

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in
ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**SVILUPPO DI METODOLOGIE PER L'ANALISI DI
COMPOSTI ORGANICI PRODOTTI DALLA
FERMENTAZIONE DI FRAZIONI PIROLITICHE
DELLA BIOMASSA**

Tesi di laurea in analisi chimica della qualità ambientale

Relatore

Prof. DANIELE FABBRI

Presentata da

HELENA CORDIANI

III sessione

Anno Accademico 2012/2013

Indice

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

Poli(idrossialcanoati), PHA.....	7
Benefici/costi.....	8
Nuove tecnologie	8
Meccanismi di sintesi da MMC.....	9
Acidi grassi volatili, VFA.....	10
Utilizzo prodotti della fermentazione	11
Olio di pirolisi come substrato	12
Processi di produzione di PHA.....	13
Stoccaggio PHA.....	14
PHB	16
Caratteristiche PHB	16
Metodi analitici per la determinazione del PHA.....	18
La pirolisi analitica.....	20
SCOPO	23

CAPITOLO II: MATERIALI E METODI

Materiali	24
Standard	24
Solventi.....	25
Campioni.....	25
Strumentazioni	27
PIROLISI ANALITICA, GC/FID, GC/MS, GC/TCD.....	27
Coltivazioni microbiche.....	28
Test di biometanazione.....	28
Metodi d'analisi	30
Single Drop Exctraction-SDE.....	30
Analisi in GC/FID	30
Analisi del Biogas	31
Produzione PHA.....	32

SBR_sequencing batch reactor.....	32
Composizione del medium colturale	32
Preparazione biomassa	32
Metodi d'analisi	33
Metanolisi	33
Pirólisi off-line.....	33
Analisi in GC/MS	34
Analisi in GC/FID.....	35
Metodo di quantificazione dei composti	36
Calcolo della resa dei prodotti di pirólisi	36
Calcolo della quantità di PHA nei campioni di MMC da PY/GC-FID	36
 <u>CAPITOLO III: RISULTATI E DISCUSSIONI</u>	
Test di biometanazione	38
Esperimenti in batch	46
Determinazione dei PHA tramite pirólisi analitica	47
Analisi Qualitativa	47
Campioni Reali.....	52
Analisi Quantitativa.....	55
Standard	55
Campioni reali	58
Validazione del metodo.....	61
Calibrazione	61
Ripetibilità.....	64
Accuratezza.....	65
Bianco procedurale	67
Recupero.....	68
Greenness.....	69
 <u>CAPITOLO IV: CONCLUSIONI</u>	
RINGRAZIAMENTI.....	72

BIBLIOGRAFIA73

ABBREVIAZIONI

ADF = aerobic dynamic feeding

GC = gascromatografia

MMC = colture miste microbiche

PHA = poli(idrossialcanoati)

PHB = poli(3-idrossibutirrato)

PHB/HV = poli(idrossibutirrato/valerato)

Py = pirolisi

SBR = sequencing batch reactor

VFA = acidi grassi volatili

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Polimeri biodegradabili, secondo definizione ISO: *polimeri progettati per andare incontro a cambiamenti di struttura chimica, ad opera di organismi viventi come batteri, funghi, alghe, che hanno come risultato la perdita di alcune proprietà.*

Negli anni settanta, in relazione alla crisi petrolifera e di prodotti ritenuti fonte d'inquinamento ambientale, si cercavano polimeri in grado di sostituire quelli di origine petrolchimica dal punto di vista delle proprietà fisiche e industriali, ma senza il problema ecologico. Nel corso degli anni fino ad oggi l'aspetto che maggiormente ha destato preoccupazione è stato quello dell'inquinamento.

I lenti tassi di biodegradazione dei materiali plastici (circa migliaia di anni) hanno generato la necessità di creare polimeri biodegradabili come risposta sostitutiva ai materiali polimerici derivanti dalle poliolefine. Tra i polimeri biodegradabili si trovano: quelli a base di amido, i polilattidi, i poliesteri e i poli(idrossialcanoati).

Questo spiega il crescente utilizzo di materie biodegradabili, che riescono a decomporsi in entrambi gli ambienti aerobici e anaerobici e che riescono a convertirsi in CO₂, acqua e compost senza persistere nell'ambiente o lasciare residui tossici nell'aria dovuti alla loro combustione per smaltirli (Unma et al. 2008). L'attenzione, quindi, è stata focalizzata su risorse rinnovabili e la fermentazione batterica è una possibile via per l'ottenimento di prodotti utili dalla biomassa o da rifiuti industriali. In questo processo i batteri crescono utilizzando sostanza organica e producendo composti di riserva che possono essere trasformati in bioplastiche.

Di grande interesse ambientale sono le sperimentazioni per produrre bioplastiche da materiali di scarto, come ad esempio quelli derivanti dall'industria agroalimentare, ma anche da alghe, stoppie di mais o da raccolta differenziata della frazione organica dei rifiuti urbani (D'Avino, Lazzeri, 2006). Infatti, oltre all'etanolo, importanti polisaccaridi e proteine sono stati ottenuti come prodotti della fermentazione (Morikawa e Marchessault, 1981).

Poli(idrossialcanoati), PHA

Tra i vari polimeri biodegradabili, utilizzabile come plastiche, si trovano i Poli(idrossialcanoati) (PHA), una famiglia di polimeri termoplastici, biodegradabili e biocompatibili. Poliesteri, a catena laterale otticamente attivi, ottenuti per condensazione di testa-coda di diversi tipi di 3-idrossiacidi la cui formula generale di struttura è riportata in fig.1:

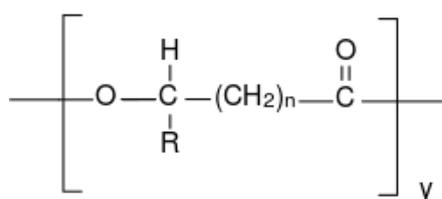


Figura 1 struttura generica PHA

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxyalkanoates>) dove: n è il numero dei gruppi CH_2 , y è il numero dei monomeri che può variare da 100 a 30.000, e R è la catena laterale.

La composizione dei *PHA* dipende dal tipo di batteri da cui sono sintetizzati e di conseguenza dalla matrice di coltura.

Si usa distinguerli in PHA a catena corta ($R= 1-5$) e media ($R= 6-15$). La grande variabilità delle catene laterali e dei monomeri conferisce a tali materiali altrettanta variabilità di caratteristiche fisiche (Jendrossek, 2002). Infatti, si va da polimeri tipicamente termoplastici, quale il poli(3-idrossibutirrato) *PHB*, a gomme quale il poliidrossiottanoato e a possibilità d'interventi chimici secondari (ad esempio reticolazioni) (Valera, 2001).

Tutti gli attuali processi industriali per la produzione di PHA utilizzano colture microbiche pure (inclusi talvolta organismi geneticamente modificati) con un substrato ad alto contenuto di carbonio (Arcos-Hernandez, et al., 2010). Correntemente il PHA è sintetizzato da vari generi di batteri gram+ e gram- (come ad esempio *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes/Ralstonia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*) attraverso la fermentazione di zuccheri o lipidi (Valera, 2001).

I batteri immagazzinano il PHA, sottoforma di granuli nelle cellule del citoplasma, quando sono sottoposti a forti condizioni di stress causate da una limitazione di nutrienti (quali azoto N, fosforo, P e zolfo S),

elettroni donatori o accettori (Anderson e Dawes 1990; Majone et al., 1997; Satoh et al., 1998; Gujer et al., 1999).

Le colture pure sono in grado di accumulare PHA sopra il 90% del loro peso secco (Steinbuchel, et al., 1995; Lee e Choi, 1998; Madison e Huisman, 1999; Grothe et al., 1999).

Benefici/costi

I poli(idrossialcanoati) essendo biodegradabili, biocompatibili e sintetizzati da risorse rinnovabili hanno avuto, nell'ultimo decennio, un grande interesse a livello commerciale. Inoltre, grazie alle varie proprietà chimiche e fisiche sono stati utilizzati in molti campi dell'industria, dagli imballaggi fino ai prodotti medici (Rai et al., 2011).

Nonostante, i potenziali benefici che i PHA possono portare alla sostenibilità ambientale, la loro commercializzazione è ostacolata dagli alti costi di produzione (€9/Kg per il poli(idrossibutirrato) (PHB) contro €1/Kg per le plastiche derivate dal petrolio) (Biby, 2002) dalle 4 alle 9 volte maggiore delle plastiche sintetiche (Choi e Lee 1997; Braunegg et al., 1998; Reddy et al., 2003). Rimangono inoltre non competitivi rispetto alle tradizionali plastiche anche a causa delle difficoltà per ottenere determinate proprietà dal materiale desiderato (Thomson, 2009). I PHA sono industrialmente prodotti da colture microbiche pure usando come substrato glucosio e acido propionico. Il maggior costo della produzione è determinato proprio dal prezzo del substrato (molassa, glucosio, propionato) e dalle tecniche di estrazione del polimero dalle celle (Reis et al., 2003).

Nuove tecnologie

Gli alti costi di produzione del PHA hanno portato l'industria a valutare ogni possibilità per abbattere i prezzi, di questi biopolimeri, cercando nuove e più efficienti tecnologie: nuovi processi, diversi substrati e una grande varietà di microorganismi che riescono ad accumulare PHA. In ogni caso poiché il maggior costo, come già detto, è dato dal substrato si devono investigare substrati di minor qualità, in particolare quelli di scarto come i rifiuti o derivati da processi di pirolisi quali l'olio (Koller et al., 2010; Kim 2000; Reddy et al., 2003). Negli ultimi anni, infatti, è stata esplorata la possibilità di utilizzare colture microbiche miste, MMC (Van Loosdrecht et al., 1997; Beccari et al., 1998; Chua and Yu, 1999; Dionisi et al., 2001, 2004; Beun et al., 2002; Chua et al., 2003; Serafim et al., 2004; Lemos et al., 2006), come ad esempio i fanghi attivi (a

basso costo o talvolta gratuiti), che possono facilmente utilizzare substrati complessi, adattandosi completamente ai diversi cambiamenti che avvengono al loro interno.

La combinazione di nuove tecnologie e l'utilizzo di MMC hanno portato un notevole risparmio: a livello energetico (poiché non è più richiesta la sterilizzazione), nella riduzione dei costi per la fermentazione (i materiali sono più economici per la costruzione dei reattori) e minimizzato il bisogno di frequenti controlli della strumentazione (Serafim e Lemos, 2008). Un ulteriore vantaggio del processo con MMC è che possono essere utilizzati una grande varietà di complessi substrati, poiché, al contrario delle colture pure l'immagazzinamento di PHA non è indotto dalla limitazione dei nutrienti (Serafim, 2008). Questo è particolarmente vantaggioso se vengono utilizzati i rifiuti industriali dal contenuto non ben definito.

Molti approcci differenti sono basati sull'uso di colture microbiche miste, ma nessuno a tutt'oggi è stato implementato su scala industriale.

Meccanismi di sintesi da MMC

La sintesi del PHA da colture miste è stata monitorata per la prima volta in impianti per il trattamento delle acque reflue durante il trattamento per la rimozione biologica del fosforo, EBPR (Wallen and Rohwedder, 1974). Questi trattamenti operano con cicli alternati, in condizioni anaerobiche e aerobiche, e i principali gruppi di batteri responsabili dell'accumulo selezionato di PHA, sotto queste condizioni, sono i batteri eterotrofi che accumulano fosforo, *Polyphosphate-accumulating organisms* (PAOs) e i batteri che accumulano glicogeno, *glycogen accumulating organism* (GAOs). Infatti, in entrambi i gruppi di questi microorganismi la sintesi del PHA gioca un ruolo importante nel loro metabolismo (Serafim, 2008).

Fanghi con una notevole capacità di accumulo di PHA sono stati osservati anche nel trattamento aerobico delle acque reflue (Majone et al., 1996). Questo processo aerobico in condizioni *feast/famine* o Aerobic Dynamic Feeding (ADF) è stato per primo proposto da Majone et al., 1996: si origina da periodi di eccesso di carbonio (in un reattore selezionato) *feast*, alternati con limitazione di substrato (nel reattore principale) *famine*, favorendo l'accumulo di PHA. Questa necessità fisiologica di adattamento a causa della mancanza di una sufficiente quantità di enzimi o RNA necessari per la crescita è considerato il più

probabile meccanismo di stoccaggio di PHA da colture miste sottoposte a condizioni di stress (Anderson e Dawes, 1990).

Carta et al. 2001 hanno dimostrato che le MMC sotto condizioni *feast/famine* sono in grado di produrre PHA da composti zuccherini.

Quindi, quando la materia prima contiene al suo interno composti a base di zucchero il primo step richiesto è quello della fermentazione, per trasformare i carboidrati in acidi grassi volatili (VFA) e altri acidi carbossilici, i quali successivamente potranno essere usati nelle 2 fasi successive di accumulo e produzione di PHA.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati da molti autori (Dionisi et al., 2001; Beun et al., 2002; Serafim et al., 2004), processi per la produzione di PHA da colture miste con reattori batch in sequenza (SBR).

I reattori batch in sequenza sono sistemi compatti in cui possono essere indotte condizioni *feast* e *famine* in un unico ciclo completo, anche utilizzando un solo reattore. La lunghezza di ogni fase può essere, poi, variata mantenendo però sempre la stessa ritenzione di fanghi, tempo e carico organico. Bengtsson et al. (2008) hanno creato un processo alternativo all'SBR, sempre per quanto riguarda la produzione di PHA dalle acque reflue di una cartiera, attraverso dei *reattori in continuo*.

Acidi grassi volatili, VFA

Gli acidi grassi volatili (VFA) comprendono un gruppo di acidi monocarbossilici alifatici con catene di lunghezze fino a sei atomi di Carbonio: formico, acetico, propionico, iso-butirrico, *n*-butirrico, iso-valerico, *n*-valerico, iso-caproico, acidi *n*-caproico (Raposo et al. 2013). Essi sono prodotti nel corso della fase acidogena, nella degradazione della sostanza organica.

La digestione anaerobica è un processo complesso di trasformazione della sostanza organica, operato da diverse popolazioni batteriche, con la produzione di un gas (biogas) costituito prevalentemente da metano e da biossido di carbonico. Il processo avviene attraverso diverse reazioni degradative operate da differenti popolazioni microbiche (Zehnder, 1988). Nel dettaglio le fasi sono:

- Idrolisi, le molecole organiche subiscono scissione in composti più semplici, quali: monosaccaridi, amminoacidi e acidi grassi.

- Acidogenesi, ulteriore scissione in molecole ancora più semplici, acidi grassi volatili (VFA) con produzione di sottoprodotti, quali ammoniaca, anidride carbonica e acido solfidrico.
- Acetogenesi, le molecole semplici prodotte nel precedente stadio sono ulteriormente digerite producendo biossido di carbonio CO_2 , idrogeno H_2 e principalmente acido acetico CH_3COOH .
- Metanogenesi, con produzione di metano CH_4 , biossido di carbonio CO_2 e acqua H_2O .

I prodotti finali della fermentazione, nella fase acidogenica, sono molto importanti per la prestazione dell'intero sistema perché influenzano l'efficienza e la velocità della fase metanogenica. (Ren et al., 2003). La frazione di conversione dagli acidi grassi volatili all'acido acetico ha un effetto sulla quantità dei batteri metanogeni e conseguentemente sulla degradazione dell'acido acetico e la resa del metano (Wang et al., 1999). Come dimostrato da molti studi, la frazione di conversione dei VFA a metano varia in ordine di acido acetico>etanolo>butirrico>propionico (Ren et al., 2005). Prima di essere degradati a metano, tutti i VFA sono prima convertiti in acido acetico e la frazione di conversione varia in ordine di etanolo>acido propionico.

Data l'importanza dei VFA ci sono stati molti studi su tale argomento. Dogan et al., (2005) si sono occupati dell'inibizione dei batteri metanogeni causata da un singolo VFA. Altre ricerche hanno considerato che l'accumulo di acido Propionico (Pr) alla concentrazione di 2850mg/l di Pr e 10.0g/L di VFA totali inibisce l'attività dei batteri metanogeni fino a quando i VFA totali raggiungono la concentrazione di 6200-8500 mg/L. Conseguentemente si ha una crescita nella produzione di metano (Wang et al., 2009).

Utilizzo prodotti della fermentazione

La fermentazione è importante per lo sviluppo di nuovi prodotti energetici attraverso la degradazione anaerobica della sostanza organica (Wang et al., 1999), come sopra descritto.

Se effettuata in appositi reattori dopo lo sviluppo dei VFA si ha la produzione di biogas (biometano), bioetanolo o prodotti chimici, che possono essere utilizzati come combustibili (per uso domestico e/o industriale), oppure in impianti di cogenerazione per la produzione di energia termica e elettrica. Se si considerano gli acidi grassi volatili, invece, essi possono essere trasformati in bioplastiche (precedentemente descritto) come: polilattidi, poliesteri e poli(idrossialcanoati).

Olio di pirolisi come substrato

La digestione anaerobica è un processo in grado di trattare una grande varietà di materiali di origine biologica. Una prima fase della riguarda la degradazione dei biopolimeri (cellulosa, lignina, emicellulosa, amido ecc...), tuttavia questo processo può essere lento per polimeri cristallini come la cellulosa, o inefficace per polimeri recalcitranti come la lignina. Infatti, l'applicazione di questa tecnologia rimane limitata a substrati facilmente idrolizzabili. La conversione dei biopolimeri in prodotti a basso peso molecolare può essere effettuata, però tramite degradazione termica.

La tecnica della pirolisi, infatti, permette la conversione di tutti i costituenti della biomassa in un liquido chiamato (bio-olio), un gas (syngas) e un residuo solido (il biochar, utilizzabile come ammendante solido e per lo stoccaggio di carbonio). Il bio-olio è considerato il combustibile liquido meno costoso ottenibile dalla biomassa, con costi fino a tre volte inferiori a quelli dei processi puramente biologici (come ad esempio la fermentazione), che richiedono substrati selezionati e grandi volumi di reazione (Jarboe et al., 2011). Purtroppo le applicazioni del bio-olio sono ancora poche, a causa della complessità della matrice.

