzazione dell'operatività dei reattori aerobici, dove gran parte del COD solubile sotto forma di VFA viene utilizzato per la crescita della biomassa batterica (66%). L'ottimizzazione del rapporto C/N/P, dei cicli feast-famine e, in particolare, la riduzione del tempo di residenza possono favorire l'accumulo intracellulare di PHA piuttosto che la crescita della biomassa batterica. Va notato che tale biomassa comunque potrebbe essere ricircolata in testa al sistema, evitando quindi questa fonte di dissipazione di COD.

## **4.2. VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI PHA E CARATTERIZZAZIONE DEL POLIMERO**

Il processo di metapirolisi dello slurry batterico analizzato in GC-MS ha mostrato una % di PHA, basata su una media ponderata in un arco di tempo di 10 giorni, con valori massimi del 40% in entrambi i reattori ed una media, per tutta la durata dello studio, del 27% di PHA in R1 e 21% in R2. Sulla base di questa media ponderata relativa alla % di PHA e conoscendo il COD della biomassa batterica è stata ottenuta la concentrazione di PHA (g/L) nel medesimo periodo:

in media sia per R1 che per R2 si osserva una concentrazione di 20 g/L durante il periodo monitorato, con picchi di 60 g/L per R1 e 40 g/L per R2.

Il processo di metapirólisi ed annessa analisi in GC-MS dei rispettivi prodotti, ha permesso allo stesso modo di determinare la composizione del polimero PHA contenuto all'interno delle cellule batteriche: in linea generale si osserva la presenza dell'omopolimero puro PHB, mentre in alcuni casi si è riscontrata altresì la presenza del copolimero P(HB-co-HV) con 10-12% di comonomero HV.

La strategia di estrazione con solvente del polimero, ancora in via di ottimizzazione su scala di laboratorio, ha per ora mostrato risultati convincenti per quanto riguarda l'estrazione sullo slurry microbico, con rese fino al 69%, tuttavia le rese maggiori sono ottenute da quei processi che richiedono un utilizzo di solvente (DMC) maggiore, così come le alte temperature che in questi casi devono essere mantenute per lungo tempo (fino a 180 min), due aspetti che considerati su grande scala portano ad un notevole consumo di solvente ed energetico, con un aumento dei costi e dunque da ottimizzare.

I risultati invece ottenuti da processi di estrazione sulla biomassa liofilizzata o con utilizzo di agente flocculante non si sono rivelati altrettanto performanti.

Sono stati dunque per la prima volta estratti dei PHA microbici da un impianto completamente funzionante in tutti i suoi moduli: in particolare i campioni di P(HB-co-HV) estratti dallo slurry proveniente da R1 ed R2 con % di HV rispettivamente dell'11% e 12%, hanno mostrato un peso molecolare di 4,20 e 3,80 MDa, nettamente superiore a quello di un PHB commerciale (0,8 MDa) utilizzato come confronto: la presenza del comonomero HV migliora notevolmente le proprietà del polimero, soprattutto da un punto di vista delle proprietà meccaniche e quindi di applicabilità commerciale ed uso finale del materiale.

Per quanto riguarda invece l'indice di polidispersione (PDI), rispetto al PHB commerciale (PDI=5,90) i campioni di P(HB-co-HV) di R1 ed R2 hanno mostrato valori inferiori, rispettivamente di 2,94 e 3,10, aspetto anche questo vantaggioso in quanto indica una distribuzione dei pesi molecolari meno ampia, dove prevalgono le frazioni di molecole ad alti pesi molecolari, che sono proprio quelle vanno ad influenzare positivamente le proprietà meccaniche dei polimeri.

Il comportamento termico del materiale infine, mette in luce una rilevante fase cristallina, con una temperatura di fusione ( $T_m$ ) di 168 °C, a differenza dei 172 °C del PHB commerciale, ciò è compatibile per la presenza del comonomero HV in quantità non trascurabili e dà indicazione sul limite superiore di temperatura permesso durante la fase di lavorazione del polimero in relazione alle sue differenti potenziali applicazioni.

### **4.3. TEST DI BIODEGRADAZIONE AEROBICA ED ANAEROBICA**

Il PHB (polimero di riferimento dell'impianto B-PLAS) testato in termini di biodegradabilità aerobica ed anaerobica ha mostrato risultati non del tutto confortanti sotto questo particolare aspetto, mostrando una biodegradazione solo del 16% (sotto forma di polvere) in condizioni aerobiche in 40 giorni; nettamente migliori le performance del biopoliestere bio-based qui testato come confronto (PLA), con una biodegradazione aerobica del 58-90% nel medesimo periodo.

