

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

*Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali (DICAM)*

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA  
E DI PROCESSO**

Tesi di laurea in  
**Laboratory of Industrial and Environmental Biotechnology**

# **Recupero e purificazione di poli- idrossialcanoati da cellule batteriche**

CANDIDATA:  
**Anna Chiara Orlando**

RELATORE:  
**Prof. Lorenzo Bertin**

CORRELATORI:  
**Ing. Gonzalo Augustin Martinez**  
**Chiarissimo Prof. Fabio Fava**

Anno Accademico 2014/2015  
Sessione I

*A mio padre*

*Non è che t'aspetti qualcosa di particolare da questo libro in particolare.  
Sei uno che per principio non s'aspetta più niente da niente.  
(I. Calvino – Se una notte d'inverno un viaggiatore)*

# INDICE

INDICE DELLE FIGURE.....	6
INDICE DELLE TABELLE .....	8
PREFAZIONE .....	11
1. INTRODUZIONE.....	14
1.1 Vantaggi e svantaggi della materia plastica.....	14
1.2 Caratteristiche della bioplastica .....	18
1.3 Caratteristiche principali dei <i>PHA</i> .....	20
1.3.1 Struttura dei <i>PHA</i> .....	20
1.3.2 Processi <i>upstream</i> : metodi per la produzione di <i>PHA</i> .....	22
1.3.3 Processi <i>downstream</i> : metodi di recupero e purificazione di <i>PHA</i> da microorganismi .....	23
1.3.4 Mercato e uso dei <i>PHA</i> .....	27
1.4 Produzione di bioplastica su larga scala .....	27
2.SCOPO DELLA TESI .....	31
3. MATERIALI E METODI.....	33
3.1 Prodotti utilizzati.....	33
3.2 Allestimento esperimenti .....	34
3.2.1 Produzione e accumulo di <i>PHA</i> .....	34
3.2.2 Purificazione e recupero di <i>PHA</i> .....	35
3.3 Metodi analitici .....	42
3.3.1 Determinazione del peso secco della biomassa .....	42
3.3.2 Determinazione della purezza dei <i>PHA</i> .....	42
3.4 Strumentazione .....	43
3.4.1 Moisture Analyzer.....	43
3.4.2 TGA – Analisi Termogravimetrica .....	44
4. RISULTATI.....	46
4.1 Produzione e accumulo di <i>PHA</i> .....	46
4.1.2 Determinazione del peso secco della biomassa .....	47
4.2 Purificazione e recupero .....	47
5. DISCUSSIONE.....	57
5.1 Approccio generale .....	57

5.2 Esperimenti gruppi A e B: verifica del tempo di azione ottimale di NaOH ed etanolo .....	59
5.3 Esperimenti gruppo C: scelta delle condizioni migliori del processo .....	59
5.4 Esperimenti gruppo D: pretrattamento con acidi organici e inorganici.....	62
6. CONCLUSIONI.....	64
7. BIBLIOGRAFIA.....	66

## INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1-1: CRESCITA DELLA PRODUZIONE MONDIALE DELLA PLASTICA DAL1950 AL 2012 INCLUSI TERMOPLASTICI, POLIURETANI, ELASTOMERI, ADESIVI, PP, FIBRE. NON INCLUDE PET, PA E FIBRE POLIACRILICHE. FONTE PLASTICSEUROPE.....	15
FIGURA 1-2: PREZZO DEL BRENT DAL 1987 AL 2013.....	15
FIGURA 1-3: RECUPERO, SMALTIMENTO IN DISCARICA E RECUPERO DI ENERGIA ASSOCIATO AI RIFIUTI DIPLASTICA,2012 .....	17
FIGURA 1-4: RIFIUTI DI PLASTICA RICICLATI E RECUPERATI DAL 2006 AL 2012 FONTE.....	17
FIGURA 1-5: TIPI DI BIOPLASTICA.....	19
FIGURA 1-6: GRANULO DI PHB. IL CORE CONSISTE NEL POLIMERO DI PHA COPERTO DA UNO STRATO LIPIDICO INTEGRATO .....	21
FIGURA 1-7: PRODUZIONE GLOBALE DI BIOPLASTICHE E PREVISIONE FINO AL 2018. FONTE PLASTICSEUROPE.....	28
FIGURA 1-8: PRODUZIONE MONDIALE DI BIOPLASTICHE NEL 2013.....	29
FIGURA 3-1: BIOSTAT B SARTORIU.....	34
FIGURA 3-2: TERMOGRAVIGRAMMA TGA, IL DELTA Y RAPPRESENTA IL VALORE DI PUREZZA DEL POLIMERO .....	43
FIGURA 3-3:MOISTURE ANALYZER .....	44
FIGURA 3-4: SCHEMATIZZAZIONE TGA.....	45
FIGURA 4-1: ANDAMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO, PRESSIONE DI OSSIGENO, CONCENTRAZIONE DELLA BIOMASSA ESPRESSA IN TERMINI DI ASSORBANZA E CONCENTRAZIONE DELLO IONE AMMONIO DURANTE IL FED-BATCH.....	46
FIGURA 4-2: VALUTAZIONE TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO DI SODIO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE LA DIGESTIONE .....	48

FIGURA 4-3: VALUTAZIONE TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO DI SODIO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE LA DIGESTIONE .....	49
FIGURA 4-4: VALUTAZIONE TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'ETANOLO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE IL TRATTAMENTO.....	50
FIGURA 4-5: CONFRONTO DEL TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO E DELL'ETANOLO. DURANTE IL TRATTAMENTO CON L'ALCOL LA PUREZZA AUMENTA FINO AL 90%.....	51

## INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1-1: PROPRIETÀ DI MCL-PHA : 3HB,3-IDROSSIBUTIRRATO; 3HV,3-IDROSSIVALERATO; 4HB,4-IDROSSIBUTIRRATO.....	20
TABELLA 3-1: COMPOSIZIONE AGAR	TABELLA 3-2: MICRONUTRIENTI AGGIUNTI AL TERRENO DI COLTURA.....
	33
TABELLA 3-3: ESPERIMENTI GRUPPO C-1, VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA DELLA DIGESTIONE E MISCELAZIONE DELLA SOLUZIONE .....	37
TABELLA 3-4: ESPERIMENTI GRUPPO C-2,VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI BIOMASSA .....	38
TABELLA 3-5: ESPERIMENTI GRUPPO C-3, VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLA SOLUZIONE DI IDROSSIDO .....	39
TABELLA 3-6: ESPERIMENTI GRUPPO C-3, VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI IDROSSIDO E DURATA DELLA DIGESTIONE.....	40
TABELLA 3-7: ESPERIMENTI GRUPPO D-1, PRETRATTAMENTO CON ACIDI ORGANICI E INORGANICI.....	41
TABELLA 3-8: ESPERIMENTI GRUPPO D-1, PRETRATTAMENTO CON ACIDO SOLFORICO E VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA E DELLA DURATA DELLO STESSO .....	42
TABELLA 4-1: CARATTERISTICHE DELLA BIOMASSA AL TERMINE DELLA PRODUZIONE IN FED-BATCH .....	47
TABELLA 4-2: DETERMINAZIONE DEL PESO SECCO DELLA BIOMASSA .....	47
TABELLA 4-3: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO B-1 PER LA STIMA DEL TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'ETANOLO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE IL TRATTAMENTO .....	51
TABELLA 4-4: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-1 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA E DELLA MISCELAZIONE DELLA SOLUZIONE .....	52
TABELLA 4-5: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-2IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI BIOMASSA .....	53
TABELLA 4-6: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-3 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI IDROSSIDO DI SODIO .....	53



TABELLA 4-7: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-3 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI IDROSSIDO DI SODIO E DURATA DELLA DIGESTIONE.....	54
TABELLA 4-8: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO D-1 IN SEGUITO A VARIAZIONE DEL TIPO DI ACIDO UTILIZZATO PER IL PRETRATTAMENTO DELLA BIOMASSA .....	55
TABELLA 4-9: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO D-2 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA E DURATA DEL PRETRATTAMENTO CON ACIDO SOLFORICO .....	55



## PREFAZIONE

Al giorno d'oggi sembra difficile immaginare un mondo senza plastica quando invece solo un secolo fa non ne eravamo a conoscenza: dai contenitori per alimenti ai giocattoli per bambini, dai componenti per auto ai dispositivi utilizzati in campo medico, e sono solo alcune delle molteplici applicazioni.