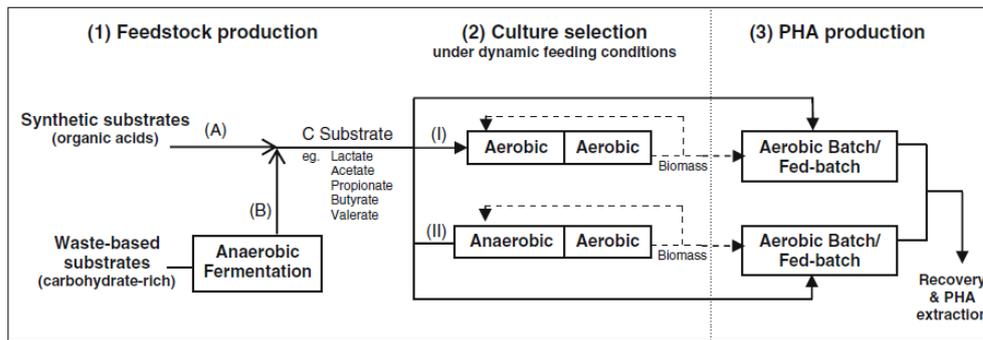
Conoscendo i limiti dei processi termochimici come la pirolisi (scarsa selettività) e della digestione anaerobica (lunghi tempi di reazione), l'accoppiamento della degradazione termica con il processo della fermentazione è in grado di unire i vantaggi della fermentazione (selettività) con quelli della conversione termochimica (velocità e variabilità dell'input) (Guiot et al., 2011). Esistono studi sull'uso del bio-olio come substrato per la produzione di biogas (Andreoni et al., 1990; Demirbas et al., 2006) oppure utilizzato per la produzione di PHA (Valera, 2001; Lemos et al., 2006; Serafim et al., 2008). Infatti, l'utilizzo di un substrato misto di acetato e olio di pirolisi, come risorsa di carbonio, per la crescita di MMC, porta ad un soddisfacente accumulo di PHA. Nel recente lavoro di Moita e Lemos (2012) è stato ottenuto un copolimero composto dal 70% in HB e un 30% in HV.

Processi di produzione di PHA

Come già detto, uno dei vantaggi dell'utilizzo delle colture microbiche miste è la possibilità di sfruttare anche i substrati che provengono da rifiuti (come l'olio di pirolisi). Infatti, uno dei principali obiettivi della produzione di PHA, da MMC, è passare dall'utilizzo di un singolo substrato a substrati complessi, molti dei quali sono ricchi di carboidrati. Anche se quest'ultimi, di per sé non sono buoni substrati per la produzione di PHA perché sono preferibilmente trasformati in glicogeno, invece che in PHA (Carta et al, 2001;. Dirks et al., 2001), tuttavia, possono essere convertiti in PHA se sono prima fermentati in acidi grassi volatili (VFA) (Reis et al., 2003).

I processi per la produzione di PHA da colture miste (come i fanghi attivi) in un substrato complesso (come ad esempio acque reflue) includono 3 fasi (fig.2):

1. **PRODUZIONE DA MATERIA PRIMA:** è la prima fase anaerobica ed è costituita dalla fermentazione acidogenica in cui avviene la produzione degli acidi grassi volatili (VFA), quindi la fermentazione acida del refluo;
2. **SELEZIONE DELLE COLTURE:** la fase seconda aerobica o anaerobica/aerobica (ampiamente applicata quando gli acidi organici sono stati utilizzati come materia prima da Baccari et al., 1998; Beun et al., 2002; Dionisi et al., 2004; Serafim et al., 2004; Lemos et al., 2006): si svolge all'interno di un reattore sequenziale aerobico SBR alimentato dal refluo fermentato (fanghi attivi) ricco dei VFA prodotti. Questa fase ha lo scopo di arricchire e selezionare popolazioni microbiche miste in grado di trasformare i VFA in PHA durante i periodi di disponibilità del substrato (feast) e di utilizzarli come fonte interna di carbonio durante i cicli con carenza di substrato (famine), acquisendo un vantaggio metabolico nei confronti delle popolazioni non in grado di accumulare i PHA come riserva di carbonio;
3. **PRODUZIONE PHA:** è la terza fase in cui l'impiego della biomassa, selezionata durante la seconda fase del processo nel reattore batch, è utilizzata per la produzione di PHA.



Three-step PHA production process by mixed microbial cultures using either synthetic (A) or waste-based substrates (B) and conducting PHA-accumulating culture selection using Aerobic/Aerobic (I) or Anaerobic/Aerobic (II) dynamic feeding strategies. PHA production (step 3) is carried out in batch/fed-batch mode using the cultures enriched in step 2 and the feedstock produced in step 1

Figura 2 schema processi PHA (Seramif et al., 2008)

Un esempio di questo tipo di lavoro per la produzione di PHA da colture miste attraverso l'utilizzo di VFA da acque reflue è stato svolto da Cai et al. 2011, per ridurre contemporaneamente il costo, sia della produzione PHA che dello smaltimento acque reflue.

Stoccaggio PHA

La valutazione della massima capacità di accumulo di PHA è stata molte volte valutata in passato su substrati puri e solo recentemente sugli eterogenei substrati dei rifiuti che, attraverso colture selezionate, hanno la capacità di stoccare PHA.

Nella fig.3 sono presentati i risultati trovati in letteratura per quanto riguarda la fase di accumulo di PHA da substrati complessi sotto le condizioni di alimentazione dinamica aerobica, ADF. Ciò che si nota è che le colture hanno prodotto, nella maggior parte dei casi, copolimeri di 3-idrossibutirrato e 3-idrossivalerato.

La formazione di altri polimeri, oltre che dell'idrossibutirrato, è il diretto risultato della diversità dei VFA di e altri composti presenti nel substrato. Questo è il miglior vantaggio dell'utilizzare substrati complessi, infatti la natura del substrato non solo determina il contenuto di PHA, ma anche la sua composizione, la quale avrà conseguentemente effetti sulle proprietà del polimero finale (Reis et al., 2003).

Accumulation step							Culture selection		Reference
Substrate	System	Total carbon	Storage yield	Specific productivity	PHA content	PHA composition	System	Substrate	
Acetate	AE	5,760	0.87	0.72	65	P(3HB)	AE	Acetate	Serafim et al. (2004)
Fermented OME	AE	1,100	1.00	0.42	54	P(3HB/3HV) 89:11	AE	Mixture of acetate, propionate, lactate	Dionisi et al. (2005b)
Fermented molasses	AE	9,225	0.63	0.13	33	P(3HB/3HV) 83:17	AE SBR	Fermented molasses	Albuquerque et al. (2008)
	AE	6,300	0.53	0.11	30	P(3HB/3HV) 84:16	AE Continuous		
Fermented paper mill effluents	AE	140	0.71	0.054	48.2	P(3HB/3HV) 39:61	AE	Fermented paper mill effluents	Bengtsson et al. (2008a)
Industrial waste water	AE	104	0.14	0.0082	NR	NR	AE	Industrial waste water	Dionisi et al. (2006a)
Tomato cannerly wastewater	AE	535	0.075	0.018	20	P(3HB)	AE	Tomato cannerly wastewater	Liu et al. (2008)
Primary sludge	AE	2,445	0.84	0.059	32	P(3HB/3HV) 35:65	AE	Primary sludge	Gurieff (2007)
Tomato cannerly wastewater	AE	5,040	0.83	0.151	45	P(3HB/3HV) 83:17			
Fermented POME	AE	260 g COD/g N	NR	0.30 g/g.h ^a	44.5	NR	AE	Fermented POME	Din et al. (2006)
Fermented brewery wastewater	AE	1,950	0.59 CmM/ CmM ^a	0.13 CmM/ CmMh ^a	38	NR	AE	Fermented brewery wastewater	Mato et al. (2008)

Units: Total carbon in mg SCOD/L, storage yield defined as the amount of PHA produced in COD per amount of COD of carbon substrate, g COD; PHA/g SCOD, specific productivity, amount of PHA produced per the amount of active biomass per hour, in g COD PHA/COD X.h, PHA content in g PHA/g biomass × 100, PHA composition in %mol

NR not reported

^a Not enough data for unit conversion

Figura 3 Rese stoccaggio PHA (da letteratura) ottenuto sotto condizioni ADF usando substrati complessi. (Serafim et al., 2008)

La produzione, quindi, di PHA da colture miste con rifiuti, come substrato, sembra abbia numerosi vantaggi rispetto al processo in cui sono utilizzate colture pure e substrati singoli. Nonostante le continue ricerche per migliorare il processo permane però il problema del minor contenuto di PHA e la più bassa produttività volumetrica rispetto alle colture pure (Serafim et al., 2008). Infatti lo stoccaggio di PHA da parte di colture miste può arrivare intorno ad un 60% del peso secco del fango (Meesters, 1998; Satoh et al., 1998), mentre quello da colture pure intorno ad un 80% del peso secco della cellula (Steinbuchel, et al., 1995; Lee e Choi, 1998; Madison e Huisman, 1999; Grothe et al., 1999).

PHB

Tra i principali poli(idrossialcanoati) prodotti in natura si trova il poli(3-idrossibutirrato) PHB (fig.4), scoperto e studiato dal microbiologo francese M. Lemoigne, nel 1925.

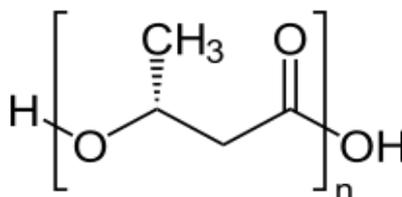


Figura 4 Formula struttura PHB

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxybutyrate>)

Il PHB, come tutti i PHA, è prodotto da microrganismi in risposta a condizioni di stress fisiologico. Infatti, è il prodotto della assimilazione del carbonio da fonti quali il glucosio o amido, ed è impiegato dai microrganismi quale molecola di riserva da metabolizzare quando altre fonti di energia non sono disponibili.

Il substrato più comunemente usato per studiare il processo ADF, per lo sviluppo dell'idrossibutirrato, è l'acetato (Beun et al., 2000; Dionisi et al., 2001; Serafim et al., 2004). Altri substrati, quali etanolo (Beccari et al., 2002), lattato (Dionisi et al., 2004a) o glutammato (Dionisi et al., 2004b) si trasformano in PHB da colture miste. Ad eccezione del lavoro di Dionisi et al. (2004), non vi è alcun riferimento in letteratura sui meccanismi di produzione di PHA da VFA, diverso da acetato, da colture miste sottoposte a condizioni di ADF.

Caratteristiche PHB

Il PHB è per molti aspetti simile al polipropilene (vedi fig.5), ma a differenza di questo ha una temperatura di transizione vetrosa (T_g) troppo elevata e una resistenza all'urto troppo bassa (Valera, 2001). Inoltre, la temperatura di fusione è molto vicina a quella di degradazione, il che rende problematica, la lavorazione con le tecniche convenzionali in uso per i polimeri termoplastici.

Proprietà fisico-meccaniche

	PHB	PHB/HV _{20%}	PP
Densità (g/cm ³)	-	1,25	0,90
T _g (°C)	+15	-1	-10
T _f (°C)	175	145	176
Cristallinità (%)	80	42	70
Resistenza a trazione (Mpa)	40	30	38
Allungamento a rottura (%)	8	50	40
Resistenza a flessione (Gpa)	3,5	1,0	-
Resistenza all'urto Izod-n. (J/m)	60	300	100
Costante dielettrica a 1 MHz	3	3	-
Resistività (ohm-cm)	≥10 ¹⁶	≥10 ¹⁶	≥10 ¹⁶
Temperatura superiore di impiego (°C)	130	99	135
<i>Resistenza chimica</i>			
Acidi	1	1	4
Alcali	1	1	4
Alcoli	2	2	4
Oli e grassi	3	3	2/3
Resistenza agli UV	2	2	1

T_g=temperatura di transizione vetrosa; *T_f*=temperatura di fusione; *Resistenza chimica e agli UV*: 1=scarsa, 2=discreta, 3=buona, 4=ottima; PHB=poliidrossibutirrato; PHB/HV=copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato; PP=polipropilene.

Figura 5 Proprietà chimico/fisiche PHB, PHB/HV, PP (Valera, 2001)

È peraltro possibile ottenere una composizione specifica del monomero, a seconda del tipo di VFA che si alimenta nella coltura, in dipendenza del tipo di applicazione industriale a cui verrà destinato (Lemos et al., 2006). Le proprietà meccaniche e termiche del PHA possono, quindi, essere variate attraverso il tipo di VFA fornito.

Dionisi et al. (2004) ha ottenuto un omopolimero di poli(idrossivalerato) (PHV) da propionato e un copolimero (34% idrossibutirrato e il 66% di idrossivalerato) da una miscela di acetato e propionato. Beccari et al., (1998) hanno ottenuto un copolimero di idrossivalerato-idrossibutirrato (50:50%) da una miscela di acetato, propionato, butirrato e valerato.

Come già detto precedentemente, copolimeri con idrossivalerato risaltano un insieme di proprietà che complessivamente consentono di affiancarlo al polipropilene e nel contempo riducono il problema della fragilità e della lavorabilità (Lemos et al., 2006). La temperatura di degradazione termica dei copolimeri rimane, infatti, uguale a quella degli omopolimeri, mentre la temperatura di fusione diminuisce, senza peraltro scendere al di sotto di valori che ne limitino significativamente gli impieghi (Valera, 2001).

Metodi analitici per la determinazione del PHA

Attualmente, il metodo analitico tradizionale per la quantificazione dei PHA è quello utilizzato da Braunegg et al. (1978) e ripreso poi da Lemos et al. (2006). È un processo lungo e con molti passaggi, che si basa sull'idrolisi o l'alcolisi del polimero seguita da una purificazione del campione e analisi in GC-MS.

Poiché PHA sono formati da monomeri esterificabili, l'approccio tradizionale è l'alcolisi del polimero nel corrispondente monomero esterificato (analogamente alla procedura di analisi per determinare la quantità degli acidi grassi esterificabili in campioni di lipidi). In questo metodo ai granuli di polimero e/o la biomassa batterica liofilizzata vengono aggiunti del metanolo (dall'1 al 4% H_2SO_4 g/L) con cloroformio come co-solvente, la reazione viene agitata a refluxo per 4-8 ore, poi si aggiunge dell'acqua alla miscela, si separano le fasi e infine lo strato organico viene essiccato e sottoposto ad analisi in GC-MS.

Fondamentalmente il problema principale è che i polimeri sono molto resistenti all'idrolisi. Così, i solventi scelti per l'estrazione e le misurazioni analitiche sono sempre stati i composti clorurati. Ad oggi però sia per il cloroformio che per il diclorometano sono state applicate regole restrittive per il loro utilizzo (sia in laboratori che al livello industriale) in quanto sono classificate come pericolose per la salute umana e per l'ambiente dal *Regolamento (CE) n. 1272/2008*.

Una soluzione è stata proposta da Werker et al., (2008), che hanno utilizzato miscele di esanolo/alcoli piuttosto che solventi clorurati per la determinazione di PHA da colture microbiche miste, MMC. Nonostante l'utilizzo di solventi "verdi" il processo di determinazione è lungo e sempre con molti passaggi e questo crea altrettanti rifiuti da smaltire.

Analisi quantitative veloci e senza l'utilizzo di solventi e reagenti tossici sono quelle dirette che non richiedono la degradazione chimica. Tra queste si trovano:

- l'analisi termogravimetrica (TG), per verificare il comportamento del PHA durante la degradazione termica (fig.6), Hahn e Chang, (1995), Li et al., (2003),

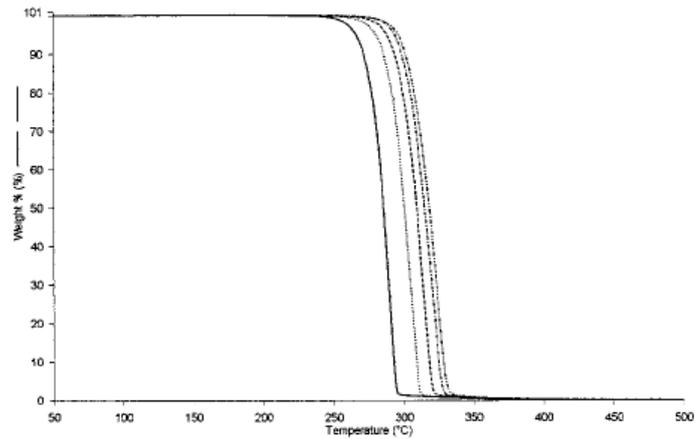


Figura 6 Curva TG della degradazione termica del PHB (Li et al., 2003)

altri studi hanno previsto invece l'accoppiamento della TG con la tecnica della pirolisi analitica per verificarne il meccanismo di scissione (*cis*-eliminazione) (Aoyagi et al., 2002);

- la fluorescenza Nile red, per studi quantitativi sulla concentrazione di PHA accumulato da microorganismi (fig.7) sono stati svolti da Zuriani et al., (2012);

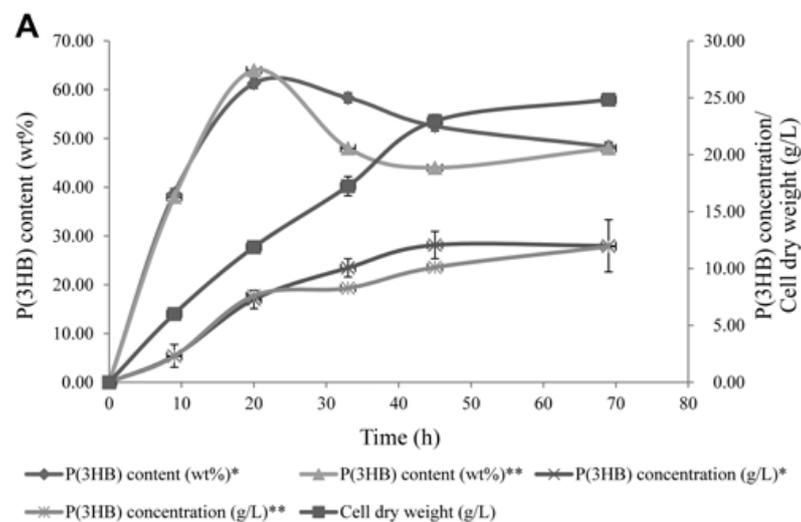


Figura 7 Monitoraggio dell'accumulo di PHA da *Cupravidius* sp. USMAA1020 incubata a 30°C in un bioreattore da 1.5L (Zuriani et al., 2013)

- la spettroscopia FT-IR, per la quantificazione dei poli(idrossialcanoati) da colture batteriche miste Hong et al., (1999), infatti riduce il tempo di analisi di 30 min ed elimina i rifiuti pericolosi che venivano a crearsi (Arcos-Hernandez et al., 2010) e soprattutto comparabile ai livelli di accuratezze e riproducibilità ottenuti dall'analisi gas cromatografica (Arcos-Hernandez et al., 2010).