Gli altri poliesteri testati (PBAT e PCL) mostrano una biodegradabilità molto scarsa, rispettivamente dell'1% e 9% ed inoltre al termine dei 40 giorni, risultavano ancora fisicamente integri all'interno del campione, seppur presentando piccoli fori sulla loro superficie; al contrario tutti gli altri polimeri testati sono invece risultati frammentati o disciolti all'interno dei rispettivi campioni.

Dall'analisi elementare altresì, per tutti e 4 i poliesteri testati è stato evidente che c'è stata un'importante variazione della composizione chimica, con i polimeri che da idrofobici, in seguito all'attività microbica, sono diventati un pò più idrofilo e dunque la struttura molecolare risulta molto cambiata, seppur permanendo in alcuni casi, fisicamente integri come nel caso di PBAT e PCL; tuttavia, la perdita di carbonio è risultata meno significativa per PHB, rispetto agli altri polimeri.

Il test di biodegradabilità anaerobica ha invece mostrato ottimi risultati per il PHB in polvere che è risultato biodegradato dell'88% in 40 giorni ma assolutamente non confortanti per il PHB in film che non si è affatto biodegradato nell'arco di 47 giorni, sottolineando l'importanza dell'area superficiale nei processi di degradazione mediati da microorganismi. Analogamente il PLA in polvere è risultato completamente biodegradato già dal giorno 33, mentre il PLA in film in 47 giorni ha mostrato una biodegradazione fino al 48%.

In via definitiva dunque, sembra essere proprio il PLA il polimero che mostra migliori proprietà di biodegradazione e dunque il più adatto ad un'ampia varietà di tipi di smaltimento possibili ed inoltre sembra essere la bioplastica più facilmente attaccabile e biodegradabile dalle comunità microbiche miste presenti nell'ambiente naturale.

Tuttavia, per le bioplastiche che biodegradano in tempi più lunghi sono da considerare ovviamente anche altre vie di riciclo, come quello chimico tra i più promettenti: questo mira alla decomposizione del polimero nei monomeri d'origine ed ottenere quindi combustibili e chemicals alternativi a quelli di origine fossile, con vantaggi considerevoli per l'ambiente. Si tratta quindi di una forma di recupero di energia e di materia che fa in modo che l'energia ancora incorporata all'interno dei materiali arrivati a fine uso non venga persa, ma che venga convertita in un valore aggiunto (altri materiali, prodotti chimici o energia).

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Abou-Zeid, Dunja-Manal, Rolf-Joachim Müller, and Wolf-Dieter Deckwer. 2001. 'Degradation of Natural and Synthetic Polyesters under Anaerobic Conditions'. *Journal of Biotechnology* 86 (2): 113–26. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00406-5).
- Adeleye, Aderemi T., Chuks Kenneth Odoh, Obieze Christian Enudi, Oluwakemi Oluwabunmi Banjoko, Osigbeminiyi Oludare Osiboye, Emmanuel Toluwalope Odediran, and Hitler Louis. 2020. 'Sustainable Synthesis and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Biomass'. *Process Biochemistry* 96 (September): 174–93. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>.
- Agarwal, Seema. 2020. 'Biodegradable Polymers: Present Opportunities and Challenges in Providing a Microplastic-Free Environment'. *Macromolecular Chemistry and Physics* 221 (6): 2000017. <https://doi.org/10.1002/macp.202000017>.