L'ingresso della plastica nella vita di tutti i giorni ha anche cambiato le nostre abitudini introducendo il concetto di usa e getta e regalando la convinzione di un risparmio di tempo e risorse. Se però ci spostiamo di qualche metro e guardiamo la situazione da un'altra prospettiva, ci renderemo conto che tale convinzione non è altro che una parvenza temporanea, poiché è pur vero che l'utilizzo di piatti e forchette di plastica costituisce una comoda soluzione al vetro ma ci siamo mai chiesti come vengano prodotte e smaltite le tonnellate di materiale plastico che noi consumiamo?

La maggioranza della materia plastica viene prodotta a partire dalla nafta, frazione derivante dalla distillazione del petrolio, pertanto appare chiaro come, innanzitutto, il suo prezzo sia direttamente proporzionale a quello del greggio, senza contare la difficoltà di eliminare l'enorme quantità di rifiuti quotidianamente prodotti.

Difatti l'impossibilità di smaltire la plastica con i comuni metodi tradizionali quali interrimento ed incenerimento costituisce uno dei maggiori problemi relativamente al suo uso: ad esempio è stato rilevato che la grande chiazza di immondizia nel nord del Pacifico contenga enormi quantità di rifiuti plastici che fluttuano liberamente nell'oceano.

Parallelamente alla politica del riciclo/recupero non solo della materia plastica ma anche di altri scarti materiali e alimentari, la cosiddetta *bioplastica* appare come una valida sostituta della plastica tradizionale in quanto derivante da materie prime rinnovabili e grazie alla sua biodegradabilità ha un minore impatto sull'uomo e sull'ambiente.

Pur essendo le bioplastiche più costose delle plastiche tradizionali, negli ultimi anni il loro mercato è diventato sempre più competitivo in termini di costi, supportato anche sul piano legislativo tramite l'introduzione di standard e schemi di certificazione ed in alcuni paesi si è arrivati fino al divieto di utilizzo delle plastiche tradizionali per talune applicazioni, come i sacchetti per la spesa usa e getta. La domanda di prodotti in bioplastica ha interessato soprat-

tutto i settori del packaging, automobilistico, giocattoli ed elettronica di consumo, coinvolgendo sia i produttori in cerca di nuovi materiali, sia i produttori di prodotti finiti che osservano un grande potenziale di innovazione e diversificazione della loro offerta precedentemente basata su plastiche tradizionali.

Secondo i dati rilevati dall'Istituto per le Bioplastiche e i Biocompositi (*IFBB*) dell'Università di Hannover in collaborazione con il Nova Istitute di Hurth in Germania, le capacità produttive cresceranno dagli attuali 1,67 milioni di tonnellate annue a 6,73 milioni nel 2018, attestando un incremento percentuale di oltre il 400%.

La definizione di sviluppo sostenibile adottata attualmente dall'Unione Europea comprende i tre ambiti - economico, sociale ed ambientale – il cui peso deve essere considerato in eguale misura.

Riferendoci all'industria della plastica, questo significa rendersi responsabili dell'introduzione di nuovi articoli sul mercato secondo queste tre diverse prospettive focalizzando l'attenzione su tutti gli stadi che compongono il ciclo di vita del prodotto (progettazione, produzione, utilizzo, smaltimento o recupero).

Dunque il rispetto della sostenibilità parte dall'approvvigionamento di risorse, al processo di produzione, prosegue con i metodi di trattamento, confezionamento e distribuzione, per terminare all'uso e alla gestione dei rifiuti, incluso il trasporto. Contemporaneamente per essere competitivi i prodotti devono anche possedere proprietà funzionali e qualitative migliori o almeno confrontabili con quelle dei prodotti concorrenti quali vetro, metallo e carta, rispettando gli standard di protezione ambientale e cercando di contribuire al miglioramento del sistema di gestione dei rifiuti.

Il riconoscimento da parte del mercato e della società del valore e delle implicazioni delle nuove soluzioni tecniche e tecnologiche richiede un elevato grado di consapevolezza da parte dei consumatori basato su assunti di riconosciuta validità scientifica.

Il presente lavoro di tesi si colloca nel quadro generale dell'approccio ecosostenibile per la produzione di bioplastiche, partendo dalla coltivazione in *fed-batch* di microrganismi capaci di accumulare poliidrossialcanoati (*PHA*), polimeri utilizzati per la produzione di plastica bio, fino all'estrazione di questi ultimi con solventi non alogenati e a basso impatto ambientale.

Un primo passo verso la salvaguardia dell'ambiente e delle specie che lo abitano, è sicuramente l'acquisizione di una coscienza ambientalista supportata da politiche di riciclo e riuso che mirano a soppiantare la religione dello spreco a cui in questi ultimi anni ci siamo piegati.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Vantaggi e svantaggi della materia plastica

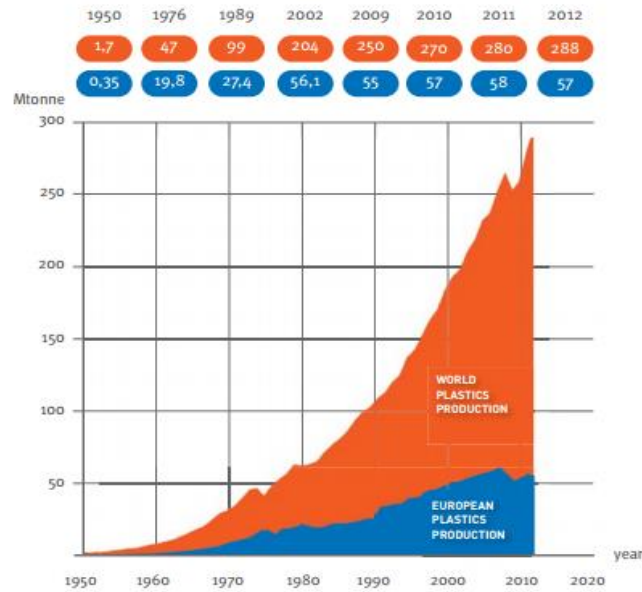
La plastica fa il suo ingresso nella storia verso la fine del XIX secolo quando l'inglese Alexander Parkes brevetta il primo materiale plastico semisintetico a base di cellulose battezzandolo "parkensite". Questo, quindi, comincia ad essere utilizzato per la produzione di manici, scatole e oggetti flessibili quali i polsini.

Da qui in poi la strada che porta alla diffusione e all'uso della plastica nella vita di tutti i giorni è tutta in discesa: dai dispositivi medici sterili ai contenitori per conservare i cibi, dagli accessori per le automobili ai giocattoli per i bambini, solo per citarne alcuni esempi. In particolare le materie plastiche hanno assunto una crescente importanza nei settori dell'imballaggio e dell'edilizia.