Tutte queste tecniche riescono, quindi, in maniera veloce a quantificare i poli(idrossialcanoati) in maniera ottimale. Il grande svantaggio è che non danno, altresì, informazioni sulla composizione dei monomeri di PHA, non riuscendo a distinguere i diversi idrossiacidi che compongono il polimero.

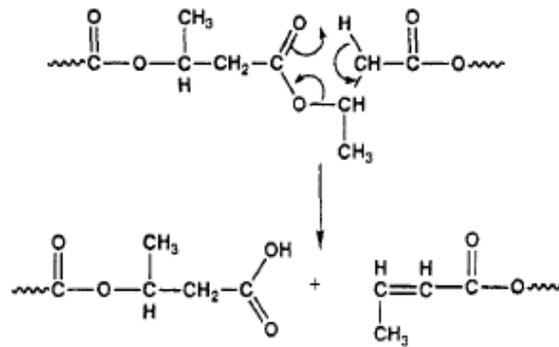
La pirolisi analitica

Un metodo analitico, che potrebbe essere una valida alternativa ai metodi sopra descritti, è la tecnica della *pirolisi analitica*, in cui la frammentazione del polimero avviene a 230-330°C (Hong et al., 1999; Li et al., 2003).

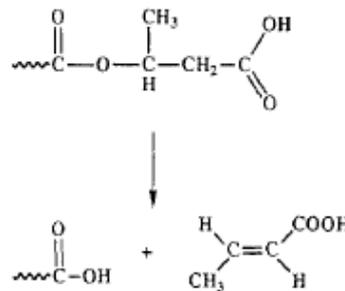
Sulla base del generale meccanismo di degradazione dei poliesteri, la degradazione termica del PHB è generalmente assunta come processo della reazione della β -eliminazione (Lehrle e Williams, 1994). La composizione e la rese dei prodotti di degradazione sono già state studiate in molti lavori (Grassie et al., 1984; Kunioka e Doi, 1990; Mitomo e Ota, 1991), che hanno analizzato i prodotti di pirolisi provenienti dal polimero.

Quando il polimero viene riscaldato sopra i 300°C, oltre alla sua scissione che conduce ad una riduzione del peso molecolare (Li Si-Dong et al., 2002), sono stati osservati i maggiori prodotti volatili (monomeri, dimeri, trimeri e tetrameri) del PHA (Grassie et al., 1984).

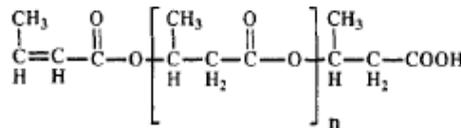
Il meccanismo della β -eliminazione del PHB è mostrato nella figura 8):



The β -elimination reaction of PHB, causing a primary scission.



or



The major volatile degradation products of PHB: crotonic acid and oligomers ($n = 0, 1, 2, \dots$)

Figura 8 Meccanismo di scissione del PHB e degradazione dei prodotti (Lehrle e Williams, 1994)

L'acido 2-butenoico, conosciuto come acido crotonico, è il maggior prodotto della degradazione ed è solitamente classificato come monomero, anche se dovrebbe essere definito meglio come "monomero disidratato" (Morikawa, 1981; Lehrle, 1994). I successivi prodotti, gli oligomeri, che hanno sempre un più alto peso molecolare non sono prodotti molto volatili e a queste temperature potrebbero rimanere all'interno del polimero fino ad una successiva rottura.

A causa della presenza dei gruppi olefinici in ogni molecola, i prodotti di pirolisi possono esistere in due forme, *cis* o *trans* (fig.9), ma sono principalmente formati nella forma *trans* perché lo stato di transizione a sei termini è stericamente più favorito per la configurazione *trans* (Lehrle, 1994).

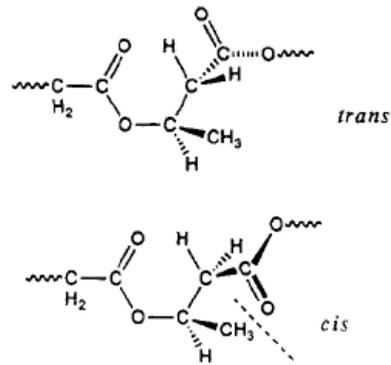


Figura 9 Configurazioni *cis* e *trans* del PHB (Lehrle e Williams, 1994).

Pertanto, i principali prodotti di pirolisi possono essere utilizzati come markers, alternativi al metodo attualmente utilizzato dell'alcolosi, per la determinazione e la quantificazione di PHA nelle colture batteriche. Di conseguenza anche se il comportamento termico e i meccanismi di reazione del PHA, quindi, sono già noti in letteratura, la tecnica della pirolisi analitica non è mai stata utilizzata come metodo per la quantificazione diretta del polimero proveniente dalla biomassa batterica.

SCOPO

I processi microbiologici rivestono una grande importanza nello sviluppo di combustibili e sostanze chimiche da fonti rinnovabili (biomassa), quali: il biometano e le bioplastiche, come i poli(idrossialcanoati), PHA.

Gli alti costi di produzione del PHA da colture microbiche singole ha portato a valutare nuove strategie per il loro stoccaggio, tra cui l'utilizzo di colture microbiche miste (MMC) e substrati di scarto (come l'olio di pirolisi). Gli acidi a catena corta (acidi grassi volatili, VFA), sono i prodotti intermedi nella produzione sia di biogas sia di PHA; Nel presente lavoro sono stati analizzati tramite la tecnica della *single drop extraction* (SDE), già sviluppata nel laboratorio, attraverso un'estrazione con una microquantità di dimetilcarbonato (DMC).

Il metodo tradizionale per la determinazione del PHA è la metanolisi seguita da un'analisi GC-MS, una procedura laboriosa con uso di solventi clorurati e sostanze pericolose per la salute e per l'ambiente. Per tutti questi motivi, c'è una sempre più crescente necessità di trovare un metodo analitico più veloce, che riduca al minimo passaggi intermedi con sostanze pericolose e che non generi rifiuti tossici.

Lo scopo principale di questa tesi è stato quello di sviluppare un nuovo metodo di analisi dei PHA, che si basa sulla pirolisi diretta della biomassa, e soprattutto valutare se la tecnica della pirolisi analitica associata alla gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma può essere utilizzata come metodo valido per la caratterizzazione strutturale e la quantificazione del PHA.

Inoltre è stato studiato come substrato di digestione e conseguente produzione di biogas, l'olio di pirolisi, proveniente da stocchi di mais. Sono stati, quindi, condotti dei test di biometanazione in diversi inoculi, monitorando l'acclimatazione delle comunità batteriche e il comportamento di queste addizionate con micronutrienti e biochar, verificando la conseguente produzione di metano.

CAPITOLO II

MATERIALI E METODI

Materiali

- Lana di quarzo: Quarts wool Agilent Technologies;
- Cartucce adsorbenti: XAD-2 (resina polivinil/divinilbenzene, orbo-43, Supelco).
- Microsiringa Hamilton (10uL)
- Siringhe per inoculi (100mL)

Standard

- Poli(idrossibutirrato) PHB (purezza 100%), fornitore Biomer ®;
- Poli(idrossibutirrato-co-idrossivalerato) PHB/PHV estratto da batteri (percentuale 75/25), fornitore confidenziale.
- Standard di VFA, WSFA-2 della SUPELCO contenente: acido acetico, acido propionico, acido isobutirrico, acido butirrico, acido isovalerico, acido valerico e acido caproico alla concentrazioni di 900-1100 ug/ml in acqua.

Standard interni (S.I.)

- Per VFA: Acido 2-etilbutenoico a 1000mg/L: pesando esattamente circa 50 mg del composto puro al 99% e portandolo a volume in 50ml di acqua deionizzata.

Soluzioni di calibrazione: preparate utilizzando lo standard di VFA a diverse concentrazioni (10-100-200-300-500 mg/L) in vials da 1.5ml con aggiunta fissa ad ognuno di 100uL di SI e 200uL di HKSO₄ saturo, portandoli a volume con acqua distillata. Eseguita poi analisi SDE.

- Per PHA: E' stato preparato lo standard interno pesando in un matraccio da 10ml esattamente 50mg di acido 2-etilbutenoico

(purezza 99%) e portando a volume con acetonitrile; ottenendo così una soluzione di S.I. a 5000mg/L.

- Per metanolisi: Nonano 1000mg/L in acetonitrile.
- Per l'analisi del biogas è stata utilizzata una miscela della Supelco, contenente all'1% i seguenti gas: CO₂, CO, H₂, CH₄ e O₂.

Solventi

Tutti i solventi utilizzati sono forniti dalla Sigma-Aldrich con una purezza del 99.9%:

- Acetonitrile, ACN;
- Acetone C₃H₆O;
- Dimetilcarbonato, DMC;
- Metanolo MeOH;
- Acido Solforico, H₂SO₄;
- Diclorometano, CH₂Cl₂.
- Acqua distillata;
- Soluzione acida satura: preparata con del bisolfato di potassio KHSO₄ e acqua distillata fino a saturazione.

Campioni

La messa a punto del metodo analitico per l'analisi quantitativa del PHB è stata effettuata utilizzando campioni puri di HB e diversi campioni reali, quali:

- Dal nostro laboratorio (Scienze Ambientali "R.Sartori" Ravenna) batteri da colture miste.
- Batteri di coltura singola: *Cupriavidus necator*, forniti dal Dr. Lorenzo Favaro dell'università di Padova.
- Batteri provenienti da colture miste (fornitore confidenziale).

I nostri campioni reali provenienti dal nostro laboratorio sono stati nominati tutti con un prefisso AC (derivante dal substrato di acetato, in cui sono stati fatti adattare) e dei numeri in maniera progressiva ad ogni campionamento.

Strumentazioni

PIROLISI ANALITICA, GC/FID, GC/MS, GC/TCD

- Il pirolizzatore: a filamento CDS Pyroprobe 1000 (Analytical Inc., USA) è dotato di una base da cui è possibile impostare i parametri strumentali, da una sonda recante un filamento di platino a serpentina riscaldato elettricamente, entro cui poi viene posto il porta-campioni di quarzo e da una camera di pirolisi in vetro con tre aperture: una per l'inserimento della sonda, una per l'introduzione del gas inerte (in questo caso azoto, N₂ (10 mL min⁻¹)) ed una, a cui viene inserita inoltre con un giunto di silicone una cartuccia che intrappola i prodotti di pirolisi.
- GC-MS: 6850 Network GC System (Agilent Technologies, USA), dotato di una colonna capillare HP-5 Fused Silica Capillary (fase stazionaria poli[5% difenile/95% dimetile]silossani, 30metri, 0.25 mm spessore), come gas carrier è usato l'elio He (con una pressione costante, velocità lineare di 33 cm s⁻¹ a 200°C).
5975 Network MASS Selective Detector (Agilent Technologies, USA) operante in ionizzazione elettronica (70 eV) acquisendo il segnale in 1 scan s⁻¹ nell'intervallo di 12-600 m/z.
- GC-FID Varian Star 3400 GC dotato di una colonna adatta agli acidi grassi (DB-FFAP 30 m, 0.25 mm, 0.25 um) usando l'iniettore ed il detector alla temperature di using 250°C, come gas carrier è usato l'idrogeno a 40cm/sec, misurato a 100°C. Accoppiato ad un rivelatore a ionizzazioni di fiamma operante a 300°C.
- GC-TCD: 7820 GC Valve System (Agilent Technologies, USA), dotato di 3 colonne in sequenza: HAYESEP N, HAYESEP Q e un setaccio molecolare 800 mesh.

Coltivazioni microbiche

Test di biometanazione

I campioni di inoculi adattati, sui quali sono state svolte le analisi sono stati forniti da *RES – Reliable Environmental Solutions* società cooperativa di Ravenna nell'ambito del progetto "Energia, parte Biomasse" dell'UO Biomasse del CIRI ENA..

Gli inoculi erano stati ottenuti attraverso reattori batch ripetuti di olio di pirolisi durante i test di biometanazione. Sono state fatte 3 aggiunte di olio di pirolisi da stocchi di mais ottenuto a 400°C (in un reattore di 1 litro) di 15 g, 22 g 24 g (1.5%, 2.2%, 2.4 %). La curva di produzione di metano è mostrata in figura 10.

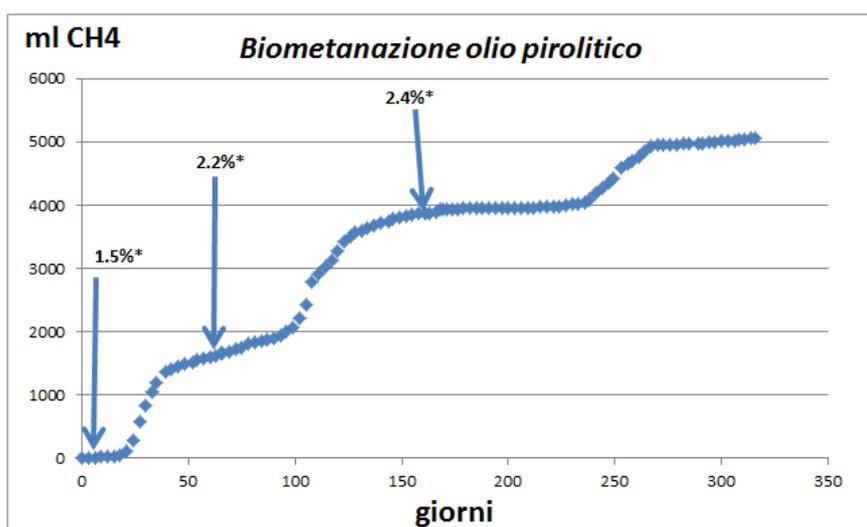


Figura 10 curva di CH₄ cumulato e le tre aggiunte di olio

Gli inoculi che ci sono stati forniti sono stati messi all'interno di 22 siringhe da 100ml, nella quantità di 54,5g/L, insieme ad un bio-olio proveniente dalla pirolisi di stocchi di mais (contenente 19% C – 0.3% N) nella quantità di 5g/L, 10g/L e 50g/L (escluse le siringhe adibite per il controllo: 01, 02).

Sono stati creati campioni con differenti addizioni:

- tal quali (solo bio-olio) (TQ),
- con all'interno del biochar (B),

- con una soluzione all'1% di NH₃ (preparata con 0.3ml NH₃ in 10ml di H₂O) e 20uL di micronutrienti,
- solamente con del glucosio (S),
- due di verifica (senza nessuna ulteriore aggiunta).

Per ciascuna siringa poi è stata fatta una replica e posizionate tutte all'interno di una stufa alla temperatura di 40°C.

Di seguito la tabella 1 riassuntiva con la denominazione dei campioni:

Quantità:	inoculi (g/L)	54,5		
Quantità:	glucosio (S) (g/L)	5		
Quantità:	olio da pirolisi (g/L)	5	10	50
	tal quali	TQ5	TQ10	TQ50
	biochar	B5	B10	B50
	nutrienti	N5	N10	N50

Tabella 1 Caratteristiche inoculi dei test di digestione e biometanazione con denominazione

A cadenza settimanale, poi, le siringhe sono state prese e da ciascuna è stata campionata un'aliquota su cui è stata eseguita la procedura per l'analisi dei VFA e, solo quando necessario, è stato analizzato il biogas prodotto.

La digestione del bio-olio e la conseguente produzione di biogas degli inoculi è stata monitorata in un esperimento di durata circa 5 mesi., monitorando costantemente come variava la fermentazione degli inoculi addizionati in maniera differente.

Metodi d'analisi

Single Drop Extraction-SDE

Il metodo di analisi dei VFA è stato sviluppato nel nostro laboratorio nell'ambito del progetto "Energia, parte Biomasse". E' una variazione della procedura che si basa sull'estrazione con piccolissime quantità di solvente (SDE "single drop extraction", figura 11).

Le analisi sono state svolte in vials da 1,5mL aggiungendo un'aliquota, nell'intervallo tra 100 mg a 200 mg, di campione proveniente dalle siringhe, 100uL di S.I. interno (acido 2-etilbutenoico), portando tutto a volume con 1 mL di una soluzione acida satura (bisolfato di potassio).

Con una micro siringa si prelevano 0.8uL di dimetilcarbonato, l'ago contenente il dimetilcarbonato viene immerso per 15min nel surnatante del campione centrifugato, quindi si inietta la soluzione nel GC-FID per l'analisi. Il tempo di 15 min è stato determinato da esperimenti di cinetica di estrazione.

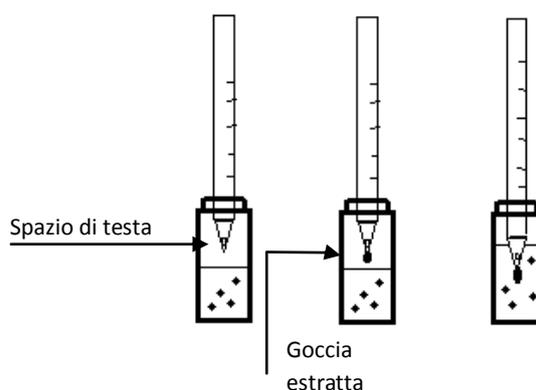


Figura 11 descrizione tecnica SDE

Analisi in GC/FID

Le condizioni strumentali sono le seguenti:

- Programmata termica: 80°C per 5 min, poi una rampa di 10°C min⁻¹ fino a raggiungere 250°C per 5 min.
- Durata analisi: 18 min.