- Anjum, Anbreen, Mohammad Zuber, Khalid Mahmood Zia, Aqdas Noreen, Muhammad Naveed Anjum, and Shazia Tabasum. 2016. 'Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and Its Copolymers: A Review of Recent Advancements'. *International Journal of Biological Macromolecules* 89 (August): 161–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
- Bastioli, Catia, and Luigi Capuzzi. n.d. 'NOVAMONT, THE BIO-BASED MATERIALS, AND ITS EXPERIMENT OF SYSTEM-BASED ECONOMY', 49.
- Bátori, Veronika, Dan Åkesson, Akram Zamani, Mohammad J. Taherzadeh, and Ilona Sárvári Horváth. 2018. 'Anaerobic Degradation of Bioplastics: A Review'. *Waste Management* 80 (October): 406–13. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.040>.
- Bojda, Joanna, Ewa Piorkowska, and Mirosław Pluta. 2020. 'Shear-Induced Non-Isothermal Crystallization of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate)'. *Polymer Testing* 85 (May): 106420. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106420>.
- Briese, Bernd Holger, Dieter Jendrossek, and Hans G. Schlegel. 1994. 'Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate- Co -3-Hydroxyvalerate) by Aerobic Sewage Sludge'. *FEMS Microbiology Letters* 117 (1): 107–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06750.x>.
- Bugnicourt, E., P. Cinelli, A. Lazzeri, and V. Alvarez. 2014. 'Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of Synthesis, Characteristics, Processing and Potential Applications in Packaging'. *Express Polymer Letters* 8 (11): 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>.
- Campos, Adriana de, José C. Marconato, and Sandra M. Martins-Franchetti. 2012. 'The Influence of Soil and Landfill Leachate Microorganisms in the Degradation of PVC/PCL Films Cast from DMF'. *Polímeros* 22 (3): 220–27. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000029>.
- Chen, G.-Q., Q. Wu, Y.K. Jung, and S.Y. Lee. 2011. 'PHA/PHB'. In *Comprehensive Biotechnology*, 217–27. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00179-3>.
- Chen, Guo-Qiang, and Xiao-Ran Jiang. 2017. 'Engineering Bacteria for Enhanced Polyhydroxyalkanoates (PHA) Biosynthesis'. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (3): 192–97. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.09.001>.
- Christen, Marie-Odile, and Franco Vercesi. 2020. 'Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics'. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* Volume 13 (January): 31–48. <https://doi.org/10.2147/CCID.S229054>.
- Costa, Anna Raffaella M., Lízia T.A. Reul, Fernanda M. Sousa, Edson N. Ito, Laura H. Carvalho, and Eduardo L. Canedo. 2018. 'Degradation during Processing of Vegetable Fiber Compounds Based on PBAT/PHB Blends'. *Polymer Testing* 69 (August): 266–75. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.05.031>.
- Cui, You-Wei, Hong-Yu Zhang, Peng-Fei Lu, and Yong-Zhen Peng. 2016. 'Effects of Carbon Sources on the Enrichment of Halophilic Polyhydroxyalkanoate-Storing Mixed Microbial Culture in an Aerobic Dynamic Feeding Process'. *Scientific Reports* 6 (1): 30766. <https://doi.org/10.1038/srep30766>.
- Dammak, Mohamed, Yesmine Fourati, Quim Tarrés, Marc Delgado-Aguilar, Peré Mutjé, and Sami Boufi. 2020. 'Blends of PBAT with Plasticized Starch for Packaging Applications: Mechanical Properties, Rheological Behaviour and Biodegradability'. *Industrial Crops and Products* 144 (February): 112061. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112061>.