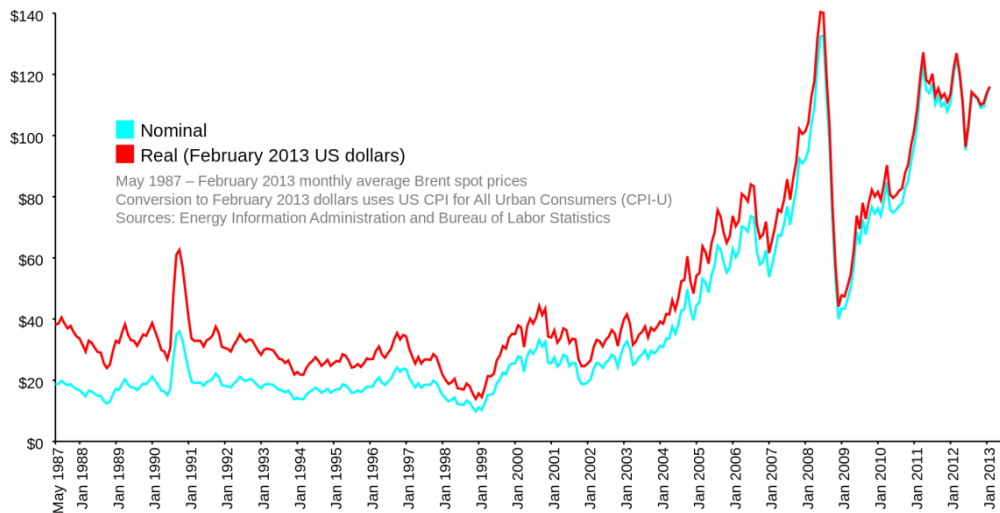
Le principali caratteristiche alla base del successo della plastica sono la leggerezza e la versatilità, proprietà che la rendono adatta all'uso in molti settori; la plastica è inoltre chimicamente inerte, è facile da lavorare con basso consumo di energia e può essere raccolta e riciclata con relativa facilità.

Grazie a tali proprietà la plastica ha sostituito in molti casi i materiali più comunemente utilizzati quali il vetro, la carta e il legno.

La plastica deriva da differenti prodotti organici di origine naturale come cellulosa, carbone, gas naturale e petrolio. La sua produzione inizia con il processo di distillazione del greggio, in seguito al quale esso viene separato in frazioni pesanti e frazioni leggere da cui viene ricavata anche la nafta, miscela di idrocarburi caratterizzata da bassa volatilità e prodotto primario per la produzione delle materie plastiche. Ai polimeri naturali contenuti nella nafta quali polietilene, polistirene, polipropilene, ecc, sono poi aggiunti degli additivi, organici o inorganici, che migliorano le caratteristiche del prodotto finale indirizzato ad uno specifico uso industriale. La produzione mondiale di materiale plastico è di 240 milioni di tonnellate l'anno assorbendo l'8% della produzione mondiale di petrolio, con un tasso di crescita della produzione pari al 9% annuo (Group, 2013): questo significa che ogni 20 anni la quantità di plastica prodotta potrebbe raddoppiare.



**FIGURA 1-1: CRESCITA DELLA PRODUZIONE MONDIALE DELLA PLASTICA DAL 1950 AL 2012 INCLUSI TERMOPLASTICI, POLIURETANI, ELASTOMERI, ADESIVI, PP, FIBRE. NON INCLUDE PET, PA E FIBRE POLIACRILICHE. FONTE PLASTICSEUROPE**



**FIGURA 1-2: PREZZO DEL BRENT DAL 1987 AL 2013**

Per produrre 1 tonnellata di plastica sono necessari 900 litri di petrolio, 180 metri cubi d'acqua e 14 mila kilowattora di energia (Comelli, 2013). Il prezzo del *Brent* (tipo di petrolio del mare del Nord utilizzato come parametro di riferimento per i prezzi degli altri tipi di greggio) ha toccato il suo minimo storico il 10 dicembre 1998 quando fu quotato a 9,55 \$ al barile mentre

il massimo è stato l'11 luglio 2008 quando le quotazioni registrarono 147,25 \$ al barile. Nel 2009 ha raggiunto di nuovo un minimo di circa 40 \$ per ritornare nel 2011 al di sopra dei 90 \$ fino ai giorni nostri.

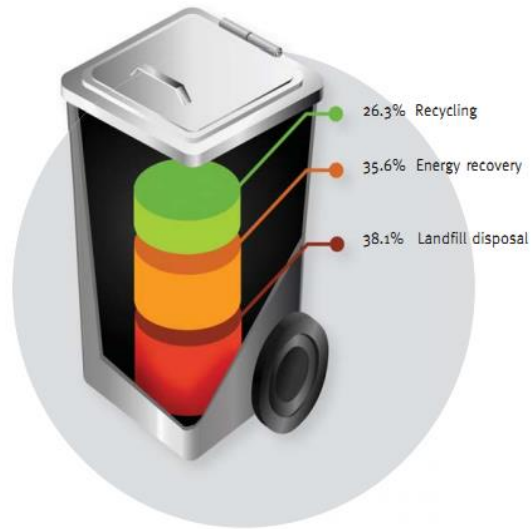
È evidente quindi, che i costi di produzione della materia plastica dipendono in maniera cospicua dal prezzo a cui il petrolio viene venduto.

Accanto agli innumerevoli vantaggi apportati dall'utilizzo della plastica, negli anni sono emersi aspetti negativi relativi innanzitutto all'inquinamento ambientale causato dalla dispersione del materiale plastico nei rifiuti urbani e conseguentemente nelle discariche. Difatti non è possibile applicare i metodi tradizionali di smaltimento dei rifiuti, quali interrimento ed incenerimento, alla plastica, poiché a causa dei suoi costituenti i tempi di decomposizione sono molto lunghi: per un sacchetto di plastica si parla di degradazione in 100-1000 anni. La quasi totalità delle materie plastiche bruciando produce oltre che composti tossici quali la diossina, anche una quantità di calore che se non utilizzata per produrre energia (1 Kg di plastica incenerito porta alla produzione di 1,5 KW di energia elettrica (GCR, 2011)), contribuisce ad un aumento della temperatura.

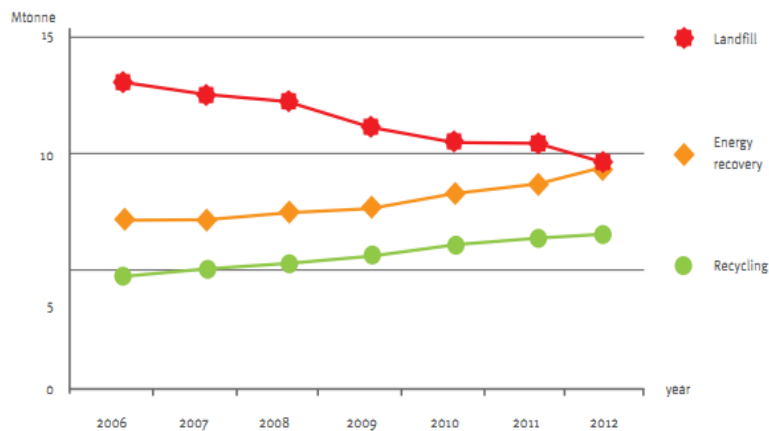
La terza via da seguire è quella del riciclo/recupero dei rifiuti in plastica e non solo, per ottenere una nuova materia prima da reimmettere nel ciclo produttivo. Il primo passo è quello della raccolta differenziata svolta direttamente dal cittadino in modo tale da indirizzare il rifiuto direttamente verso il trattamento più idoneo.