- Volume di iniezione: 0,8 μ L.

La concentrazione C_x (g/L) dei singoli VFA è stata calcolata dalla quantità di campione prelevata W , dalla quantità dello SI interno introdotto Q_{is} , dall'area del picco di ciascun VFA, A_x , dall'area del picco dello standard, A_{is} con la seguente formula: $C_x = (A_x/A_{is}) \cdot (Q_{is}/W)$.

Analisi del Biogas

Le analisi sono state svolte settimanalmente nelle siringhe che avevano prodotto del gas. Per le analisi il gas è stato prelevato con una siringa da 10ml e analizzato in GC-TCD.

- temperatura iniziale di 50 °C per una durata di 9 minuti fino al raggiungimento di una temperatura di 80 °C con un gradiente di 8 °C/min. A minuto 2.5 si chiude il setaccio molecolare, per riaprirsi al min 9.

Produzione PHA

SBR_sequencing batch reactor

E' stato utilizzato un solo reattore batch in sequenza (SBR) da 2.5L. Il reattore è stato inoculato tramite fanghi attivi (MMC) provenienti da un impianto di trattamento delle acque reflue di Ravenna e alimentato da un substrato ad acetato di sodio, come fonte di carbonio, da marzo del 2013. Per la coltivazione della biomassa è stato utilizzato lo stesso processo di Aerobic Dinamyc Feeding, ADF eseguito da Lemos et al., (2006), descritto in *Metodi d'Analisi*.

Composizione del medium colturale

I sali minerali che sono stati usati nell'SBR per la composizione del medium sono (per litro):

600mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 160mg NH_4Cl , 100mg EDTA, 92mg K_2HPO_4 , 45mg KH_2PO_4 , 70mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 2ml di elementi in traccia.

Aggiunti poi 2.5 L di acqua, 50g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ (come risorsa di carbonio), 10ml di CH_3COOH e 25mg di Tiourea (10mg/L), usata per inibire la nitrificazione.

Preparazione biomassa

Settimanalmente alla fine di ogni fase *feast* e alla fine di ogni fase *famine* la biomassa (500ml) è stata prelevata. Ciò ha consentito di avere una serie di campioni caratterizzati da diverse quantità di PHA. La biomassa è stata poi fatta centrifugare per 10min a 300rpm e una volta messo il surnatante all'interno del reattore, si è proceduto con un congelamento (di una notte) e infine con la liofilizzazione sottovuoto del campione.

Metodi d'analisi

Metanolisi

Il metodo usato è l'alcolisi descritta da Braunegg et al. (1978) e ripreso poi da Lemos et al. (2006) con piccole modifiche.

La biomassa liofilizzata (5-10mg), è stata trattata per 3.5h a 100 °C con una soluzione al 20% di H₂SO₄ (1mL MeOH con 0.2mL di H₂SO₄) e diclorometano CH₂Cl₂ (1 mL); quindi si aggiungono 0.5mL di acqua lo standard interno (nonano, 0.05mL 1 wt% della soluzione) alla soluzione. La miscela è stata poi centrifugata a 4000 rpm per 10 min, le fasi sono separate e alla fase organica viene aggiunto carbonato di calcio (al fine di eliminare ogni traccia di acido solforico, H₂SO₄), poi analizzato in GC-MS.

Per le analisi in GC-MS sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- programmata termica: inizialmente 40°C per 6 min, fino a raggiungere 120°C con una rampa di 10°C min⁻¹, seguita da un post-run a 325°C per 1 min;

Le soluzioni di calibrazione per analisi GC-MS di 3- metil idrossibutanoato, 3-metil-idrossipentanoato e 3- metil idrossiesanoato sono stati preparati applicando la procedura precedentemente descritta per il PHA standard e usati per determinare il fattore di risposta in GC-MS, relativo alla nonane.

Pirolisi off-line

Dopo aver svolto esperimenti preliminari, condotti su campioni di PHB standard, a diverse temperature le condizioni scelte per le pirolisi sono state le seguenti: 500°C per 100sec con una rampa di temperatura di 0.1 °C/sec.

Il campione (circa 10mg) pesato è stato inserito all'interno di un tubicino di quarzo porta-campioni di piccole dimensioni (circa 2 cm di lunghezza e 1mm di diametro), le cui estremità sono state ostruite con della lana di quarzo. Le pirolisi sono state condotte all'interno di una camera di pirolisi come descritto nel lavoro di Fabbri et al. (2007), e schematizzato in fig. 12.

Una volta terminate le pirolisi off-line, è stata estratta la sonda ed il sistema di pirolisi-cartuccia adsorbente è stato posizionato sopra un vial da 4ml. Al sistema sono stati aggiunti 100uL di standard interno (Acido 2-etilbutenoico alla concentrazione di 5000mg/L) e poi sia la sonda che il sistema sono stati eluiti con 4ml di acetonitrile ACN, per far sì che anche gli analiti condensati nelle pareti della camera si potessero sciogliere e i prodotti di pirolisi presenti nella cartuccia adsorbente eluiti.

È stata così ottenuta una soluzione pronta per essere analizzata in gascromatografia.

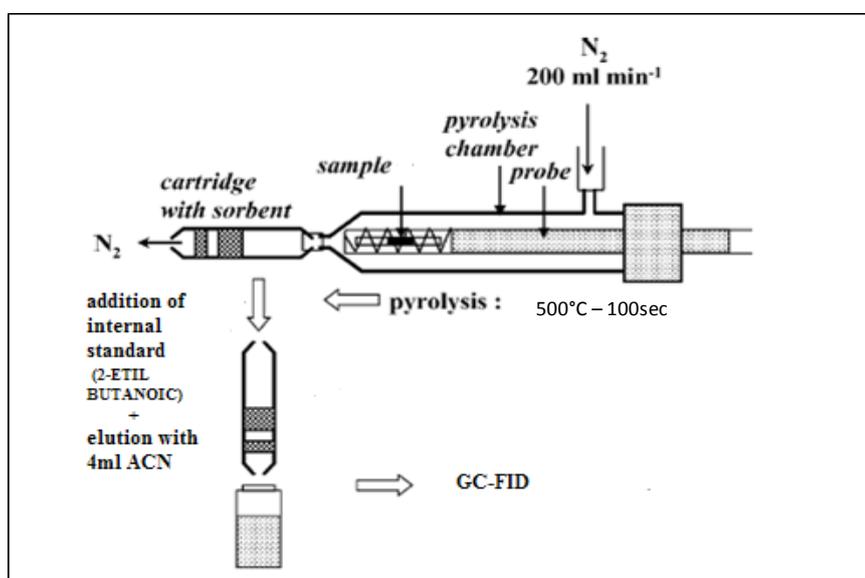


Figura 12 Schema strumentazione PY-GC

Analisi in GC/MS

Con l'esecuzione delle analisi in gascromatografia associata alla spettrometria di massa è stata effettuata l'identificazione dei prodotti di pirolisi:

- ❖ Per i campioni tal quali è stata prelevata un'aliquota di 1ml dalla soluzione ottenuta dalla pirolisi e iniettata tal quale nello strumento.
 - Programmata termica: inizialmente 40°C per 6 min, fino a raggiungere 120°C con una rampa di $10^\circ\text{C min}^{-1}$, seguito da un post-run di 325°C per 1 min.

Analisi in GC/FID

L'esecuzione delle analisi nel GC/FID è stata condotta per la quantificazione dei composti. Le analisi sono state condotte prelevando, dalla soluzione ottenuta dalla pirolisi, un'aliquota di circa 1 μ L tramite una microsiringa Hamilton da 10 μ L e direttamente analizzata dallo strumento. Con questa metodologia sono state svolte le analisi sia dello standard che di tutti i campioni.

- Programmata termica: 100°C per 5 min, poi una rampa di 10°C min⁻¹ fino a raggiungere 250°C per 5 min.
- Durata analisi: 32 min.
- Volume d'iniezione: 0,8 μ L.

Metodo di quantificazione dei composti

Calcolo della resa dei prodotti di pirolisi

Per la quantificazione dei principali prodotti di pirolisi caratteristici di PHB e PHB/HV, vengono integrate le aree del picco del prodotto di pirolisi di interesse (analita o *marker*) e l'area del picco dello standard interno (*acido 2-etilbutenoico*). Usando per ciascuno la seguente formula:

$$Q_x = (A_x * Q_{is} * F) / A_{is}$$

(dove: "A_{is}" è l'area del picco dello standard interno; "A_x" è l'area del picco dell'analita; "Q_{is}" è la quantità di standard interno aggiunto (mg) e "Q_x" è la quantità dell'analita e "F" è il fattore di risposta, considerato unitario).

Ottenute in questo modo le quantità dei prodotti di pirolisi caratteristici e dato il peso del campione pirolizzato Q_{campione} (mg), la resa di massa ($\text{mg}_{\text{marker}}/\text{mg}_{\text{csmplione}}$) di ogni prodotto di pirolisi "Y_x" è stata calcolata con tale formula:

$$Y_x = Q_x / Q_{\text{campione}}$$

Calcolo della quantità di PHA nei campioni di MMC da PY/GC-FID

Per i campioni puri le rese quantitative dei markers del PHB e del PHB/HV (75/25) rispettivamente, l'acido 2-butenoico (Y_{2BA}^{*}) e l'acido 2-pentenoico (Y_{2PA}^{*}), sono state ottenute usando le seguenti formule:

$$Y_{2BA}^* = Q_{2BA} / Q_{PHB}$$
$$Y_{2PA}^* = Q_{2PA} / (Q_{PHB/HV} \cdot 0.25)$$

I valori delle rese Y* ottenute dalla pirolisi dei polimeri puri ci permettono di calcolare la quantità di polimero nel campione reale che ha generato per pirolisi una data quantità misurabile di marker. Ad esempio:

$$Q_{PHB} = Q_{2BA} / Y_{2BA}^*$$

La concentrazione C_{PHB} di PHB nel campione reale analizzato, di massa Ws sarà:

$$C_{\text{PHB}} = Q_{\text{PHB}} / W_s$$

Quindi:

$$C_{\text{PHB}} = Q_{2\text{BA}} / Y_{2\text{BA}} * W_s$$

Analogamente per PHV:

$$C_{\text{PHV}} = Q_{2\text{PA}} / Y_{2\text{PA}} * W_s$$

Se il campione contiene solo polimeri dell'idrossibutirrato ed idrossivalerato la concentrazione totale di PHA sarà data dalla somma:

$$C_{\text{PHA}} = C_{\text{PHB}} + C_{\text{PHV}}$$

Per ogni campione reale sono state effettuate due repliche, con circa la stessa quantità di campione. I risultati sono comunque espressi come media aritmetica e deviazione standard relativa (% **RSD**).

CAPITOLO III

RISULTATI E DISCUSSIONI

Test di biometanazione

La digestione del bio-olio e la conseguente produzione di biogas di tutti gli inoculi è stata monitorata durante tutto l'arco temporale dell'esperimento di durata circa 5 mesi.

È mostrato nelle figure 13-14-15 l'andamento di produzione dei VFA totali, nelle due repliche (somma di acido acetico Ac, propionico Pr, iso-butirrico iBu, butirrico Bu, iso-valerico iVa e valerico Va), solo per i campioni contenenti la concentrazione massima di bio-olio (50 g/L), TQ50 (solo bio-olio), B50 (bio-olio e biochar) e N50 (bio-olio e nutrienti). Questo per una migliore visualizzazione, ma per tutti gli inoculi sottoposti a digestione è risultato il medesimo andamento solamente a differenti concentrazioni.

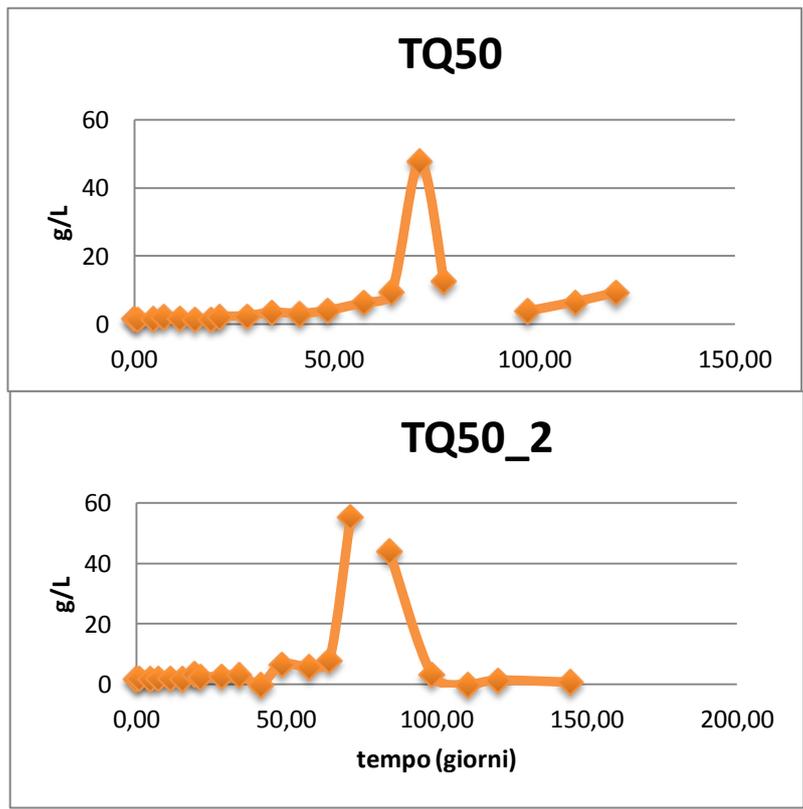


Figura 14 andamento della somma dei VFA nelle due repliche T50 e T50_2

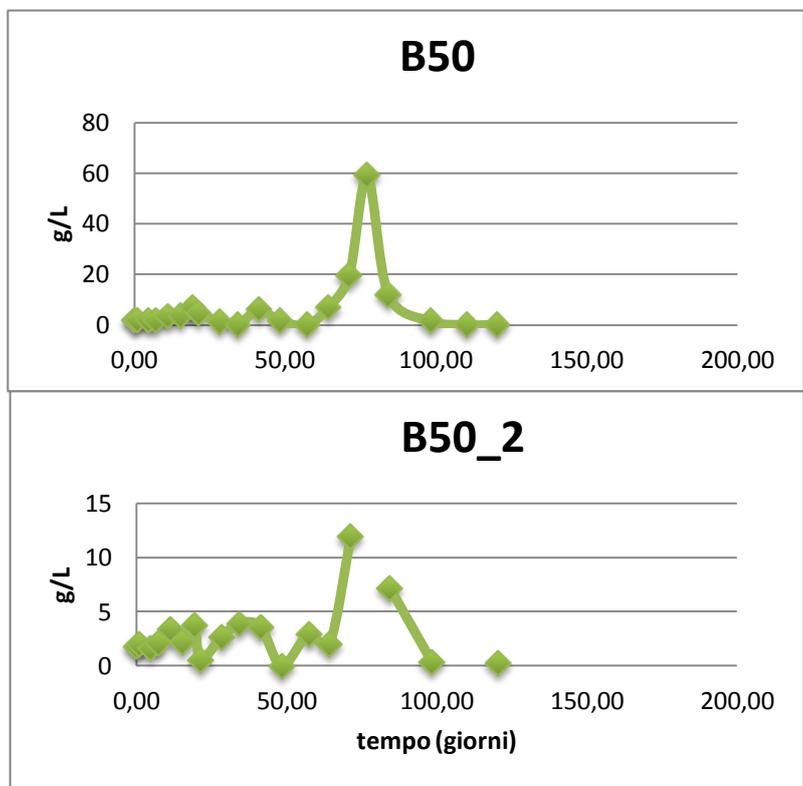


Figura 13 andamento della somma dei VFA nelle due repliche B50 e B50_2

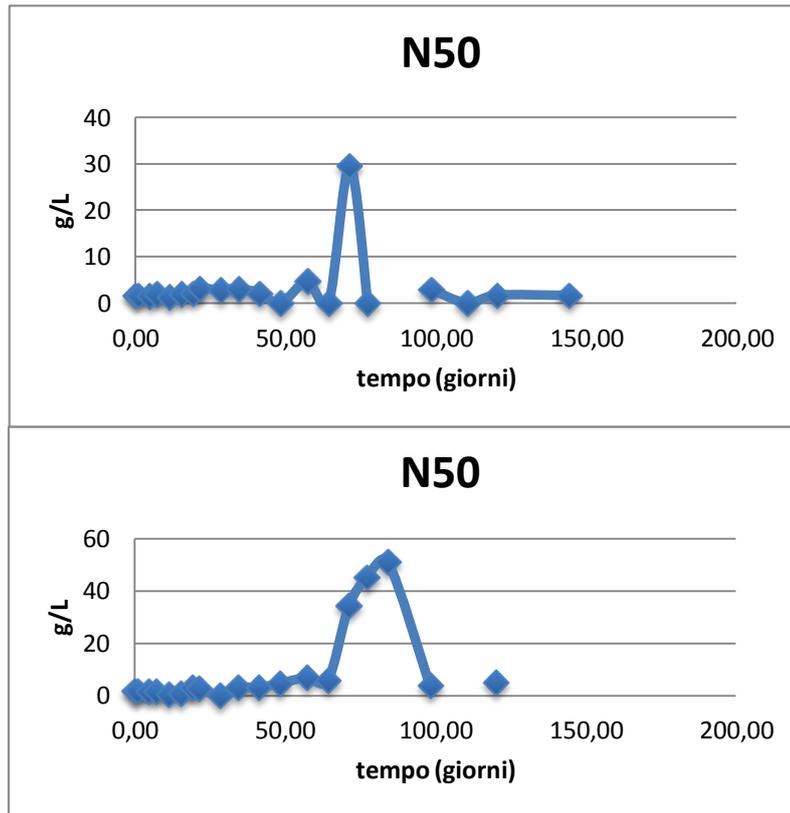


Figura 15 andamento della somma dei VFA nelle due repliche N50 e N50_2

L'andamento della produzione dei VFA mostrato nei campioni e nelle repliche, risulta essere più o meno uguale (anche per i campioni non mostrati), tranne che il B50_2, il quale non raggiunge la concentrazione della sua replica.