- Dietrich, Karolin, Marie-Josée Dumont, Luis F. Del Rio, and Valérie Orsat. 2017. 'Producing PHAs in the Bioeconomy — Towards a Sustainable Bioplastic'. *Sustainable Production and Consumption* 9 (January): 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>.
- Ferreira, Filipe V., Luciana S. Cividanes, Rubia F. Gouveia, and Liliane M.F. Lona. 2019. 'An Overview on Properties and Applications of Poly(Butylene Adipate- Co -Terephthalate)-PBAT Based Composites'. *Polymer Engineering & Science* 59 (s2): E7–15. <https://doi.org/10.1002/pen.24770>.
- Funabashi, Masahiro, Fumi Ninomiya, and Masao Kunioka. 2009. 'Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2'. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (8): 3635–54. <https://doi.org/10.3390/ijms10083635>.
- Gironi, F., and V. Piemonte. 2010. 'Bioplastics Disposal: How to Manage It'. In , 261–71. Tallinn, Estonia. <https://doi.org/10.2495/WM100241>.
- Hernández-López, Mónica, Zormy Nacary Correa-Pacheco, Silvia Bautista-Baños, Leonor Zavaleta-Avejar, José Jesús Benítez-Jiménez, Marcos Antonio Sabino-Gutiérrez, and Pedro Ortega-Gudiño. 2019. 'Bio-Based Composite Fibers from Pine Essential Oil and PLA/PBAT Polymer Blend. Morphological, Physicochemical, Thermal and Mechanical Characterization'. *Materials Chemistry and Physics* 234 (August): 345–53. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.01.034>.
- Hobbs, Shakira R., Prathap Parameswaran, Barbara Astmann, Jay P. Devkota, and Amy E. Landis. 2019. 'Anaerobic Codigestion of Food Waste and Polylactic Acid: Effect of Pretreatment on Methane Yield and Solid Reduction'. *Advances in Materials Science and Engineering* 2019 (July): 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/4715904>.
- Hoffmann, R., D.D.S. Morais, C.J.F. Braz, K. Haag, R.M.R. Wellen, E.L. Canedo, L.H. de Carvalho, and K. Koschek. 2019. 'Impact of the Natural Filler Babassu on the Processing and Properties of PBAT/PHB Films'. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 124 (September): 105472. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2019.105472>.
- Ishigaki, Tomonori, Wataru Sugano, Akane Nakanishi, Masafumi Tateda, Michihiko Ike, and Masanori Fujita. 2004. 'The Degradability of Biodegradable Plastics in Aerobic and Anaerobic Waste Landfill Model Reactors'. *Chemosphere* 54 (3): 225–33. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00750-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00750-1).
- Kijchavengkul, Thitisilp, Rafael Auras, Maria Rubino, Mathieu Ngouajio, and R. Thomas Fernandez. 'Assessment of Aliphatic–Aromatic Copolyester Biodegradable Mulch Films. Part II: Laboratory Simulated Conditions'. *Chemosphere* 71, no. 9 (April 2008): 1607–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.037>.
- Kijchavengkul, Thitisilp, Rafael Auras, Maria Rubino, Susan Selke, Mathieu Ngouajio, and R. Thomas Fernandez. 2010. 'Biodegradation and Hydrolysis Rate of Aliphatic Aromatic Polyester'. *Polymer Degradation and Stability* 95 (12): 2641–47. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.018>.
- Koller, Martin, Lukáš Maršálek, Miguel Miranda de Sousa Dias, and Gerhart Brauneegg. 2017. 'Producing Microbial Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters in a Sustainable Manner'. *New Biotechnology* 37 (July): 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>.
- Kourmentza, Constantina, Jersson Plácido, Nikolaos Venetsaneas, Anna Burniol-Figols, Cristiano Varrone, Hariklia N. Gavala, and Maria A. M. Reis. 2017. 'Recent Advances and

- Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production'. *Bioengineering* 4 (4): 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>.
- Kulkarni, Aishwarya, and Harshini Dasari. 2018. 'Current Status of Methods Used In Degradation of Polymers: A Review'. Edited by P.B. Raghuvir and T.M. Mathew. *MATEC Web of Conferences* 144: 02023. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201814402023>.
- Li, Mengxing, and Mark R. Wilkins. 2020. 'Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production: Feedstocks, Strains and Process Developments'. *International Journal of Biological Macromolecules* 156 (August): 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082>.
- Lu, D. R., C. M. Xiao, and S. J. Xu. 2009. 'Starch-Based Completely Biodegradable Polymer Materials'. *Express Polymer Letters* 3 (6): 366–75. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2009.46>.
- Marinho, Vithória A.D., Camila A.B. Pereira, Maria B.C. Vitorino, Aline S. Silva, Laura H. Carvalho, and Eduardo L. Canedo. 2017. 'Degradation and Recovery in Poly(Butylene Adipate- Co -Terephthalate)/ Thermoplastic Starch Blends'. *Polymer Testing* 58 (April): 166–72. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2016.12.028>.
- Massardier-Nageotte, V., C. Pestre, T. Cruard-Pradet, and R. Bayard. 2006. 'Aerobic and Anaerobic Biodegradability of Polymer Films and Physico-Chemical Characterization'. *Polymer Degradation and Stability* 91 (3): 620–27. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.02.029>.
- Medeiros Garcia Alcântara, João, Francesco Distante, Giuseppe Storti, Davide Moscatelli, Massimo Morbidelli, and Mattia Sponchioni. 2020. 'Current Trends in the Production of Biodegradable Bioplastics: The Case of Polyhydroxyalkanoates'. *Biotechnology Advances* 42 (September): 107582. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107582>.
- Mohee, R., G.D. Unmar, A. Mudhoo, and P. Khadoo. 2008. 'Biodegradability of Biodegradable/Degradable Plastic Materials under Aerobic and Anaerobic Conditions'. *Waste Management* 28 (9): 1624–29. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.07.003>.
- Nielsen, Chad, Asif Rahman, Asad Ur Rehman, Marie K. Walsh, and Charles D. Miller. 2017. 'Food Waste Conversion to Microbial Polyhydroxyalkanoates'. *Microbial Biotechnology* 10 (6): 1338–52. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12776>.
- Ojumu, T. V., J. Yu, and B. O. Solomon. 2004. 'Production of Polyhydroxyalkanoates, a Bacterial Biodegradable Polymer'. *African Journal of Biotechnology* 3 (1): 18–24. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2004>.
- Pagliano, Giorgia, Valeria Ventorino, Antonio Panico, and Olimpia Pepe. 2017. 'Integrated Systems for Biopolymers and Bioenergy Production from Organic Waste and By-Products: A Review of Microbial Processes'. *Biotechnology for Biofuels* 10 (1): 113. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0802-4>.
- Pakalapati, Harshini, Chih-Kai Chang, Pau Loke Show, Senthil Kumar Arumugasamy, and John Chi-Wei Lan. 2018. 'Development of Polyhydroxyalkanoates Production from Waste Feedstocks and Applications'. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 126 (3): 282–92. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>.
- Plastics – the Facts 2019, PlasticsEurope 2019. <https://www.plasticseurope.org/it/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>.
- polymerdatabase.com. 'Biodegradable Bioplastics'. <http://www.polymerdatabase.com/polymer%20classes/Bioplastics.html>.