Secondo le stime di *Legambiente*, chi oggi ricicla la metà dei propri rifiuti riduce la CO<sub>2</sub> e i gas climalteranti emessi in atmosfera di una quantità tra i 150 e i 200 chili all'anno. Nel 2012 si è osservato un trend positivo riguardante il recupero della plastica giunto al 61,9% rispetto al 59,6% dell'anno precedente. Contemporaneamente si è avuta una diminuzione dello smaltimento in discarica del 5,5% associato ad un incremento del recupero di energia del 3,3% (Group, 2013)





**FIGURA 1-3: RECUPERO, SMALTIMENTO IN DISCARICA E RECUPERO DI ENERGIA ASSOCIATO AI RIFIUTI DI PLASTICA, 2012**



**FIGURA 1-4: RIFIUTI DI PLASTICA RICICLATI E RECUPERATI DAL 2006 AL 2012 FONTE**

La transizione verso una plastica che soddisfi i nostri bisogni e contemporaneamente non sia nociva né per l'ambiente né per l'uomo, è pertanto una necessità. In questo scenario sta acquistando sempre maggiore importanza la cosiddetta bioplastica: tipo di plastica che deriva da materie prime rinnovabili oppure è biodegradabile o ha entrambe le proprietà (Bioplastic).

La diffusione e l'utilizzo della bioplastica si pone come obiettivo quello di minimizzare la dipendenza dal petrolio in previsione della diminuzione del numero di giacimenti e quindi della sua disponibilità.

## 1.2 Caratteristiche della bioplastica

Le bioplastiche, proprio come le plastiche derivanti dal petrolio, possono essere utilizzate in molti modi e in molti campi: presentano proprietà funzionali quali facilità di stampa ed una permeabilità a gas, vapore acqueo e grassi che può essere modulata a seconda delle applicazioni.

Alcuni esempi sono: bioplastiche ottenute da amido di mais, grano, tapioca e/o patate: *Mater-Bi* (della *Novamont*), *Bioplast* (della *Biotec*); poliacidolattico (*PLA*) ottenuto dagli zuccheri: *Pla Ingeo* (della *NatureWorks Llc*); poliidrossialcanoati (*PHA*) tra cui poliidrossibutirrato (*PHB*), poliidrossivalerato (*PHV*), poliidrossiesanoato (*PHH*); bioplastiche a base di cellulosa: *Bio-grade*.

Una prima distinzione che bisogna fare, che è alla base delle caratteristiche della bioplastica, è tra polimeri *biobased* e polimeri biodegradabili. La definizione di polimeri *biobased* si riferisce non solo ai materiali polimerici già presenti in natura ma anche alle sostanze naturali che sono state polimerizzate per ottenere un peso molecolare più elevato, attraverso un metodo chimico o biologico. Difatti a tale categoria appartengono anche polimeri sintetici derivanti da risorse rinnovabili e CO<sub>2</sub>, quali polinucleotidi, poliammidi, polisaccaridi, poliesteri e polifenoli (Sustainability of Biobased and Biodegradable, 2008).

Il termine biodegradabile invece si riferisce al processo chimico durante il quale i microrganismi presenti nell'ambiente trasformano i materiali in sostanze naturali come acqua, anidride carbonica e biomassa (senza l'introduzione di additivi artificiali). Il processo di biodegradazione è influenzato dalle condizioni ambientali (es. luogo e temperatura), dal materiale e dall'applicazione.

Questo vuol dire che non tutti i polimeri *biobased* sono anche biodegradabili, per esempio i *PLA* non sono biodegradabili.

Per illustrare questo tipo di classificazione la *European Bioplastics* ha introdotto un modello a due assi in cui possono essere inseriti tutti i tipi di plastica, e le loro combinazioni. Tale modello è riportato in FIGURA 1-5.

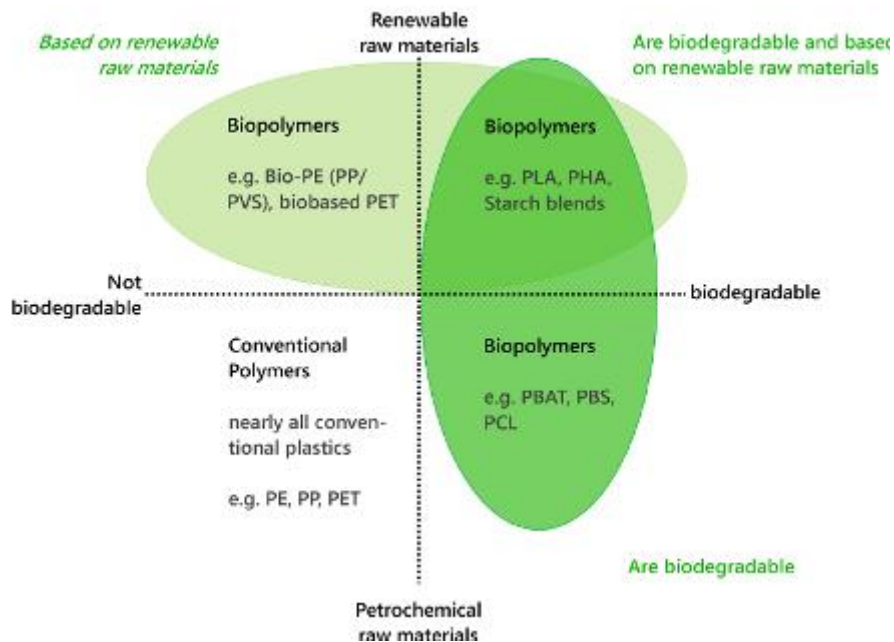


FIGURA 1-5: TIPI DI BIOPLASTICA

I metodi per la produzione di polimeri *biobased* e biodegradabili possono essere classificati in tre gruppi in base al processo utilizzato e al tipo di polimero prodotto: 1) polimerizzazione chimica di monomeri derivanti da processi biologici, per esempio *PLA*; 2) biosintesi diretta di polimeri in microrganismi per esempio *PHA* e 3) modificazione di polimeri naturali quali amido e cellulosa (Sustainability of Biobased and Biodegradable, 2008).

*PLA* e *PHA* sono i migliori candidati per la produzione di plastiche *biobased* e biodegradabili: innanzitutto i rispettivi processi produttivi possono essere classificati come “*zero emission*” il che significa che la quantità di carbonio nell’ambiente rimane costante per tutto il tempo e su scala globale; in più tali poliesteri alifatici hanno proprietà meccaniche simili ai polimeri comunemente utilizzati per la produzione della plastica quali polietilene, polipropilene e polistirene, possono essere prodotti da sostanze rinnovabili quali amido e zuccheri ed inoltre sono biodegradabili (la degradazione completa dei *PHA* avviene in 50 giorni).

Per produrre *PLA* ad elevato peso molecolare senza uso di solventi organici in modo tale da poter definire il prodotto “*green*”, si opta per la policondensazione allo stato liquido e allo stato solido.

## 1.3 Caratteristiche principali dei PHA

### 1.3.1 Struttura dei PHA

I PHA hanno suscitato particolare interesse fin dalla loro scoperta poiché le proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità possono essere raggiunte dalla produzione batterica: essi sono polimeri presenti all'interno di molti microrganismi in quanto accumulati in corpi di inclusione intracellulari chiamati granuli, di dimensioni comprese tra 0,2 – 0,7  $\mu\text{m}$  (Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass, 2013) e sfruttati come riserva di carbonio ed energia dalla cellula. I PHA possono avere lunghezza e unità ripetitiva diversa a seconda della specie batterica e della fonte di carbonio utilizzata durante la fase di produzione. In base alla lunghezza della catena distinguiamo PHA a catena corta (*scIPHA* da 3 a 5 atomi di carbonio), PHA a catena media (*mclPHA* da 6 a 14 atomi di carbonio) e PHA a catena lunga (*lclPHA* più di 14 atomi di carbonio). Si pone l'attenzione anche sui gruppi funzionali ai lati della catena principale quali alogeni, carbonili, epossidi, metilesteri, ecc, poiché insieme alla lunghezza della catena influenzano le proprietà della bioplastica quali cristallinità, temperatura di fusione e temperatura di transizione vetrosa.