In ogni inoculo, dopo una prima fase di adattamento, è iniziata l'idrolisi delle molecole organiche (risultati non mostrati), dopodiché intorno al 50° giorno si è osservata la produzione di VFA che raggiunge il massimo intorno al 70° giorno, indicativa dell'acetogenesi.

L'abbondanza relative degli acidi grassi è la seguente, l'acido acetico è il VFA principale, seguito dall'acido propionico, ed una frazione minore di acido butirrico. Come esempio le figg.16-17-18 mostrano la concentrazioni dei singoli VFA in corrispondenza della massima concentrazione.

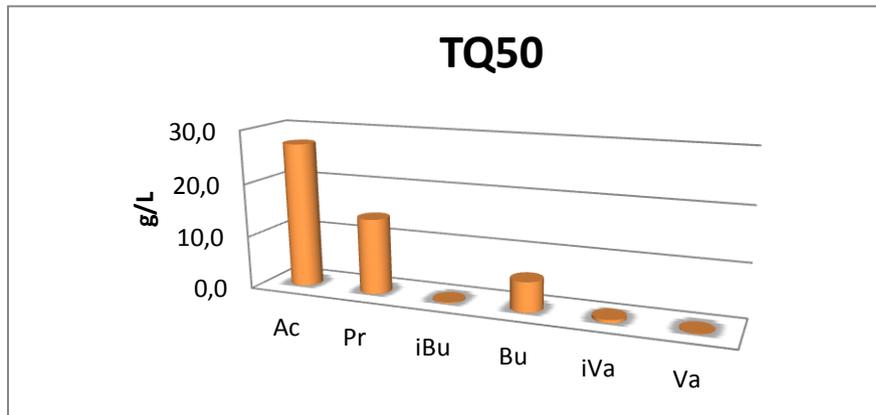


Figura 18 Concentrazioni di VFA nella fase di acetogenesi nel campione TQ50 (acido acetico Ac, propionico Pr, iso-butirrico iBu, butirrico Bu, iso-valerico iVa e valerico Va).

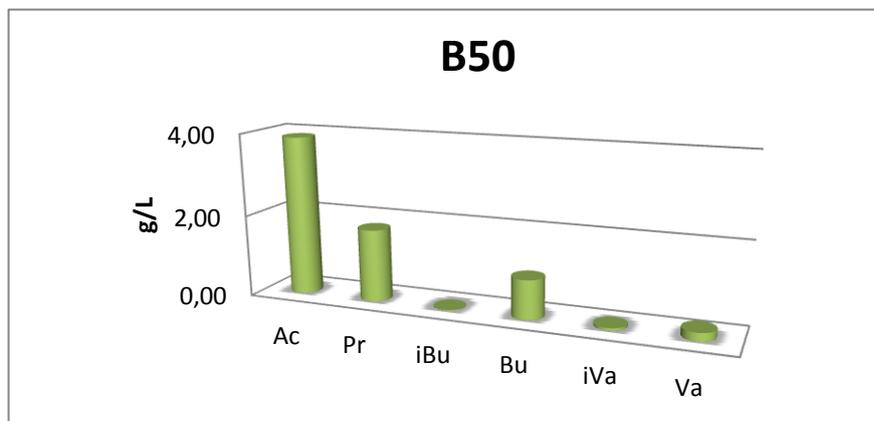


Figura 17 Quantità VFA nella fase di acetogenesi nel campione B50 (acido acetico Ac, propionico Pr, iso-butirrico iBu, butirrico Bu, iso-valerico iVa e valerico Va).

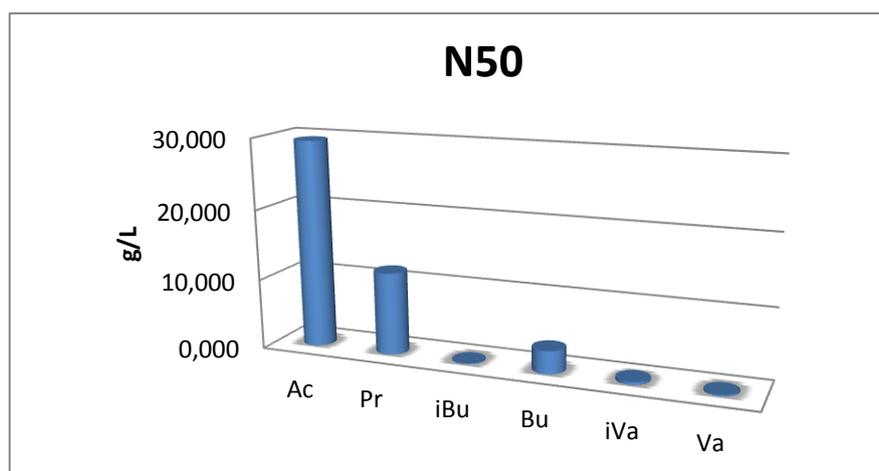


Figura 16 Quantità VFA nella fase di acetogenesi nel campione N50 (acido acetico Ac, propionico Pr, iso-butirrico iBu, butirrico Bu, iso-valerico iVa e valerico Va).

Successivamente le molecole derivanti dagli steps precedenti arrivate all'ultima fase della fermentazione vengono digerite dai batteri metanogeni, appartenenti al regno degli *Archaea*. Le figg.19-20-21 mostrano che la produzione di metano inizia dopo l'acetogenesi e comporta una diminuzione della concentrazione di VFA.

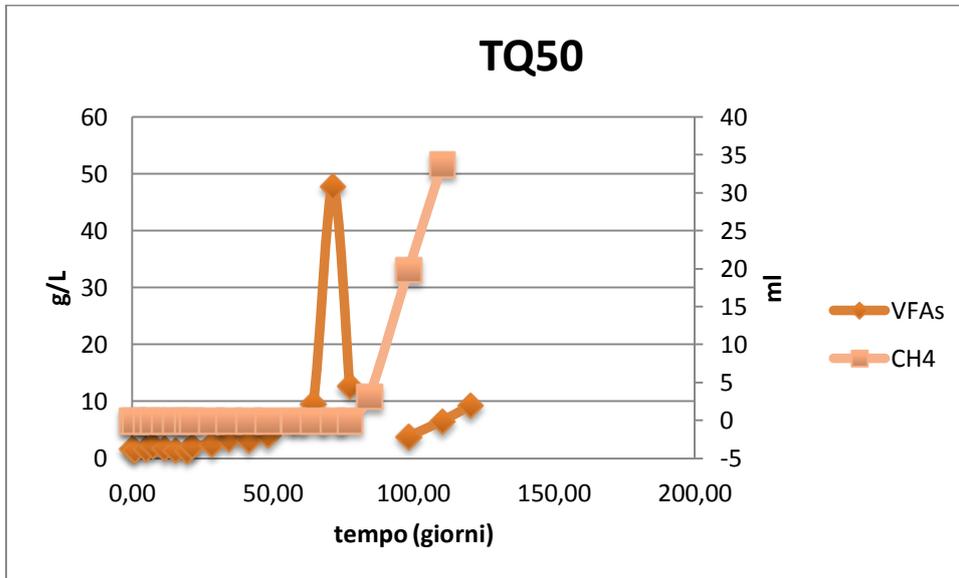


Figura 19 andamento metano cumulato (ml) e VFA (g/L) nel campione TQ50

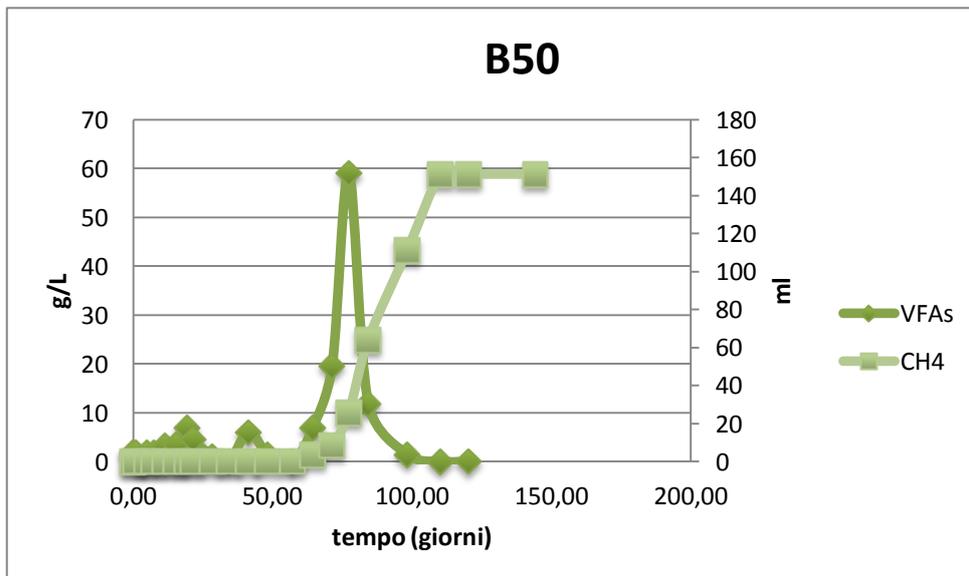


Figura 20 andamento metano cumulato (ml) e VFA (g/L) nel campione B50

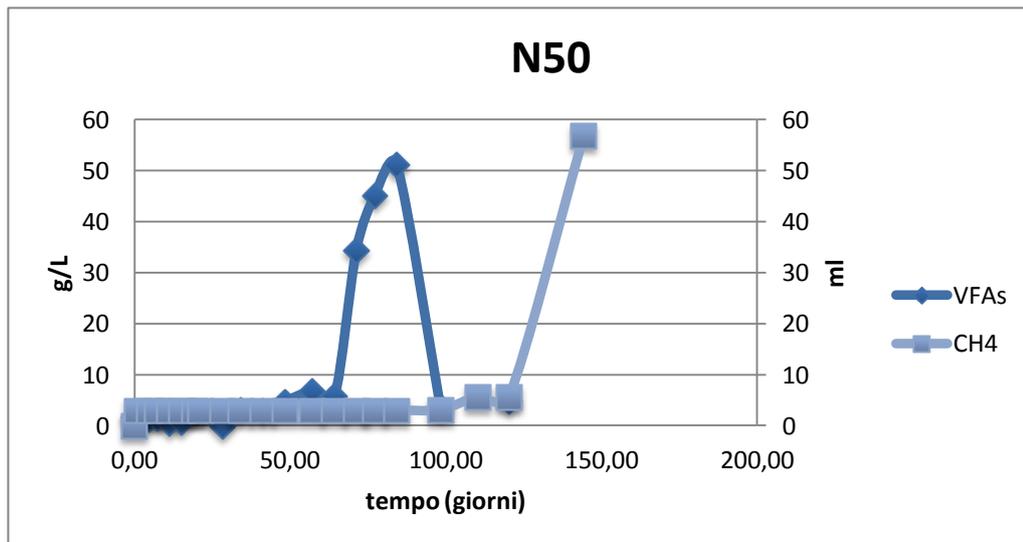


Figura 21 andamento metano cumulato (ml) e VFA (g/L) nel campione N50

Nelle figure 22-23-24 sono mostrati gli andamenti del biogas cumulato (ml) dei campioni TQ50-B50 e N50 durante tutto l'esperimento. Come si vede, nella fase acetogenica gli acidi grassi prodotti vengono digeriti producendo CO_2 e H_2 e successivamente inizia la fase metanogenica. Si nota che miscele di bio-olio con biochar mostrano ottimi rendimenti di conversione, arrivando a 150ml cumulativi di metano prodotto.

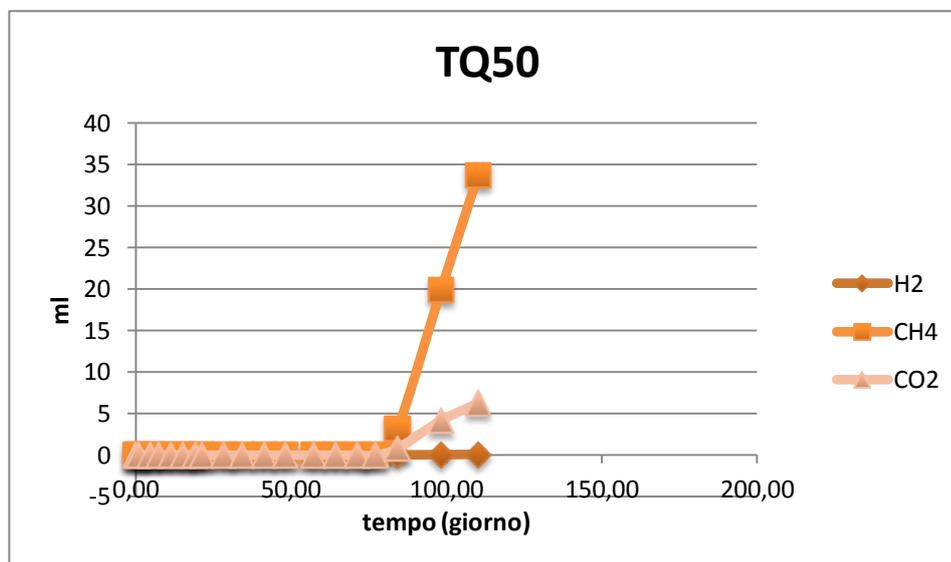


Figura 22 andamento biogas nel campione TQ50

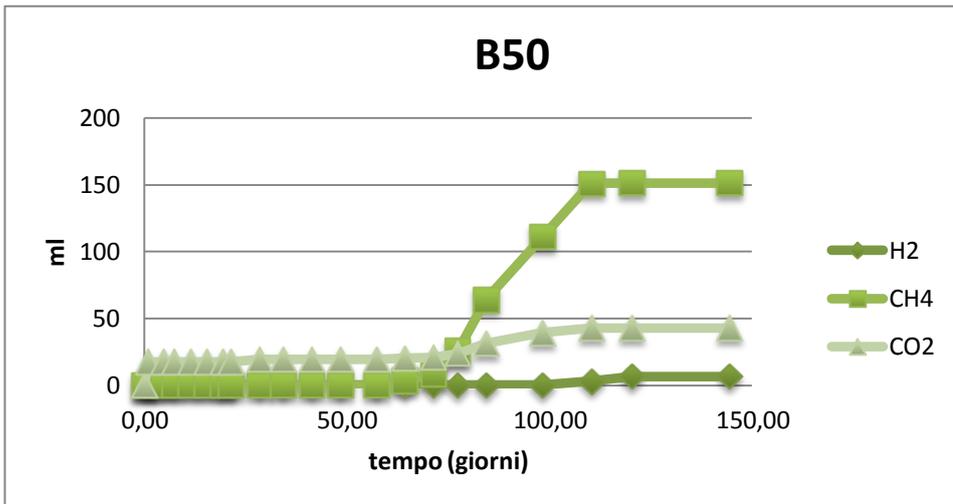


Figura 23 andamento biogas nel campione B50

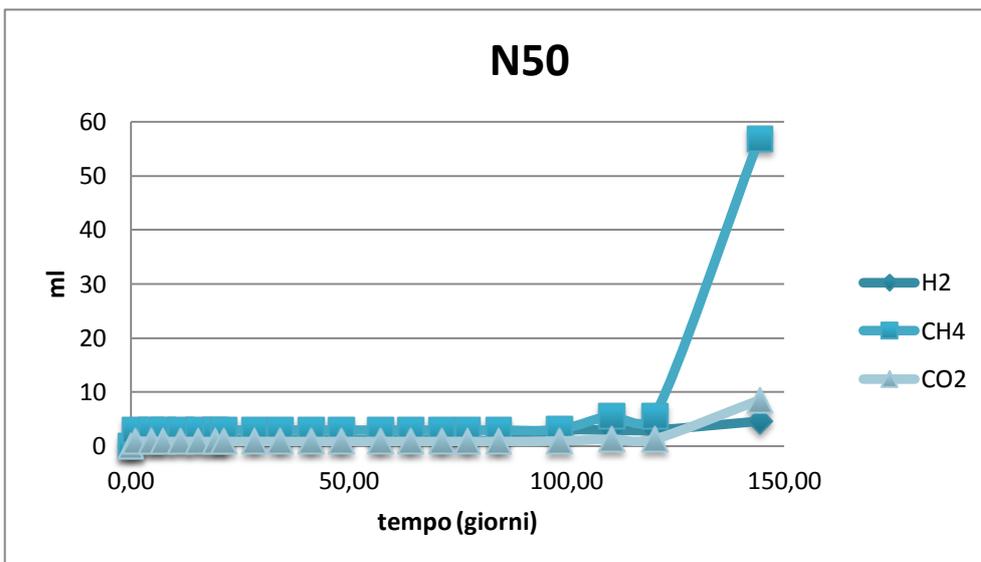


Figura 24 andamento biogas nel campione N50

Negli inoculi la produzione di biogas, come si vede dalle figure, presenta fasi con cinetiche differenti nel corso del processo di digestione, ciò può essere correlato alle diverse caratteristiche dei componenti del substrato che vengono idrolizzati dalla biomassa.

Durante tutto l'esperimento inoltre sono stati monitorati anche gli inoculi di controllo, immessi nelle siringhe tal quali li avevamo ricevuti. Come ci si aspettava il processo di digestione in essi non è avvenuta, non producendo quindi neanche del biogas.

Esperimenti in batch

Le colture microbiche all'interno del reattore batch, sono state alimentate, come già detto, secondo il processo di *aerobic dynamic feeding*, ADF.

Questo comprende una fase di abbondanza del substrato (*fase feast*), che ha lo scopo di arricchire e selezionare popolazioni microbiche miste in grado di trasformare gli acidi grassi volatili in PHA e di utilizzarli come fonte interna di carbonio durante i cicli con carenza di substrato (*famine*), acquisendo un vantaggio metabolico nei confronti delle popolazioni non in grado di accumulare i PHA come riserva di carbonio; Questa necessità fisiologica di adattamento a causa della mancanza di una sufficiente quantità di enzimi o RNA necessari per la crescita è considerato il più probabile meccanismo di stoccaggio di PHA da colture miste sottoposte a condizioni di stress (Anderson e Dawes, 1990).

In figura 25 è mostrato ad esempio l'andamento, durante una fase *feast* (del processo ADF), della crescita della biomassa totale (g), insieme al conseguente accumulo di PHA e l'abbassamento invece dell'acido acetico, in concordanza con i risultati mostrati in letteratura da Moita et al., (2012).