- Raza, Zulfiqar Ali, Sharjeel Abid, and Ibrahim M. Banat. 2018. 'Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, Production, Recent Developments and Applications'. *International Biodeterioration & Biodegradation* 126 (January): 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>.
- Reddy, C S K, R Ghai, and V C Kalia. 2003. 'Polyhydroxyalkanoates: An Overview'. *Bioresource Technology*, 10.
- Sagnelli, Domenico, Kouros Hooshmand, Gerdi Christine Kemmer, Jacob J K Kirkensgaard, Kell Mortensen, Concetta Valeria L Giosafatto, Mette Holse, and Kim H Hebelstrup. 2017. 'Cross-Linked Amylose Bio-Plastic: A Transgenic-Based Compostable Plastic Alternative'. *Int. J. Mol. Sci.*, 12.
- Samitthiwetcharong, Sutisa. 2019. 'ENHANCEMENT OF METHANE PRODUCTION FROM ALKALINE PRETREATED POLY (LACTIC ACID) WASTE BY THE CO-DIGESTION PROCESS'. *International Journal of GEOMATE* 16 (56). <https://doi.org/10.21660/2019.56.4773>.
- Samitthiwetcharong, Sutisa, Pratin Kullavanijaya, and Orathai Chavalparit. 2017. 'Anaerobic Biodegradation of Polylactic Acid under Mesophilic Condition Using Thermal-Alkaline Pretreatment'. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 222 (July): 012009. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/222/1/012009>.
- Samorì, Chiara, Marina Basaglia, Sergio Casella, Lorenzo Favaro, Paola Galletti, Loris Giorgini, Davide Marchi, Laura Mazzocchetti, Cristian Torri, and Emilio Tagliavini. 2015. 'Dimethyl Carbonate and Switchable Anionic Surfactants: Two Effective Tools for the Extraction of Polyhydroxyalkanoates from Microbial Biomass'. *Green Chemistry* 17 (2): 1047–56. <https://doi.org/10.1039/C4GC01821D>.
- Scaffaro, Roberto, Andrea Maio, Fiorenza Sutera, Emmanuel Gulino, and Marco Morreale. 2019. 'Degradation and Recycling of Films Based on Biodegradable Polymers: A Short Review'. *Polymers* 11 (4): 651. <https://doi.org/10.3390/polym11040651>.
- Seggiani, Maurizia, Patrizia Cinelli, Elena Balestri, Norma Mallegni, Eleonora Stefanelli, Alessia Rossi, Claudio Lardicci, and Andrea Lazzeri. 2018. 'Novel Sustainable Composites Based on Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) and Seagrass Beach-CAST Fibers: Performance and Degradability in Marine Environments'. *Materials* 11 (5): 772. <https://doi.org/10.3390/ma11050772>.
- Shah, Aamer Ali, Fariha Hasan, Abdul Hameed, and Safia Ahmed. 2008. 'Biological Degradation of Plastics: A Comprehensive Review'. *Biotechnology Advances* 26 (3): 246–65. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>.
- Shen, Maocai, Biao Song, Guangming Zeng, Yaxin Zhang, Wei Huang, Xiaofeng Wen, and Wangwang Tang. 2020. 'Are Biodegradable Plastics a Promising Solution to Solve the Global Plastic Pollution?' *Environmental Pollution* 263 (August): 114469. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469>.
- [site.unibo.it/b-plas](https://site.unibo.it/b-plas). <https://site.unibo.it/b-plas/en/mission>.
- Šmejkalová, Pavla, Veronika Kužníková, Jan Merna, and Soňa Hermanová. 2016. 'Anaerobic Digestion of Aliphatic Polyesters'. *Water Science and Technology* 73 (10): 2386–93. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.088>.
- stampipe 2016. 'Cosa sono le materie plastiche'. *SCM* (blog). 12 July 2016. <https://stampimaterieplastiche.com/cosa-sono-le-materie-plastiche/>.