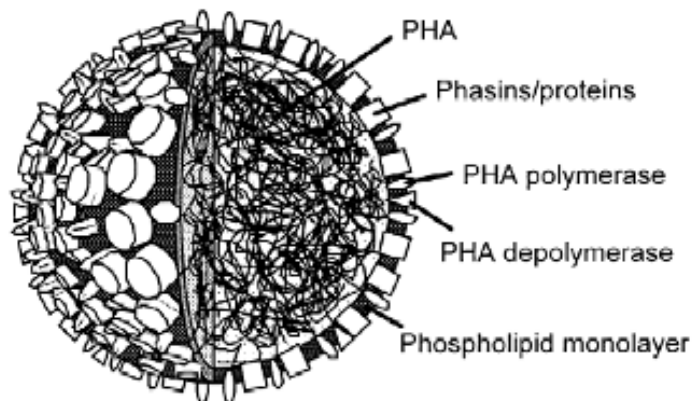
TABELLA 1-1: PROPRIETÀ DI MCL-PHA : 3HB,3-IDROSSIBUTIRRATO; 3HV,3-IDROSSIVALERATO; 4HB,4-IDROSSIBUTIRRATO

	Melting temperature, $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Glass-transition temperature, $T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
P(3HB)	180	4
P(3HB-co-71% 3HV)	83	-13
P(4HB)	53	-48
PHA <sub>MCL</sub>	45–54	-25 to -40
Polyacrylate	–	-106
Polypropylene	176	-10
Polystyrene	240	100

Il fatto che i PHA siano accumulati in granuli fa sì che essi siano separati dall'ambiente cellulare e conseguentemente che la pressione osmotica della cellula non cambi. Il *core* del granulo, che consiste in catene di PHA, è circondato da una membrana costituita da lipidi e proteine la

quale regola le interazioni tra il centro polimerico apolare e i dintorni acquosi (Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass, 2013). In ogni granulo sono localizzate migliaia di catene di *PHA* formanti un'elica con due filamenti tenuti insieme dalle forze di Van der Waals e dai legami a idrogeno. Le proteine associate ai granuli di *sclPHA* e *mclPHA* appartengono a 4 classi: 1) *PHA* polimerasi, 2) *PHA* depolimerasi, 3) fasine (proteine strutturali) e 4) proteine funzionali non ben definite.

Il numero di granuli per cellula è specifico: per la *Ralstonia eutropha* abbiamo da 8 a 12 granuli di grandezza variabile, mentre per la *Pseudomonas oleovorans* si stimano uno o due granuli più grandi. (Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, 2001).



**FIGURA 1-6: GRANULO DI PHB. IL CORE CONSISTE NEL POLIMERO DI PHA COPERTO DA UNO STRATO LIPIDICO INTEGRATO**

L'accumulo dei *PHA* nella cellula è influenzato dal rapporto carbonio/azoto nel substrato: una decrescita naturale della quantità di azoto in contemporanea ad una sufficiente presenza della fonte di carbonio, incentiva tale accumulo (Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*, 2008); solitamente, infatti, il carbonio è in eccesso mentre l'azoto è in difetto. L'ecosostenibilità della produzione dei polioidrossialcanoati non risiede solo nelle caratteristiche del prodotto finale ma anche nella provenienza del terreno di coltura: scarti lignocellulosici come quelli provenienti dal processo di produzione della tequila in Messico (Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by

Saccharophagus degradans, 2008) polisaccaridi, derivanti, ad esempio, dal processo di produzione dello zucchero di canna in Brasile e oli vegetali quali l'olio di palma, prodotto in grandi quantità in Malaysia (Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates, 2011).

La specie batterica maggiormente studiata per la produzione di *PHA* grazie al buon rapporto costo-produzione è il *Cupriavidus necator* anche conosciuto come *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha* e *Alcaligenes eutrophus*, a cui si affiancano altri ceppi quali il *Bacillus cerus* e la *Pseudomonas putida*.

Inoltre sono stati sviluppati diversi ceppi ricombinanti di *Escherichia coli*, batterio di per se non adatto all'accumulo dei poliidrossialcanoati, capaci così di sintetizzare un'elevata quantità di *PHA* a livello intracellulare e grazie alle modificazioni genetiche indotte, suscettibili al processo di lisi cellulare in modo da facilitare il rilascio dei suddetti granuli (Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates, 2011).

### 1.3.2 Processi *upstream*: metodi per la produzione di *PHA*

Allo stato attuale ci sono quattro approcci biosintetici per la produzione di *PHA*: *in vitro* via *PHA*-polimerasi con uso di catalizzatori, e *in vivo* con processi di colture in *batch*, *fed-batch* e continuo.

Il processo *in vitro* è molto recente ed ha i suoi vantaggi rispetto al processo *in vivo*, come quello di controllare la produzione del polimero attraverso l'aggiunta di precursori e cofattori di tali poliesteri. Inoltre, l'isolamento dei *PHA* è più semplice poiché l'estrazione dalla cellula non è necessaria; tuttavia il riciclo dei cofattori appare problematico e costoso.

Il processo in *batch* è di semplice allestimento e si presta bene agli studi sulla crescita della biomassa e sul controllo della produzione di *PHA*. Relativamente al tipo di microrganismo variano sia il terreno di coltura che la durata dell'esperimento solitamente di 1-2 giorni. Durante tale periodo le cellule attraversano diverse fasi di crescita: fase *lag*, crescita esponenziale, produzione di *PHA*, fase stazionaria ed infine decrescita e morte. L'ambiente di crescita della biomassa cambia continuamente in conseguenza del consumo dei vari nutrienti presenti all'inizio del processo all'interno del substrato, pertanto bisogna fare attenzione che in mancanza di fonti di carbonio la cellula non degradi il polimero di nostro interesse.

Nella coltura in *fed-batch*, a differenza della precedente, i vari nutrienti sono integrati dopo che la cellula è entrata nella fase esponenziale. Difatti abbiamo un primo step in cui la biomassa viene fatta crescere in un terreno povero contenente i nutrienti essenziali, il glucosio e un basso contenuto di fosfati. Nel secondo step si aggiungono in maniera controllata glucosio e acidi di varia natura in modo da consentire l'accumulo di *PHA* all'interno della cellula. Il processo viene stoppato quando viene raggiunto il contenuto di *PHA* desiderato.

Il vantaggio del processo in *fed-batch* risiede nell'elevata densità cellulare, tuttavia la crescita della cellula diminuisce quando l'alimentazione e la concentrazione dei nutrienti sono mantenuti costanti. Difatti i composti aggiunti sono consumati dalla biomassa che nel frattempo cresce nello stesso lasso di tempo e questo causa una perdita nella produzione dei *PHA* ed un cambiamento nella composizione del copolimero.

Il processo in continuo viene condotto a temperatura costante e il substrato è perennemente alimentato. La crescita del microorganismo segue la cinetica di *Monod* e questo ci permette di determinare le migliori condizioni di crescita quali la quantità di nutriente da limitare per agevolare l'incremento di biomassa. Tuttavia tale metodo non è applicabile per la produzione industriale poiché un'elevata produzione di *PHA* può essere ottenuta solo sotto specifiche e limitate condizioni.

### 1.3.3 Processi *downstream*: metodi di recupero e purificazione di *PHA* da microrganismi

Dopo la biosintesi dei poliesteri si separa la biomassa dal brodo di coltura attraverso tecniche di filtrazione, centrifugazione o flocculazione e successivamente si procede al recupero dei *PHA* dalla massa di cellule non *PHA* (*NPCM*) chiamata "biomassa residua" che comprende polipeptidi, fosfolipidi, *DNA*, *RNA* e peptidoglicani.

La maggior parte delle bioseparazioni sono caratterizzate da quattro fasi (Belter, 1988):

- 1) Rimozione dei prodotti non solubili: filtrazione e centrifugazione sono le operazioni maggiormente utilizzate.
- 2) Isolamento del prodotto: rimozione del materiale con proprietà ampiamente divergenti rispetto al prodotto desiderato ottenuto tramite adsorbimento o estrazione con solvente.