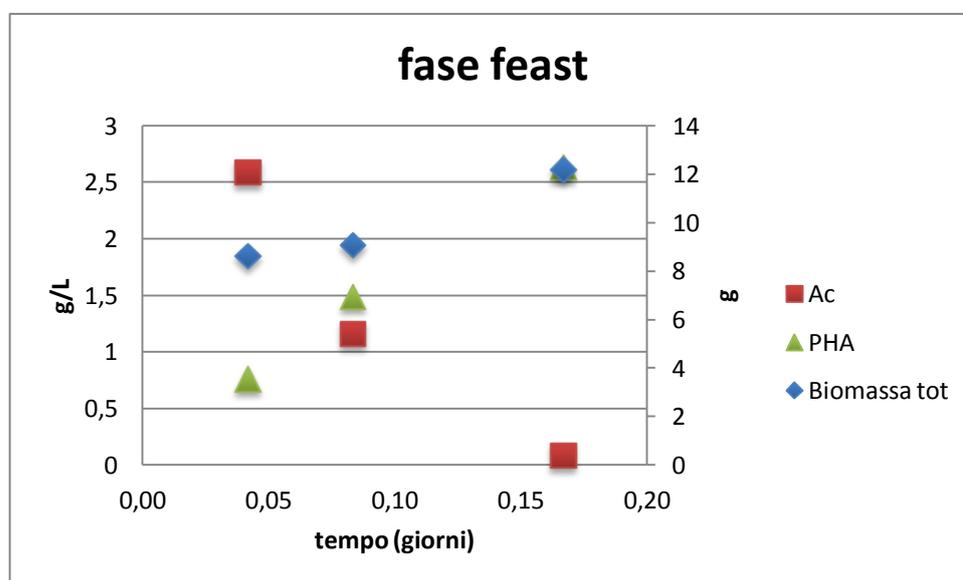


Figura 25 Andamento PHA, acido acetico (Ac) e biomassa totale nella fase *feast*

Determinazione dei PHA tramite pirolisi analitica

Analisi Qualitativa

L'identificazione dei prodotti di pirolisi dei polimeri è stata eseguita tramite GC-MS. L'analisi degli spettri di massa ha permesso di eseguire le attribuzioni strutturali dei principali picchi cromatografici.

I prodotti di pirolisi identificati sono mostrati nella tabella 2 insieme agli ioni dei loro spettri di massa, ricavati dall'identificazione primariamente fatta tramite GC-MS. È stato così possibile assegnare i picchi cromatografici in GC-FID.

Sono mostrati nelle figg. 26-27 i tracciati GC-FID dei pirolizzati di PHB standard tal quale e del PHB/HV estratto dai campioni di MMC (fornitici confidenzialmente), tramite la procedura di Serafim, et al. (2008).

PHB STANDARD

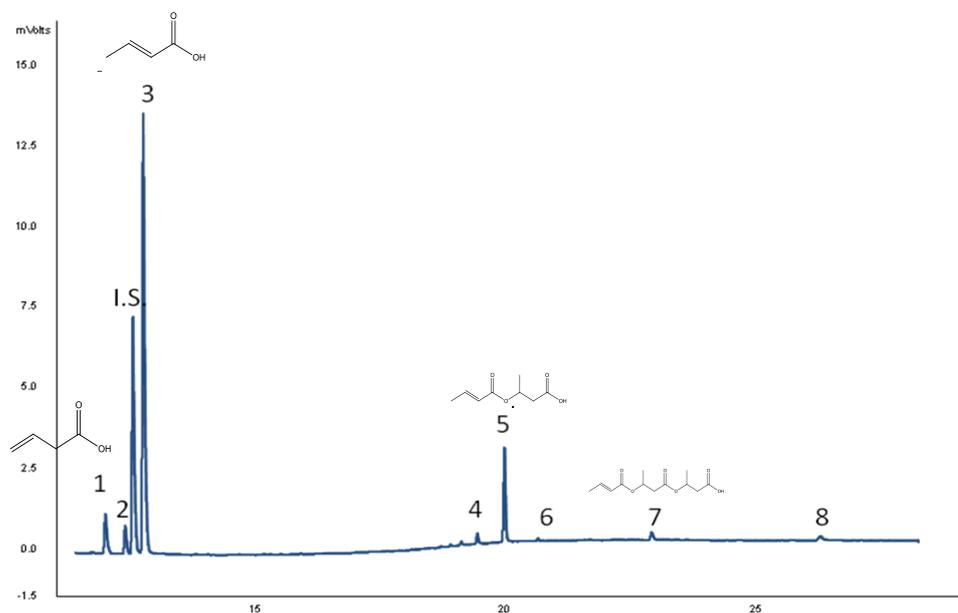


Figura 27 Cromatogramma GC-FID ottenuto dalla pirolisi del PHB standard (composti descritti in tabella 2)

HB-HV ESTRATTO

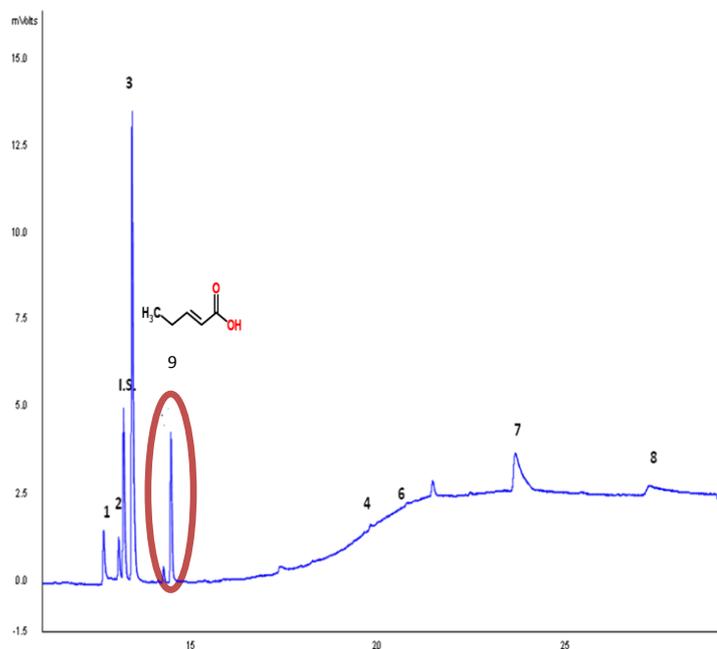


Figura 26 Cromatogramma GC-FID ottenuto dalla pirolisi di PHB/HV, cerchiato in rosso il marker del PHV. composti descritti in tabella 2)

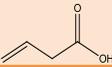
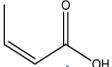
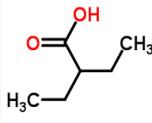
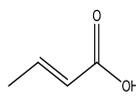
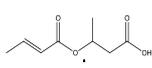
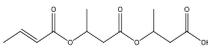
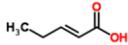
n.picco	Composti	Formula di struttura	m/z
1	Acido (Z)-but-2-enoico (a. crotonico <i>cis</i>)		86, 39, 41, 68, 69, 40, 45, 38, 42, 27
2	Acido but-3-enoico		41, 39, 86, 42, 58, 45
I.S.	Acido 2-etilbutenoico		88,73,43
3	Acido (E)-but-2-enoico (a.crotonico <i>trans</i>)		86, 41,39, 69,68, 45, 40, 71, 38, 42, 98
4-5-6	Dimero		Struttura non definita
7	Trimero		Struttura non definita
8	Tetramero		Struttura non definita
9	Acido pent-2-enoico		55, 29, 27,39, 100

Tabella 2 Picchi cromatografici numerati con relativi composti, formule e ioni caratteristici m/z

Nei cromatogrammi (figg.26-27) sono presenti i prodotti volatili della degradazione dei due polimeri puri rispettivamente, HB standard e PHB/HV estratto.

Il prodotto principale è l'acido 2-E-butenoico (4), comunemente conosciuto come acido crotonico, il quale ha più del 70% delle aree totali di tutti i prodotti identificati.

A tempi di ritenzione maggiori, i pirogrammi sono caratterizzati da alcuni picchi minori identificati come isomeri dell'acido 2-butenoico: il

dimero (4-5-6), il trimero (7) e il tetramero (8) dell'idrossibutirrato disidratati.

I prodotti di pirolisi insaturi possono esistere in due forme, *cis* o *trans* e la formazione della specie *trans* è favorita. Per il trimero ed il tetramero, le forme *cis* e *trans* non sono entrambe ben visibili cromatograficamente, ciò potrebbe essere dovuto alle differenze strutturali, essendo molto piccole comparate alle altre molecole (Lehrle R. S. et al., 1994).

Il cromatogramma del polimero di idrossibutirrato standard (fig.27), è comparabile con quelli già presenti in letteratura (Morikawa, 1981; Lehrle e Williams, 1994; Li et al., 2003).

In fig.28 è mostrato lo spettro di massa dell'acido 2-E-butenoico caratteristico del PHB.

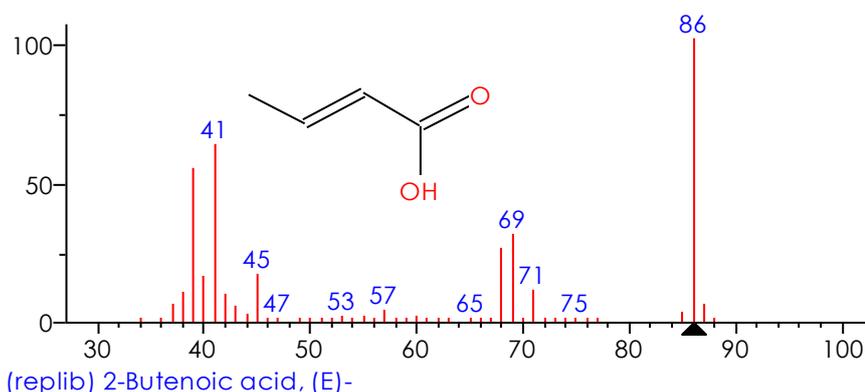


Figura 28 Spettro di massa del marker del PHB

Per quanto riguarda il cromatogramma del PHB/HV estratto, in fig. 27, oltre a quanto già detto, è messo in evidenza un picco cromatografico (9 - cerchiato in rosso) assente nel tracciato del PHB standard. Questo è stato identificato come l'acido 2-E-pentenoico dallo spettro di massa fig. 29 e da confronto con la letteratura (morikawa, 1981). L'acido 2-pentenoico come marker distintivo dell'idrossivalerato.

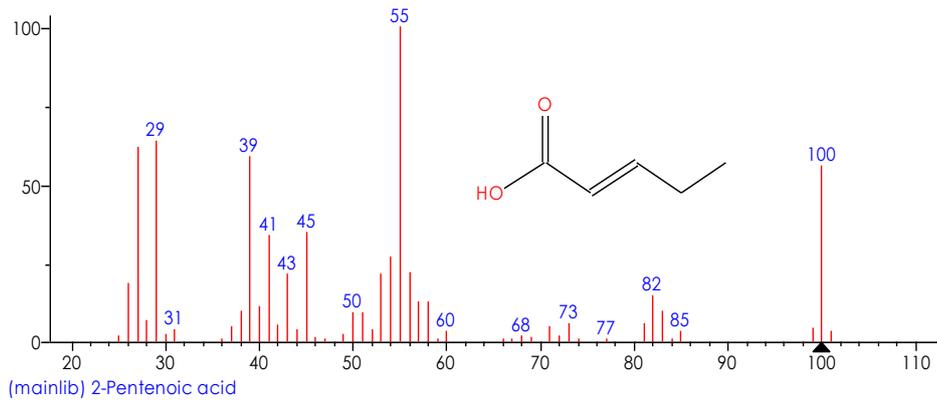


Figura 29 Spettro di massa del marker del PHV

Campioni Reali

Le pirolisi off-line dei campioni reali di biomassa hanno prodotto dei pirolizzati, che in GC/MS hanno fornito dei tracciati molto simili a quelli del PHB standard.

Come si può notare osservando la fig. 30 che sovrappone il cromatogramma di un campione reale (qui ad esempio è stato preso il campione ac28 in verde), con il cromatogramma del pirolizzato di PHB standard (in nero).

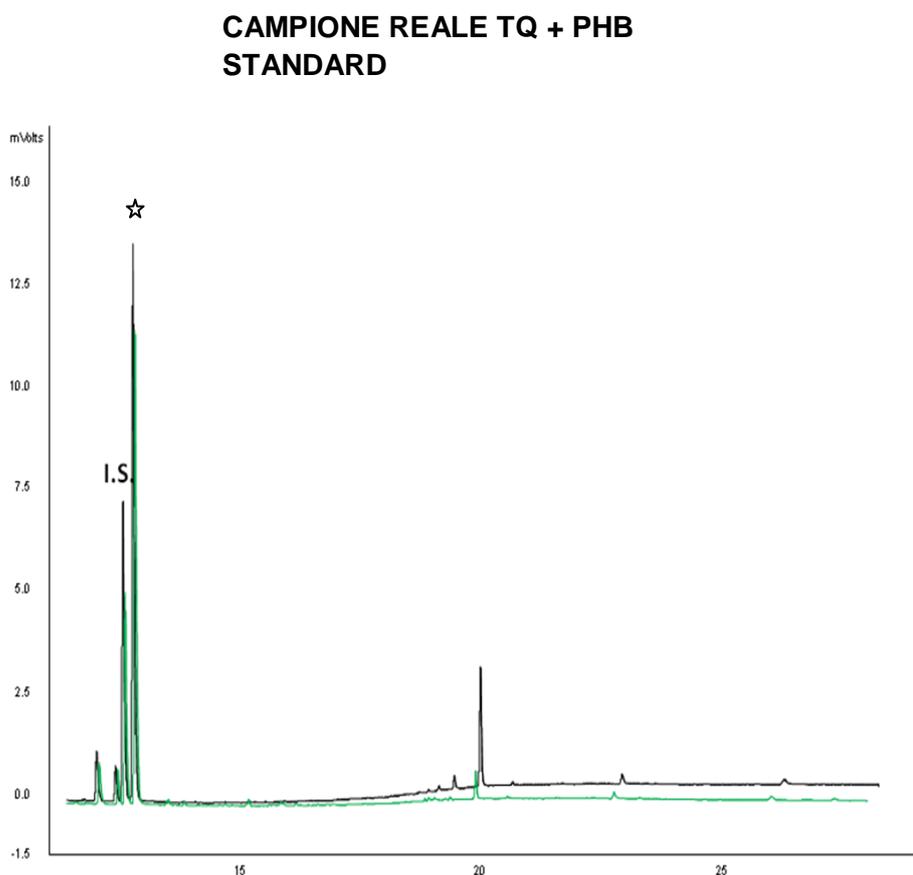


Figura 30 Cromatogrammi sovrapposti dalla pirolisi del polimero standard e di un campione di biomassa (in nero il PHB standard- in verde il campione reale). La stella indica l'acido crotonico (acido E-but-2-enoico).

All'inizio del cromatogramma sono stati identificati i picchi degli acidi 2-butenico (Z), il 3-butenico e lo standard interno. Poi il picco principale (contrassegnato da una stellina), caratteristico del PHB, è l'acido 2-butenico nella sua configurazione *trans*. Questo accerta la produzione del polimero da parte delle nostre colture batteriche. A tempi di ritenzione maggiori si notano gli altri tre minori ma ugualmente rilevanti picchi prodotti dalla pirolisi isomeri dell'acido butenoico il dimero e il trimero disidratati, in accordo con i tracciati GC di pirolisi di colture batteriche sintetizzanti PHB (Morikawa e Marchessault, 1980).

Di seguito sono mostrate le figg. 31-32, che riportano i cromatogrammi dei vari campioni esterni al nostro laboratorio.

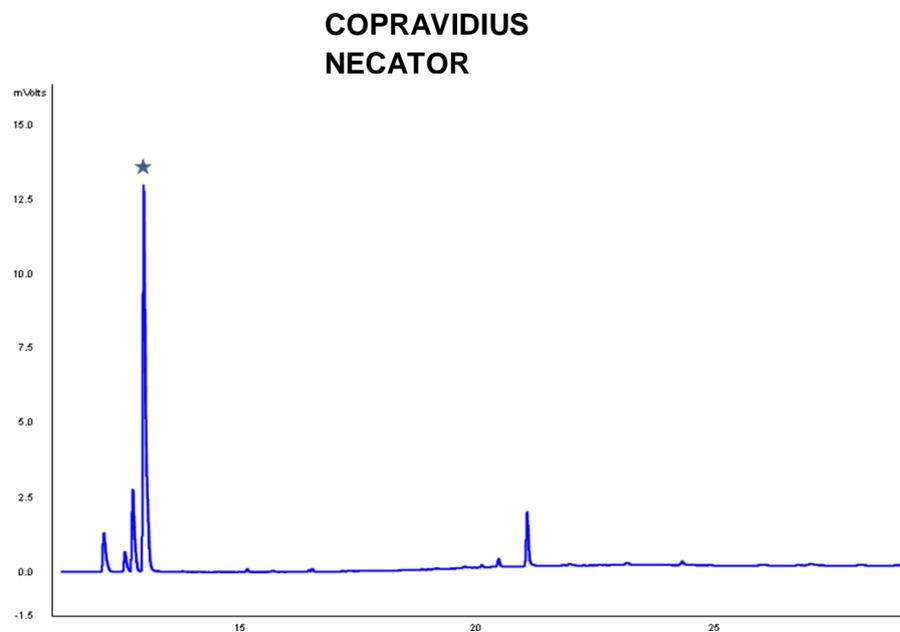


Figura 31 Cromatogramma FID ottenuto dalla pirolisi della coltura singola, in asterisco il marker del PHB acido crotonico.