- Strazzera, Giuseppe, Federico Battista, Natalia Herrero Garcia, Nicola Frison, and David Bolzonella. 2018. 'Volatile Fatty Acids Production from Food Wastes for Biorefinery Platforms: A Review'. *Journal of Environmental Management* 226 (November): 278–88. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>.
- Sudesh, K, H Abe, and Y Doi. 2000. 'Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters'. *Progress in Polymer Science* 25 (10): 1503–55. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6).
- Tan, Giin-Yu, Chia-Lung Chen, Ling Li, Liya Ge, Lin Wang, Indah Razaad, Yanhong Li, Lei Zhao, Yu Mo, and Jing-Yuan Wang. 2014. 'Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review'. *Polymers* 6 (3): 706–54. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>.
- Tarrahi, Roshanak, Zahra Fathi, M. Özgür Seydibeyoğlu, Esmail Doustkhah, and Alireza Khataee. 2020. 'Polyhydroxyalkanoates (PHA): From Production to Nanoarchitecture'. *International Journal of Biological Macromolecules* 146 (March): 596–619. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.181>.
- The Circular Economy for Plastics - A European Overview, PlasticsEurope 2019. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1899-circular-economy-plastics-european-overview>.
- Tokiwa, Yutaka, Buenaventurada Calabria, Charles Ugwu, and Seiichi Aiba. 2009. 'Biodegradability of Plastics'. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (9): 3722–42. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>.
- Urbanek, Aneta K., Aleksandra M. Mirończuk, Alberto García-Martín, Ana Saborido, Isabel de la Mata, and Miguel Arroyo. 2020. 'Biochemical Properties and Biotechnological Applications of Microbial Enzymes Involved in the Degradation of Polyester-Type Plastics'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1868 (2): 140315. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140315>.
- Vaverková, Magdalena, and Dana Adamcová. 2015. 'BIODEGRABILITY OF BIOPLASTIC MATERIALS IN A CONTROLLED COMPOSTING ENVIRONMENT'. *Journal of Ecological Engineering* 16: 155–60. <https://doi.org/10.12911/22998993/2949>.
- Woolnough, Catherine Anne, Lachlan Hartley Yee, Timothy Stuart Charlton, and Leslie John Ray Foster. 2013. 'A Tuneable Switch for Controlling Environmental Degradation of Bioplastics: Addition of Isothiazolinone to Polyhydroxyalkanoates'. Edited by Bing Xu. *PLoS ONE* 8 (10): e75817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075817>.
- www.european-bioplastics.org. 'Www.European-Bioplastics.Org'. *European Bioplastics e.V.* (blog). <https://www.european-bioplastics.org/>.
- Yagi, Hisaaki, Fumi Ninomiya, Masahiro Funabashi, and Masao Kunioka. 2009. 'Anaerobic Biodegradation Tests of Poly(Lactic Acid) under Mesophilic and Thermophilic Conditions Using a New Evaluation System for Methane Fermentation in Anaerobic Sludge'. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (9): 3824–35. <https://doi.org/10.3390/ijms10093824>.
- Zia, Khalid Mahmood, Aqdas Noreen, Mohammad Zuber, Shazia Tabasum, and Mohammad Mujahid. 2016a. 'Recent Developments and Future Prospects on Bio-Based Polyesters Derived from Renewable Resources: A Review'. *International Journal of Biological Macromolecules* 82 (January): 1028–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.040>.