- 3) Purificazione: tale processo è molto selettivo per il prodotto desiderato e rimuove le impurità ancora presenti. Le tecniche maggiormente utilizzate sono quelle di cromatografia, elettroforesi e precipitazione.
- 4) Pulizia: ottenuta tramite cristallizzazione o essiccamento.

L'applicazione di questi quattro passaggi punta ad aumentare la concentrazione e la purezza del prodotto finale. Bisogna notare che la concentrazione aumenta durante la fase di isolamento mentre la qualità durante quella di purificazione. Alcuni dei procedimenti più recenti semplificano la sequenza convenzionale di operazioni combinando i primi due passaggi.

L'applicabilità del metodo di recupero dipende da diversi fattori (Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass, 2013):

- ceppo microbico, infatti la fragilità della parete cellulare è diversa per ogni microrganismo;
- tipo di *PHA* (*sclPHA*, *mclPHA*) e quantità prodotta;
- purezza richiesta dipendente dall'applicazione finale del biopolimero;
- eventuale disponibilità di prodotti chimici per il recupero di *PHA*;
- effetti accettabili del metodo di isolamento sulla massa molare finale di *PHA*.

I metodi per il recupero dei *PHA* sono raggruppabili in 4 categorie (Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass, 2013)

- estrazione di *PHA* dalla biomassa secca o umida tramite estrazione con solvente ;
- digestione della *NPCM* con sostanze chimiche o enzimi ;
- rottura meccanica della *NPCM* ;
- rottura delle cellule per osmosi in un ambiente ipotonico .

Spesso, indipendentemente dal processo di recupero scelto, si opta per un pretrattamento della biomassa, come ad esempio liofilizzazione, esposizione al calore o uso di alcali, che induce una denaturazione delle proteine e l'indebolimento della parete cellulare in modo da facilitare la successiva estrazione del polimero

Di seguito sono descritti i metodi più largamente utilizzati.

- 1) Estrazione con solvente



Tale procedura è basata sul fatto che i *PHA* sono insolubili in acqua ma solubili in alcuni solventi organici: i clorurati quali il cloroformio, l'1,2 – diclorometano e il cloruro di metile e in alcuni composti ciclici quali propilene e etilene. Il cloroformio è senz'altro il solvente maggiormente utilizzato per l'estrazione di *scl-* e *mcl-* *PHA* poiché garantisce sia purezza che recupero elevati, in quanto dissolve solo la parte lipidica della *NPCM* prima dell'estrazione vera e propria. Successivamente la solubilità dei poliesteri è minimizzata aggiungendo un antisolvente, solitamente un alcol a basso peso molecolare (etanolo o metanolo), in cui il *PHA* sia non solubile. Quest'ultimo, precipitato, è quindi separato dalla miscela per centrifugazione o filtrazione.

I composti clorurati non sono *environmental friendly*, pertanto l'uso di solventi *green* riciclabili ed ecosostenibili sta acquisendo sempre maggiore importanza. Tale metodo è costoso e la separazione del polimero può essere difficoltosa tuttavia il solvente non degrada il *PHA* che ha un elevato peso molecolare e la sua composizione rimane pressoché costante.

## 2) Rottura cellulare con sostanze chimiche

Possono essere usati composti chimici di varia natura: ipoclorito di sodio, surfattanti, composti acidi e alcalini.

L'ipoclorito degrada selettivamente la *NPCM* mentre i *PHA* resistenti all'attacco del composto possono poi essere agevolmente separati. Il processo è esotermico pertanto bisogna controllare la temperatura dell'ambiente di reazione e provvedere anche ad un opportuno sistema di raffreddamento. Il vantaggio nell'utilizzare l'ipoclorito risiede nel fatto che la cellula non deve essere asciugata prima del trattamento e questo comporta un risparmio di tempo ed energia e riduce il costo del processo *downstream*. Inoltre possiamo utilizzare una biomassa con una bassa densità cellulare fino al 3% w/v e una soluzione di ipoclorito al 13% w/v.

La purezza del polimero al termine dell'estrazione raggiunge il 99% tuttavia il *PHA* non è completamente insolubile nella soluzione ed è stata osservata una riduzione del peso molecolare anche del 50% in alcuni casi.

Molti surfattanti, quali il sodio-dodecilsolfato (*SDS*), disintegrano la cellula incorporandosi nella membrana citoplasmatica solubilizzando la *NPCM*. La purezza del polimero è circa del 95% ed il recupero è del 90% senza bisogno di un pretrattamento prima dell'estrazione. Tuttavia tale procedura fornisce un'elevata quantità di sottoprodotti difficili da smaltire.

L'uso di composti acidi o alcalini quali l'idrossido di sodio (NaOH) può costituire una valida alternativa ai composti clorurati. L'idrossido causa la saponificazione dei lipidi presenti nella parete cellulare del microrganismo aumentando la permeabilità della membrana e aiutando il rilascio delle proteine e del materiale non-*PHA*. Esso è un metodo poco costoso e *green* che garantisce elevata purezza e un buon recupero del polimero

### 3) Rottura cellulare con enzimi

Alcuni tipi di enzimi come proteasi, nucleasi e lipasi esercitano una forte azione idrolitica sulle proteine e altri polimeri della parete cellulare ma possono aver effetto, anche se minore, sui *PHA*. Tale metodo garantisce un recupero elevato ma ha anche un costo non trascurabile.

### 4) Rottura meccanica

La disintegrazione della parte della cellula non-*PHA* può essere ottenuta sfruttando pressione elevata, ultrasuoni e pale meccaniche in rotazione. Tali metodi sono però difficilmente applicabili su scala industriale e non garantiscono un recupero consistente.

Vi sono poi altri metodi meno utilizzati quali l'impiego di un fluido supercritico come la CO<sub>2</sub> in combinazione con l'uso di NaOH.

Nella seguente tabella sono riportati vantaggi e svantaggi dei vari metodi.

**TABELLA 1-2: CONFRONTO METODI DI ESTRAZIONE DI PHA CON VANTAGGI E SVANTAGGI**

Isolation method	Advantages	Disadvantages
Solvent extraction	Elimination of Endotoxine/high purity No polymer degradation	Break PHA granules morphology Hazards connected with halogenated solvents High price/Low recovery
Digestion by surfactants	Treatment of high cell densities No polymer degradation	Low purity/Water waste treatment needed
Digestion by NaOCl	High purity	Degradation of the polymer
Digestion by NaOCl and chloroform	Low polymer degradation high purity	High quantity of solvent needed
Digestion by NaOCl and surfactants	Limited degradation/low operating cost	
Digestion by chelate and surfactants	High purity/low environmental pollution	Large volume of wastewater Low degradation of the polymer
Selective dissolution of NPCM	High recovery and high purity low operating costs	
Enzymatic digestion	Good recovery	High cost of enzymes
Bead mill disruption	No chemicals used	Require several passes
High pressure homogenization	No chemicals used	Poor disruption rate for low biomass levels
Supercritical CO <sub>2</sub>	Low cost, low toxicity	Low micronization
Using cell fragility	Use of weak extracting conditions	Low recovery
Air classification	High purity	Require several consecutive flotation steps
Dissolved air flotation	No chemicals used	Low recovery (~80% cells secretes PHB granules spontaneously [67])
Spontaneous liberation	No extracting chemicals needed	

Conseguentemente all'estrazione dei granuli di *PHA* ed ad un primo step di purificazione, si procede ad un'ulteriore trattamento per aumentare la purezza del polimero.

La purificazione solitamente coinvolge l'uso di perossido di idrogeno in combinazione con un trattamento di rottura enzimatica. Tuttavia il perossido fa diminuire il peso molecolare del polimero e viene sostituito con ozono che è inodore e solubilizza le impurità.