CAMPIONE da MMC

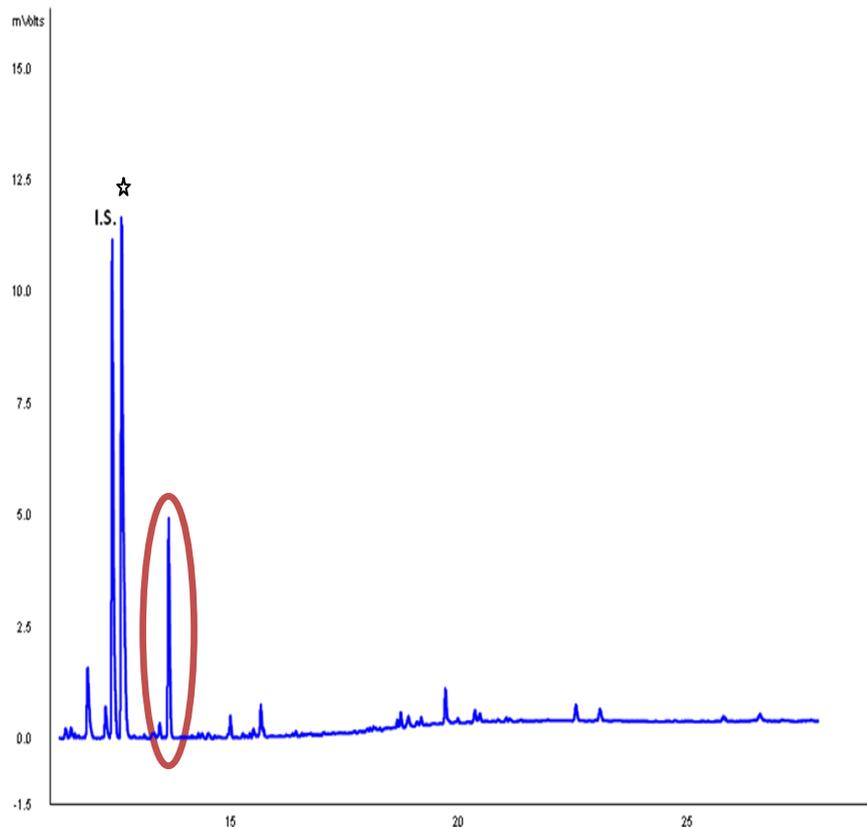


Figura 32 Cromatogramma GC-FID ottenuto dalla pirolisi del campione reale da MMC (I.S. è lo standard interno- l'asterisco rappresenta il marker del PHB (acido 2-E-butenoico)-cerchiato in rosso il picco del marker del PHV (acido 2-pentenoico))

Dai tracciati appena presentati, si possono notare tutti i picchi cromatografici evidenti anche nel pirolizzato di PHB standard, l'evidente marker acido 2-E-butenoico (contrassegnato da una stellina) e a seguire tutti gli altri prodotti della degradazione del polimero.

Inoltre è da notare, che nella fig.32 proveniente dalle colture miste, è presente il picco dell'acido 2-pentenoico (cerchiato in rosso). Dimostrando la presenza polimero dell'idrossivalerato HV oltre che quella dell'HB.

Tutto ciò afferma la presenza dell'idrossibutirrato all'interno delle colture provenienti da diversi laboratori, confermando le precedenti analisi di estrazione con solvente che hanno svolto Moita e Lemos (2012) e altri operatori (qui non riportate).

Analisi Quantitativa

Standard

Per determinare la concentrazione di PHA nei campioni di biomassa delle colture batteriche è necessario conoscere la resa di un composto caratteristico del polimero (marker), ovvero la quantità del marker emesso dalla pirolisi di una determinata quantità del polimero stesso. Le rese sono state determinate dalla pirolisi dei polimeri puri, PHB e PHB/HV (75/25), e dall'analisi dei marker tramite GC-FID.

Sia per il PHB standard, che per il PHB/HV estratto, sono state eseguite delle repliche con diversa quantità di prodotto.

Di seguito sono riportate le tabelle 3-4 con le rese di tutti i principali prodotti di pirolisi dei polimeri.

RESE (mg/mg)					
Peso campione(mg)	A. 2-BUTENOICO Z	A. 3-BUTENOICO	A. 2-BUTENOICO E	A. -2-PENTENOICO	trimers
1,00	0,042	0,034	0,513	0,000	0,035
2,70	0,035	0,021	0,346	0,000	0,083
4,20	0,043	0,029	0,385	0,000	0,101
1,10	0,018	0,012	0,175	0,000	
3,12	0,056	0,039	0,447	0,000	0,048
4,90	0,049	0,013	0,427	0,000	0,069
3,31	0,050	0,021	0,432	0,000	0,016
1,11	0,065	0,037	0,552	0,000	

Tabella 3 Rese dei prodotti di pirolisi del PHB (mg/mg)

RESE (mg/mg)					
Peso campione(mg)	A. 2-BUTENOICO Z	A. 3-BUTENOICO	A. 2-BUTENOICO E	A. 2-PENTENOICO	trimers
1,15	0,069	0,029	0,514	0,163	
2,15	0,063	0,028	0,491	0,138	0,050
3,00	0,055	0,039	0,487	0,136	0,100

Tabella 4 Rese dei prodotti di pirolisi del PHB/HV (mg/mg)

Le rese delle pirolisi degli standard sono mostrate in figura 33. La resa pirolisi analitica per il polimero del PHB ha una resa percentuale del 41% \pm 11.

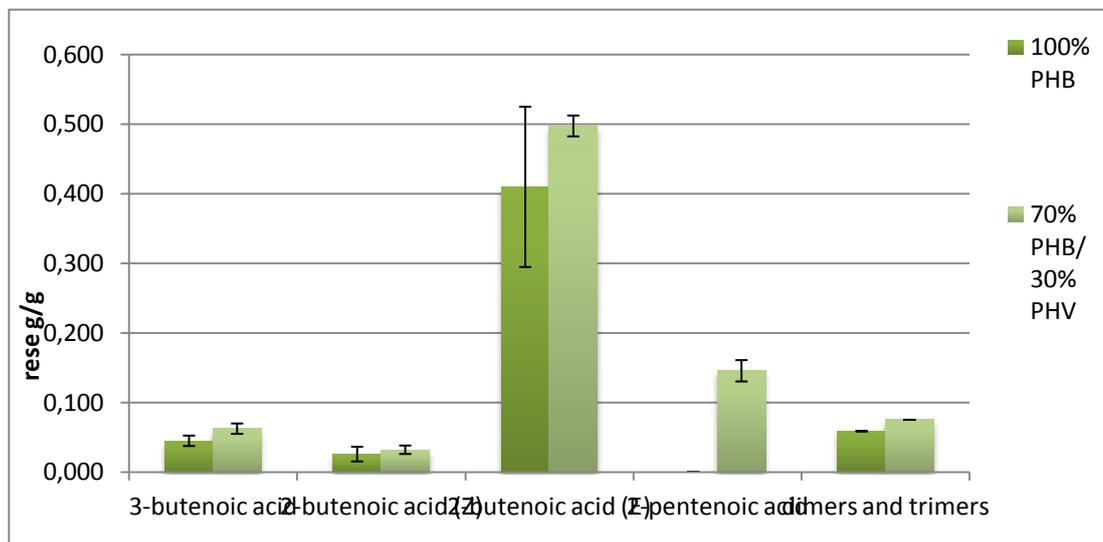


Figura 33 rese g/g delle pirolisi del PHB e del PHB/HV

Campioni reali

Le tabelle 5-6 mostrano nel dettaglio rispettivamente, le rese dei principali prodotti di pirolisi e i risultati ottenuti sulla % di polimero ottenuto di alcuni campioni (presi ad esempio) provenienti dalle nostre colture batteriche, dopo il metodo Py-GC/FID.

I risultati di tutti i campioni pirolizzati mostrano che le rese più alte sono date dall'acido *trans*-2-butenico, questo perché (come già detto) è il maggior prodotto della frammentazione pirolitica del PHB, per questo motivo è stato scelto come marker per la quantificazione.

La presenza del polimero, all'interno dei nostri campioni (dati non tutti riportati), varia in concentrazione tra il 28,8% e l'0,8%, con una deviazione standard relativa molto bassa, rispettivamente dall'2,6% allo 0,1%.

RESE(mg/mg)						
Nome repliche	Peso campione(mg)	A. 2-BUTENOICO Z	A. 3-BUTENOICO	A. 2-BUTENOICO E	A. 2-PENTENOICO	Dimers-trimers
AC28	9,33	0,012	0,008	0,126	0,000	0,010
AC28_2	11,02	0,011	0,006	0,111	0,000	0,007
AC44	9,01	0,001	0,000	0,016	0,000	0,024
AC44_2	10,61	0,004	0,002	0,031	0,000	0,013
AC61	9,89	0,001	0,002	0,021	0,000	0,007
AC61_2	11,20	0,004	0,002	0,025	0,000	0,007
AC69	10,49	0,001	0,001	0,007	0,000	0,002
AC69_2	10,5	0,001	0,001	0,007	0,000	0,003

Tabella 5 Rese campioni reali da MMC dei principali prodotti di pirolisi

Nome repliche	Peso campione (mg)	%PHB	media %	RSD%
AC28_2	9,33	30,6	29	3
AC28_3	11,02	27,0		
AC44	9,01	3,8	5,6	1,4
AC44_2	10,61	7,5		
AC61	9,89	5,0	5,5	0,7
AC61_2	11,2	6,0		
AC69	10,49	1,8	1,8	0,0
AC69_2	10,58	1,7		

Tabella 6 Pirolisi GC-FID di **CAMPIONI REALI DA MMC**: quantità di PHB (mg)

Validazione del metodo

Calibrazione

Per la calibrazione sono state messe in relazione sia la somma delle quantità dei prodotti dalla pirolisi con la quantità del polimero, che la quantità del singolo acido crotonico con la quantità del polimero pirolizzata (tab.7). Questo per verificare l'influenza del singolo acido rispetto a tutti prodotti.

Per la preparazione delle soluzioni di calibrazione è stato scelto come intervallo di quantità di analita standard 1-5 mg, in quanto la concentrazione di PHB presente nei campioni reali ricade in esso. Per le quantità al di sotto del milligrammo è stata prima creata una soluzione madre, con quantità nota di PHB standard (40.42mg) in un volume noto di diclorometano CH_2Cl_2 , (4ml). Per far disciogliere completamente il polimero, la miscela è stata sonicata per 15min e una volta ottenuta la soluzione omogenea sono stati iniettati, con una micro siringa Hamilton, rispettivamente 30uL, 20uL, 10uL nei tubicini porta campione (già precedentemente preparati con della lana di quarzo). Infine, come da procedura, sono stati pirolizzati e analizzati nel GC-FID.

L'analisi GC-FID delle soluzioni di calibrazione, poi, ha permesso di determinare e quantificare i principali prodotti di pirolisi (*acido 2-butenico (Z)*, *acido 3-butenico*, *acido 2-butenico (E)*, Dimero, Trimero, Tetramero) e determinando la linearità di risposta in funzione della quantità del PHB.

Peso campione (mg)	ΣQ_x (mg) prodotti pirolisi	Q (mg) acido 2-E-butenoico
1,00	0,62	0,51
2,70	1,31	0,93
4,20	2,34	1,62
1,10	0,76	0,19
3,12	1,84	1,39
4,90	2,73	2,09
3,31	1,72	1,43
1,11	0,73	0,61
0,30	0,20	0,10
0,20	0,12	0,09
0,10	0,04	0,03

Tabella 7 Quantità dei prodotti di pirolisi di campioni standard di PHB (peso campione-quantità principali composti-quantità acido 2-E-butanoico)

Dalla tabella è evidente come la quantità dell'acido butenoico è molto simile alla somma di tutti i prodotti. Infatti, i grafici (fig.34-35), dimostrano le linearità ottenute sia dalla somma che dalla singola quantità dei prodotti di pirolisi con quella del polimero analizzato.

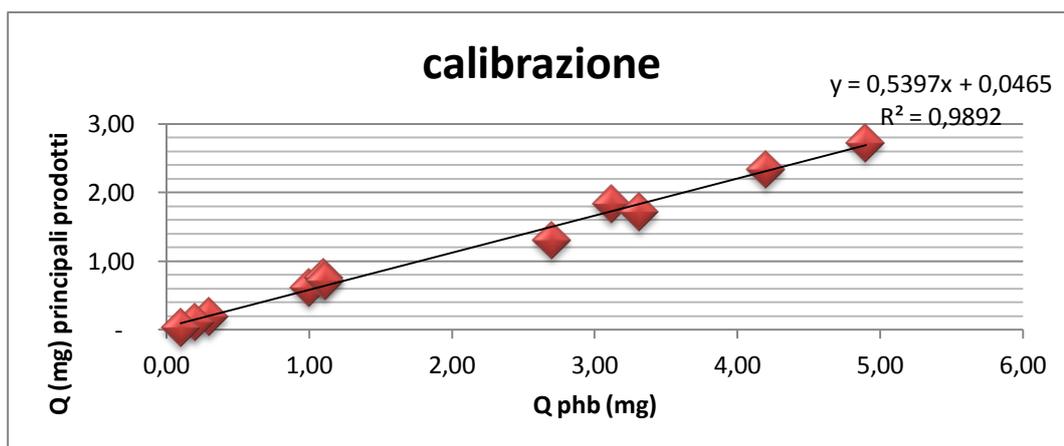


Figura 34 Retta calibrazione PHB con la somma di tutti i prodotti di pirolisi

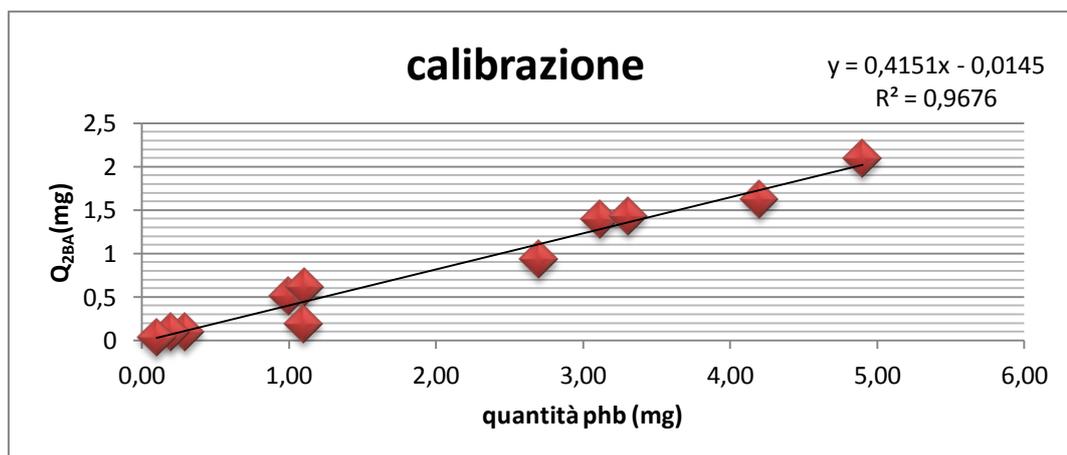


Figura 35 calibrazione PHB con la quantità del solo composto 2-butenoico

Il coefficiente lineare di correlazione (R^2) tra il peso dei campioni pirolizzati e l'acido 2-butenoico è di 0,989, un po' più basso di quello trovato per la somma di tutti i markers (0,968); questo potrebbe indicare una certa concordanza di variabilità nella distribuzione dei markers del PHB.

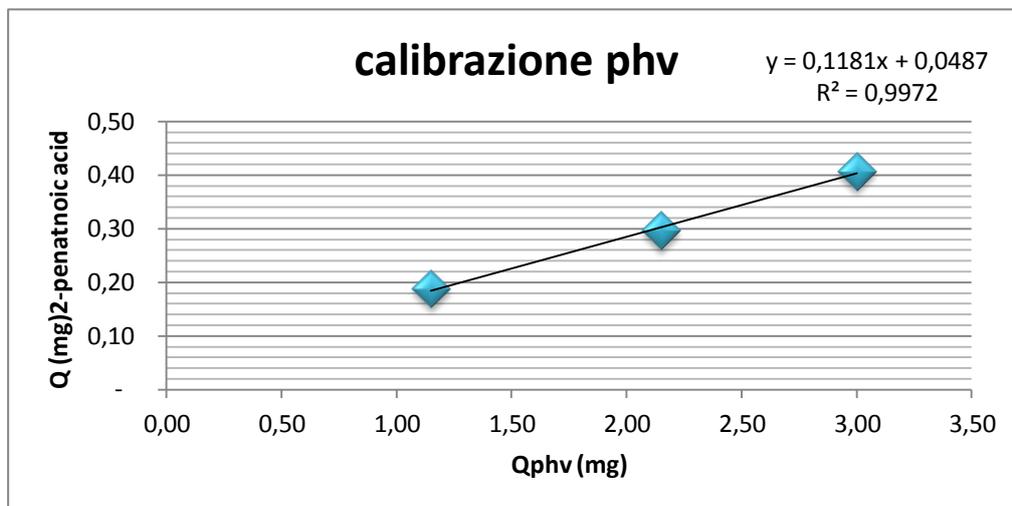


Figura 36 Retta calibrazione PHV

La procedura è stessa applicata anche al PHB/HV per la calibrazione del PHV. Sotto è riportato il grafico (fig.36) della retta di calibrazione, che rapporta la resa del marker di HV (a.2-pentanoico) sulle varie quantità pesate di PHV estratto, con una linearità molto buona R^2 di 0.997.

Ripetibilità

La precisione stima la concordanza fra i risultati di analisi ripetute sullo stesso campione con lo stesso metodo analitico, è quindi un indice del grado di dispersione dei risultati. E' stata valutata la ripetibilità eseguendo 4 repliche dell'intera procedura ad uno stesso campione reale di biomassa (ac64) ed è espressa (in tab.8) tramite la deviazione standard dalla media dei risultati.

I risultati sono soddisfacenti avendo una SD dello 0.3%.

REPLICHE	% PHB	Media	%RSD
ac64	4,3	4,0%	0,2%
ac64_2	3,9		
ac64_4	3,9		
ac64_5	4,1		

Tabella 8 PRECISIONE: repliche di campioni reali (%PHB-media%-SD%)

Accuratezza

Per la misura dell'accuratezza, in assenza di un materiale certificato contenente PHA, è stato comparato il metodo della pirolisi del presente lavoro di tesi con il metodo tradizionale della metanolisi del 1978 (Braunegg, 1978) ampiamente utilizzato in letteratura.