### 1.3.4 Mercato e uso dei *PHA*

Oggi il mercato dei biopolimeri è ancora un mercato di nicchia, principalmente ristretto al mercato del packaging e dell'agricoltura e valutato attorno allo 0,4-0,5% del consumo totale delle materie plastiche ma con un tasso di sviluppo elevato secondo molte ricerche di mercato (*Freedonia Group del 13% anno fino al 2013, Ceresana Research del 17,8% anno fino al 2018, BCC Research del 34,3% anno fino al 2016*). In alcune applicazioni per agricoltura e imballaggio, l'utilizzo di biopolimeri consente anche vantaggi economici (film pacciamatura, *waste collection, food packaging, ecc.*).

Tra i *PHA* il più conosciuto è il poliidrossibutanoato (*PHB*) noto anche con il nome di poli-idrossibutirrato prodotto dalla fermentazione di soluzioni di glucosio a cui è stato aggiunto acido propanoico. E' un polimero termoplastico, isotattico ad elevata cristallinità simile al polipropilene isotattico, ma a differenza di questo ha una temperatura di transizione vetrosa troppo elevata e una resistenza all'urto troppo bassa. E' insolubile in acqua e resistente alle radiazioni U.V. Viene inoltre idrolizzato facilmente dagli acidi e pertanto può essere facilmente degradato.

A questa categoria di macromolecole appartiene il copolimero noto con il nome di *Biopol*. Esso è un copolimero di tipo random a blocchi di *PHB* e di poliidrossipentanoato noto anche con il nome di poliidrossivalerato (*PHV*). Viene usato come film per avvolgere alimenti, rivestimenti per carta e per usi medici tra cui rivestimenti per farmaci.

## 1.4 Produzione di bioplastica su larga scala

Anche se le bioplastiche sono generalmente più costose delle plastiche tradizionali, negli ultimi anni il loro mercato è diventato sempre più competitivo, supportato anche sul piano legislativo

dall'introduzione di standard e schemi di certificazione sino al divieto dell'utilizzo delle plastiche tradizionali per talune applicazioni, come i sacchetti usa e getta della spesa.

Difatti basti pensare che i PHA sono 5 volte più costosi della plastica prodotta da materiale petrolchimico (5-6 €/kg in confronto a 1 €/kg) (Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass, 2014) e il processo *downstream* che include pretrattamento della biomassa, estrazione e purificazione del polimero, rappresenta più del 50% dei costi di produzione dei PHA (Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass, 2014).

Secondo i dati rilevati dall'Istituto per le bioplastiche e i biocompositi (*IfBB*) dell'Università di Hannover, in collaborazione con il Nova Institute di Hürth (Germania), le capacità produttive cresceranno dagli attuali 1,67 milioni di tonnellate annue a 6,73 milioni entro il 2018, mettendo così a segno un incremento percentuale superiore al 400%. La crescita interesserà le bioplastiche biodegradabili (da 670.000 a 1,12 milioni di t/a), ma soprattutto quelle non biodegradabili, ottenute da risorse rinnovabili (come *bioPET* o polietilene da bioetanolo), le cui capacità passeranno da 1 a 5,6 milioni di tonnellate annue.

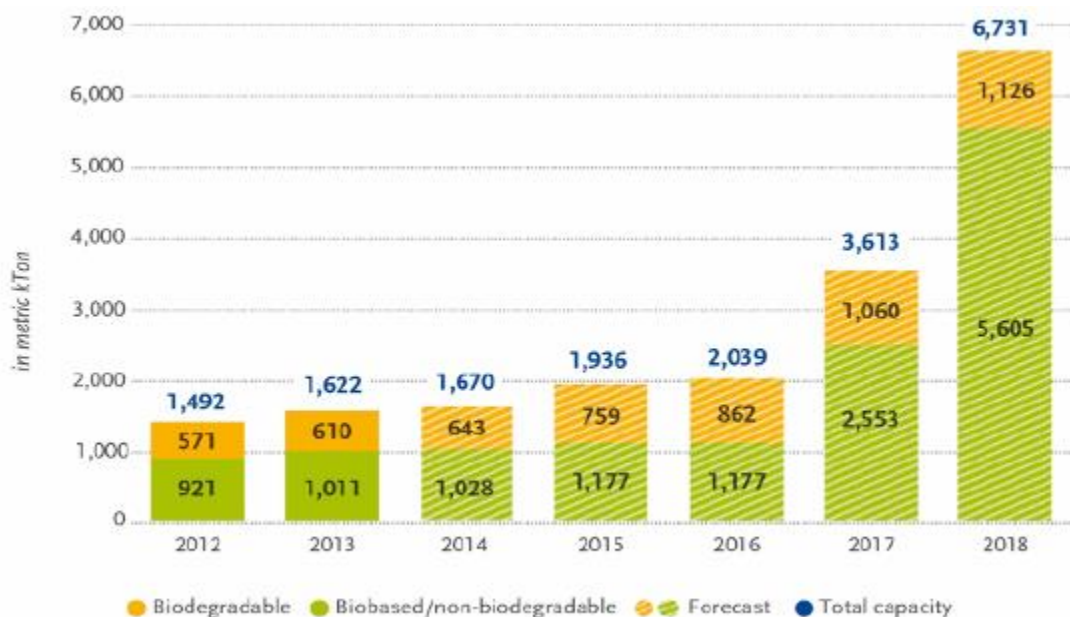


FIGURA 1-7: PRODUZIONE GLOBALE DI BIOPLASTICHE E PREVISIONE FINO AL 2018. FONTE PLASTICSEUROPE

Per quanto concerne la suddivisione per famiglia di biopolimeri, nell'anno 2013 - su un totale di 1,62 milioni di tonnellate - il *bioPET* (solo parzialmente da rinnovabili) valeva circa il 37% del mercato, seguito dal polietilene verde (ricavato da bioetanolo) con il 12,3%. Nel campo delle bioplastiche *biobased*, invece, al primo posto si collocano, con quote intorno all'11%, *PLA* e biopolimeri amidacei (tipo *Mater-Bi*); intorno al 10% vi sono anche i poliesteri biodegradabili (non *biobased*, ma biodegradabili).

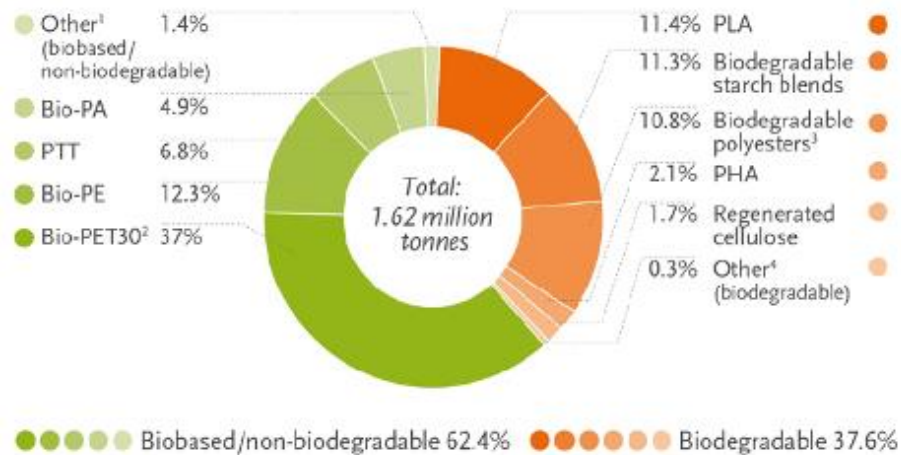


FIGURA 1-8: PRODUZIONE MONDIALE DI BIOPLASTICHE NEL 2013

La situazione al 2018 dovrebbe vedere una netta predominanza del *bioPET*, che varrà da solo circa il 74,3% delle 6,73 milioni di tonnellate prodotte a livello mondiale, mentre le plastiche biodegradabili - tutte insieme - raggiungeranno circa il 17% del mercato, che nel frattempo sarà però cresciuto di quattro volte.