In tab.9 sono presentati diversi campioni reali (ac) contenuti PHB, PHB standard, un campione di PHA estratto dalla biomassa e un campione di *Copravidius necator* analizzati tramite il metodo della metanolisi e tramite il metodo di pirolisi GC-FID sviluppato in questa tesi.

CAMPIONI	%PHB da metanolisi	% PHB da pirolisi
MMC	33	48
MMC	23,7	25
MMC	15,5	10
MMC	27,7	27
MMC	4,6	3,5
MMC	7,2	6
<i>cupravidius necator</i>	52	56
<i>estratto PHA</i>	100	99,5
standard PHB	100	100

Tabella 9 Confronto del metodo pirolisi GC-FID con il metodo della metanolisi di vari campioni (concentrazioni %PHB da PY-%PHB da metanolisi)

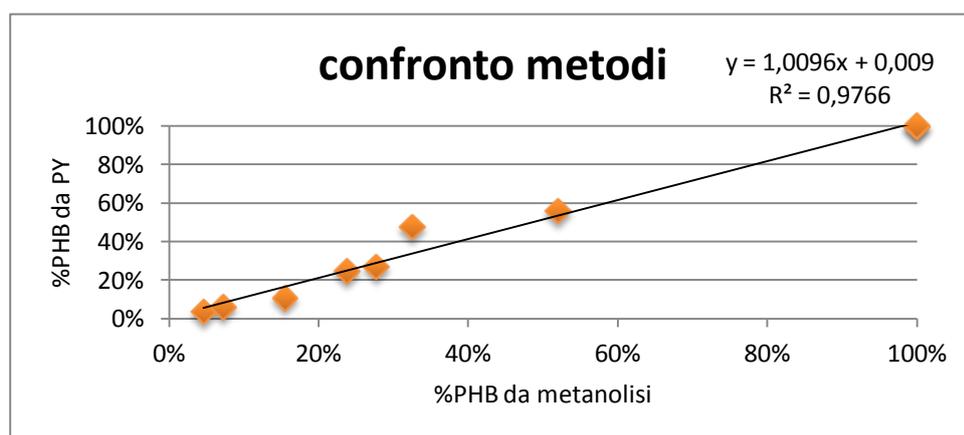


Figura 37 Concentrazione di PHB nella biomassa ottenuta da coltivazioni tramite metanolisi e tramite pirolisi

Dal grafico (fig.37) risulta evidente una buona correlazione tra i due metodi, lo dimostra infatti il coefficiente R^2 di 0.976. Il coefficiente di correlazione è comparabile anche con altri metodi per la determinazione

del PHA presenti in letteratura, come la FTIR (Arcos-Hernandez et al., 2010).

Bianco procedurale

Il bianco procedurale è un'analisi necessaria per determinare la presenza di eventuali interferenti nel corso dell'analisi o di contaminazioni.

Consiste nella normale procedura per la determinazione dei campioni solamente in assenza dello stesso, quindi, è stato ottenuto inserendo nel tubicino porta-campioni solamente della lana di quarzo, in assenza del campione, fatta partire la pirolisi, eluita la xad con i soliti 4ml di ACN(come da normale procedura) e iniettato un 1uL della soluzione ottenuta nel gascromatografo.

I risultati non hanno mostrato fonti di contaminazione.

Limite di rivelabilità

Il limite di rivelabilità, LOD è la verifica della più piccola quantità di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del fondo nel caso di questa tesi valutato sulla base del rapporto del segnale sul rumore (**S/N**) del cromatogramma ottenuto dall'intera procedura analitica applicata soluzioni diluite di standard. Nel presente lavoro il LOD è stato valutato pirolizzando quantità di PHB standard in misura decrescente (vedi tab.10).

Per fare ciò è stata preparata una soluzione madre, con quantità nota di PHB standard (40.42mg) in un volume noto di diclorometano CH_2Cl_2 , (4ml). Per far disciogliere completamente il polimero, la miscela è stata sonicata per 15min e una volta ottenuta la soluzione omogenea sono stati iniettati, con una micro siringa Hamilton, rispettivamente 20uL, 10uL, 5uL e 2.5uL nei tubicini porta campione (già precedentemente preparati con della lana di quarzo). Infine, come da procedura, sono stati pirolizzati e analizzati nel GC-FID.

La quantità minima rilevabile dallo strumento GC-FID è quella che produce un rapporto, segnale sul rumore di fondo **S/N = 3**.

Dai risultati mostrati in tabella 10, risulta che il PHB è di 0.10 mg.

Peso campione(mg)	S/N
0.20	11.43
0.10	3.56
0.05	2.09
0.025	1.29

Tabella 10 LOD: Rapporti segnale/rumore ottenuti dalla pirolisi GC/FID di soluzioni di PHB in DCM

Recupero

Il recupero è la capacità di un metodo analitico di determinare la totalità di analita presente in una matrice. In questo lavoro è stato verificato attraverso prove di *Breakthrough* su tre campioni reali (ac60-ac60_2-ac79). Sono state posizionate esattamente 3 xad una di seguito all'altra, tenute con dei giunti in gomma. Dopo la pirolisi le cartucce sono state singolarmente eluite con i 4ml di ACN e 100ul di S.I. (come da procedura). Il risultato è mostrato nella tabella 11, che riporta il contenuto percentuale di PHB nella prima, nella seconda e nella terza cartuccia. Com'è visibile piccole percentuali del polimero sono ancora presenti nelle xad successive alla prima probabilmente a causa di una incompleta eluizione dalla cartuccia e della condensa rimasta sulla sonda.

Campione	% PHB	Recupero%
ac79-xad1	6,4	93
xad2	0,3	
xad3	0,2	
Ac60-xad1	6,5	77
xad2	1,4	
xad3	0,5	
Ac60_2-xad1	16,6	89
xad2	1,7	
xad3	0,3	

Tabella 11 recupero: verifica di Breakthrough in campioni reali

Il recupero del metodo calcolato nei tre campioni è dell'86% con un deviazione standard dell'8%.

Greenness

La greenness è la sostenibilità di un metodo dal punto di vista ambientale in quanto utilizza solventi e reagenti non pericolosi. Il NEMI (National Environment Methods Index) ha sviluppato un profilo per quantificare il grado di greenness di un metodo, basandosi su quattro criteri di accettabilità.

Il metodo, qui proposto, della pirolisi analitica con gascromatografia FID è paragonabile a quello ottenibile con i metodi convenzionali, ma senza l'uso di reagenti o solventi pericolosi e/o tossici ed evitando tempi di reazione lunghi.

CAPITOLO IV

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono state investigate metodologie di analisi di acidi carbossilici a catena corta tramite gas cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). Gli analiti di interesse hanno riguardato due famiglie principali:

1. gli acidi grassi volatili (VFA), che si formano nella fase acidogenica della digestione anaerobica dell'olio di pirolisi;
2. gli acidi alchenoici, che si formano dalla degradazione termica, tramite pirolisi, dei poli(idrossialcanoati) (PHA).

Per l'analisi dei VFA è stato applicato il metodo della single drop extraction (SDE), già sviluppato nei laboratori, che consente l'isolamento selettivo di una vasta gamma di analiti da campioni aventi una matrice complessa. La tecnica utilizza una piccola quantità di solvente (0.8ul di DMC) sospesa sotto forma di una goccia, all'estremità dell'ago di una microsiringa, che viene esposta nel campione per 15 minuti. Alla fine, viene estratta la siringa seguendo la stessa procedura, ma in maniera inversa, e iniettata la goccia nel GC-FID. Questa procedura è stata applicata ai test di biometanazione dell'olio di pirolisi effettuati nel presente lavoro, per un periodo di circa 5 mesi.

Nel lungo esperimento dei test di biometanazione è stata dimostrata la fattibilità della fermentazione dell'olio di pirolisi, in questo caso proveniente dalla degradazione termochimica di stocchi di mais. Infatti, dopo un primo adattamento, tutti gli inoculi hanno dimostrato di riuscire a scindere le molecole organiche del bio-olio in composti più semplici fino ai VFA nella fase acidogenica, e infine a degradarli ulteriormente iniziando così la produzione metano.

Lo sviluppo del nuovo metodo di analisi per il PHA, si basa sulla pirolisi diretta della biomassa e la determinazione qualitativa e quantitativa degli acidi alchenoici, prodotti dalla degradazione termica, tramite pirolisi, del PHA in GC-FID. La sintesi del PHA è stata svolta da colture microbiche miste (MMC) con un substrato di acetato, seguendo il processo di aerobic dynamic feeding (ADF) in un reattore batch. Una volta estratta la biomassa è stata centrifugata, congelata e liofilizzata. È stata studiata la tecnica della pirolisi analitica a 500°C, con successiva eluizione del campione pirolizzato con acetonitrile seguita dall'analisi in GC-FID. La tecnica è stata applicata a polimeri puri (per la calibrazione), ai campioni

batterici derivanti da MMC, precedentemente preparata, e a ceppi selezionati.

I risultati del metodo Py/GC-FID, mostrano essere adeguati per la determinazione quantitativa e della caratterizzazione strutturale del PHA in diversi campioni batterici, siano essi provenienti da colture pure che miste. Il confronto con il metodo tradizionale della metanolisi, ha dimostrato che la tecnica può essere una valida alternativa al metodo convenzionale. Per questo motivo, la pirolisi può accelerare il processo di ricerca sulla produzione di PHA, così da semplificare il monitoraggio dei processi in scala. Inoltre nel nostro metodo il pre-trattamento del campione è minimo e non richiede l'uso di solventi e reagenti chimici.

RINGRAZIAMENTI

Ho iniziato questo lavoro di tesi quasi un anno fa e durante tutto questo periodo, per mia fortuna, ho avuto sempre accanto qualcuno che mi sosteneva, che mi incoraggiava e soprattutto che mi sopportava.

Primariamente devo ringraziare il mio relatore, il prof. Daniele Fabbri per la fiducia che mi ha dato accogliendomi nuovamente nel suo gruppo di lavoro il “pyro-team” e per la sua costante disponibilità. Ringrazio poi il dott. Cristian Torri per la pazienza, la conoscenza e l’aiuto fornitomi ogni qualvolta ne avessi avuto bisogno e tutti i ragazzi del laboratorio.

Di fondamentale importanza per la mia salute psicologica, ringrazio le mie piacevolissime distrazioni: i miei amici.

Infine (non per importanza), la mia famiglia per avermi permesso di arrivare a scrivere questo elaborato.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson A. J., Dawes E. A., Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microb Rev* (1990), 54: 450-472.
- Andreoni V., Bonfanti P., Daffonchio D., Sorlini C., Villa M.; Anaerobic digestion of wastes containing pyrolytic acids *Biological Wastes*, Vol 34, 3, (1990), 203-214.
- Aoyagi Y., Yamashita K., Doi Y.; Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ϵ -caprolactone], and poly[(S)-lactide]. *Polymer Degradation and Stability*, 76, (2002), 53-59.
- Arcos-Hernandez M. V., GuriEFF N., Pratt S., Magnusson P., Weker A., Vargas A. and Lant P., Rapid quantification of intracellular PHA using spectroscopy: An application in mixed cultures. *Journal of biotechnology* 150 (2010), 372-379.
- Bengtsson S, Werker A, Christensson M, Welander T (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Biores Technol* 99:519–526.
- Biby G. D., Degradable plastics. <http://icma.com/inf/polymers.htm> (2002).
- Bioplastics | european-bioplastics.
- Braunegg G., Lefebvre G., Genser KF Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol* 65, (1998),127-161.
- Braunegg G., Sonnleitner B., and R.M. Lafferty, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 29-37 (1978).
- Choi J., Lee S.Y. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng* 14, (1997), 335-280.

- Choi, J. and Lee, S.Y.: Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 13-21 (1999).
- D'Avino L., Lazzeri L.. *Biopolimeri e nuovi materiali rinnovabili*. Estratto dalla relazione finale del progetto ACTIVA promosso e cofinanziato da ARSIA Toscana e coordinato da Legambiente. CRA- CIN Bologna 2006.
- Demirbas A., Pehlivan E., Turkan Altun T.; Potential evolution of Turkish agricultural residues as bio-gas, bio-char and bio-oil sources. *International Journal of Hydrogen Energy* Vol 31, 5, (2006), 613–620.
- Fabbri D, Torri C., Baravelli V.; Effect of zeolites and nanopowder metal oxides on the distribution of chiral anhydrosugars evolved from pyrolysis of cellulose: An analytical study. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 80 (2007) 24–29.
- Grassie N., Murray E. J., Holmes P.A.; *Polym. Degrad. Stab.* (1984), 6, 47.
- Grothe E., Moo-Young M., Chisti Y.; Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microb Technol.* (1999), 25: 132-141.
- Gujjer W., Henze M., Mino T., Van Loosdrecht M.C.M., Activated sludge no. 3. *Water Sci Technol.* (1999), 39: 183-193.
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G.Q., Huang, W.; A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, (1999), 523–526.
- IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- Jarboe L.R., Wen Z, Choi DW, Brown RC: Hybrid thermochemical processing: fermentation of pyrolysis derived bio-oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011) 91: 1519-1523
- Jendrossek, D. Extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: the key enzymes of PHA degradation, p. 41-83. *In* Y. Doi and A.

Steinbüchel (ed.), Biopolymers, vol. 3b. Polyesters II. Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2002).

- Kim B.S.; Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol* , (2000), 27, 774-777.
- Koller M., Atlìc A., Dias M., Reiter A., Braunegg G.: Microbial PHA production from waste raw materials, pp. 85-119, in: Chen, G. G.-Q. (Ed.), *Plastics from bacteria*, vol.14. Springer, Berlin/Heidelberg (2010).
- Lee S. Y., Choi J., Effect of fermentation performance on the economics of poly-(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polym Degrad Stab*, (1998), 58: 387-393.
- Lehrle and Williams, *Macromolecules* Vol.27, No.14, (1994).
- Lemos, P.C., Serafim, L.S., Reis, M.A.M. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *J. Biotechnol.* 122, (2006) 226–238.
- Lemoigne, M. *Ann. Znst. Pasteur, Paris* 1925,39, 144.
- Madison L. L., Huisman G.W., Metabolic engineering of poly-(3-polyhydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* (1999), 63: 21-53.
- Majone M., Dionisi. D., Villano M., Beccari M. Proceedings of 4th IWA Specialised Conference on Sequencing Batch Reactor Technology (SBR4), 7-10 April, Rome, Italy, 43-50, (2008).
- Meesters K.,; Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams. Design Report, Delft University of Technology (1998).
- Mitomo, H., Ota E.; *Sen-I Gakkaishi*, (1991), 47, 71.
- Moita R., Lemos P.C.; Biopolymer production from mixed cultures and pyrolysis by-products. *Journal of Biotechnology*, 157, (2012), 578-583.
- Morikawa H. e Marchessault R.H , *CAN. J. CHEM.* VOL. 59, 1981.
- Raaz Maheshwari et al. *RJCES* Volume 1 [1] April 2013.

- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J.A., Boccaccini, A. R., and Roy, I.: Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future, *Mater. Sci, Eng. R*, 72, 29-47 (2011).
- Raposo F., Borja R., Cacho J.A., Mumme J., Orupöld K., Esteves S., Noguerol-Arias J., Picard S., Nielfa A., Scherer P., Wierinck I., Aymerich E., Cavinato C., Rodriguez D.C., García-Mancha N., Lens P.N.T., Fernández-Cegrí V., First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error, *Trends in Analytical Chemistry* (2011).
- Reddy C.S.K., Ghai R., Kalia RVC. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* 87, (2003), 137-146.
- Ren N.Q., Wang B.Z. Hydrogen-production production technology using organic wastewater fermentation-theory and method. Harbin: Science Technology Press; 1994.
- Reis M. A. M., Serafim L. S., Lemos P. C., Ramos A. M., Aguiar F.R., Van Loosdrecht M. C. M.; Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* 25 (2003), 377-385.
- Satoh H., Iawamoto Y., Mino T., Matsuo T.; *Water Sci Technol*, (1998), 38: 109-109.
- Satoh H., Iawamoto Y., Ramey W.D., Koch F. A., Oldham W. K., Mino T., Matsuo T. Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage. *Water Sci Technol*, (1996), 34: 9-16.
- Sei Kwang Hahn and Yong Ketm Chang; Thermogravimetric analysis for poly(3-hydroxybutyrate) quantification. *Biotechnology Techniques*, 9, (1995) p.873-878.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Albuquerque, M.G.E. Reis, M.A.M. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (4), 615-628, 2008.
- Si-Dong Li, Ji-Dong He, Peter H. Yu, Man Ken Cheung; Thermal Dregadation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as Studied by TG, TG-FTIR,

and Py-GC/MS. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 89, (2003), 1530-1536.

- Steinbuchel A., Valentin HE. *FEMS Microbiol Lett.*, 128-219, (1995).
- Thomson N., Roy I., Summers D. and Sivaniah E. In vitro production of polyhydroxyalkanoates: achievements and applications. *J. Chem. Biotechnol.* (2009), 85, 760-767.
- Unmar, G. and Mohee, R. (2008), *Bioresearch Technology*, 99, pp. 6738-6743
- Valera M. *Chimica & Industria - Giugno 2001*
- Valentino F., Brusca A. A., Baccari M., Nuzzo A., Zanaroli G., Majone M. *Start up of biological sequencing batch reactor (SBR) and short-term biomass acclimation for polyhydroxyalkanoates production.* *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (88), 261–270, (2013).
- Vispute T. P., Zhang H., Sanna A., Xiao R., Huber G.W. Renewable chemical commodity feedstocks from integrated catalytic processing of pyrolysis oils. *Science* 330 (6008), (2010), 1222-1227.
- Wang Y., Zhang Y., Meng L., Wang J., Zhang W.; Hydrogen-methane production from swine manure: Effect of pretreatment and VFA accumulation on gas yield; biomass and bioenergy 33, (2009), 1131-1138.
- Werker A., Lind P., Bengtsson S., Nordstro F.; Chlorinated-solvent-free gas chromatographic analysis of biomass containing polyhydroxyalkanoates. *WATER RESEARCH* 42 (2008) 2517 – 2526.