Per quanto concerne le applicazioni, la direttiva europea sul contenimento del consumo di shopper potrebbe spingere i consumi di plastiche biodegradabili e compostabili a livello locale, ma sarà l'imballaggio a guidare la crescita del mercato delle bioplastiche, soprattutto per quanto concerne *bioPET* e polietilene verde. Tassi di crescita interessanti sono attesi anche nel settore dei tessuti, automotive e articoli per il tempo libero, dove è molto sentito il tema della sostenibilità ambientale dei materiali. Resta da capire chi beneficerà della crescita del mercato. L'Asia, che oggi concentra quasi il 52% della capacità produttiva, nel 2018 salirà al 76%, mentre l'Europa scenderà dal 17 al 7,6% e il Nord America dal 18 al 4,3%. Il Sud America riuscirà invece a mantenere una quota di

mercati introno al 12%, sempre considerando che i volumi totali cresceranno da 1,6 a 6,7 milioni di tonnellate.

## 2.SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di sperimentazione è lo studio del processo di *downstream* di *PHA* prodotti in laboratorio partendo dalla verifica dei risultati riportati in letteratura e puntando poi ad un miglioramento di un processo convenzionale attraverso la ricerca di nuove alternative.

I poliidrossialcanoati (*PHA*) sono tra i migliori candidati per la produzione della cosiddetta bioplastica in quanto vengono sintetizzati durante il processo fermentativo da diversi tipi di batteri, in mancanza di un nutriente fondamentale quale l'azoto. Essendo i *PHA* dei prodotti intracellulari è necessario estrarli dalla cellula batterica e successivamente purificarli e tale processo di recupero e purificazione incide notevolmente sui costi complessivi della produzione del polimero.

I processi più comunemente diffusi per l'estrazione dei *PHA* dalla cellula sono l'estrazione con solvente, tipicamente cloroformio, e digestione della *NPCM* da parte di un agente chimico quale l'idrossido di sodio. Il cloroformio è un composto volatile e oltre ad essere pericoloso per l'ambiente, è necessaria una elevata quantità per avere dei valori di purezza e recupero del polimero accettabili (Yasotha, 2006).

Gli studi condotti precedentemente (Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the *PHA* synthase of *Chromobacterium* sp. USM2, 2013) evidenziano come, utilizzando un ceppo di *C.necator* per la produzione in *fed-batch* di *PHA* e sottoponendo la biomassa contenente il 60% del polimero ad un processo di digestione con NaOH 0,1 N per 1 ora con miscelazione della soluzione, e dopo centrifugazione, sottoponendolo ad un ulteriore trattamento con alcoli, si abbiano dei valori di purezza dell'81% con un recupero pari all'88 %. (Enhanced Recovery and Purification of P(3HB-co-3HHx) from Recombinant *Cupriavidus necator* Using Alkaline Digestion Method, 2012). L'idrossido causa la saponificazione dei lipidi presenti nella parete cellulare del microrganismo aumentando la permeabilità della membrana e aiutando il rilascio delle proteine e del materiale non-*PHA* (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012).

Basandoci su tali risultati, durante la nostra sperimentazione i *PHA* sono stati prodotti in un processo *fed- batch* da un ceppo di *C. necator* (DSMZ 545) scelto per la sua robustezza, produttore spontaneo del poliestere capace di accumulare una gran quantità del polimero quando

cresce in condizioni limitate dalla mancanza di un nutriente quale l'azoto. Punto fondamentale dello studio è l'uso di solventi non alogenati per il recupero e la purificazione del polimero in modo da rendere il processo ecosostenibile, in grado però di fornire un prodotto ad elevata purezza, con una massa molare soddisfacente e un buon recupero.

Per la standardizzazione di una procedura di estrazione e purificazione si è scelto appunto l'NaOH per il suo basso costo, la sua reperibilità e la facilità di smaltimento, e l'etanolo per la successiva fase di purificazione per gli stessi motivi dell'idrossido. Difatti da esperimenti precedentemente svolti (Anis, Amirul *et al*, 2012) si nota come la purezza del polimero aumenti quando la biomassa così digerita venga ulteriormente trattata con una soluzione di etanolo al 20% (v/v) per 3 ore.

Al fine di ottenere una procedura di estrazione standardizzata, durante la sperimentazione sono stati valutati diversi parametri: concentrazione iniziale della biomassa, temperatura del processo, miscelazione della soluzione trattata, durata della digestione, concentrazione dell'idrossido di sodio e la possibilità di pretrattare la biomassa con acidi prima della digestione vera e propria.



### 3. MATERIALI E METODI

Il periodo di sperimentazione è durato complessivamente 5 mesi durante il quale sono stati raggiunti i risultati discussi nel presente elaborato.

#### 3.1 Prodotti utilizzati

##### Prodotti chimici:

Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla *Sigma Aldrich*:

- Idrossido di sodio
- Etanolo
- Acido acetico
- Acido lattico
- Acido solforico

##### Matrici

Glucosio

##### Inoculo

La produzione di *PHA* è stata effettuata utilizzando come microrganismo il *Cupriavidus necator* (*DSMS 545*) implementato prima in un terreno di agar (pH 7) e dopo trattamento in autoclave per 21 minuti a 120°C, trasferito in beute contenenti 150 mL di terreno ricco di nutrienti per 24 ore alla temperatura di 30°C e 150 rpm.

**TABELLA 3-1: COMPOSIZIONE AGAR**

Componenti	Massa (g)
S-360	1,38
TC-180	1,38
TC-30	1,8

**TABELLA 3-2: MICRONUTRIENTI AGGIUNTI AL TERRENO DI CULTURA**

Micronutrienti	µL/flask
MgSO <sub>4</sub>	380
CaCl	80
FeNH <sub>4</sub> cit	383
SL-6	750

## 3.2 Allestimento esperimenti

### 3.2.1 Produzione e accumulo di PHA

La produzione di PHA è avvenuta sfruttando l'inoculo descritto sopra in coltura *fed-batch* in un fermentatore da 3L, BIOSTAT B-SARTORIUS, mediante l'utilizzo di un terreno minerale salino (*Medium DSMZ-81*) e utilizzando glucosio come fonte di carbonio per un periodo di 7 giorni in modo da favorire l'accumulo di PHA all'interno della cellula. Infatti, in una prima fase la crescita della biomassa avviene sotto specifiche condizioni in presenza di tutti i nutrienti fondamentali (N,P,C) mentre nella seconda di accumulo si limita lo ione  $\text{NH}_4^+$ . La soluzione di glucosio alimentata aveva una concentrazione di 800 g/L in modo tale da mantenerla ad un valore non inferiore a 10 g/L durante il processo.

La temperatura è stata mantenuta costante a 30°C e l'agitazione variabile tra 800-1800 rpm. Il pH è stato controllato con una soluzione di  $\text{NH}_4\text{OH}$  30% durante le prime 24-30 ore, poi sostituito da una soluzione di NaOH 3M.

Al termine della fermentazione il brodo di coltura è stato posto a 80°C per 15 min e in seguito centrifugato a 8000 rpm per 25 min a 4°C. Successivamente il pellet è stato lavato con acqua distillata e centrifugato nuovamente poi conservato in frigorifero a 4°C.



FIGURA 3-1: BIOSTAT B SARTORIUS

### 3.2.2 Purificazione e recupero di PHA

#### ESPERIMENTI GRUPPO A

**Obiettivo:** Valutare tempo di azione ottimale dell'NaOH sulla biomassa per ottenere purezza elevata

Per determinare il tempo di azione ottimale dell'NaOH sulla biomassa al fine di ottenere un'elevata purezza, è stata diluita una frazione di biomassa avente una concentrazione di 50 g/L con acqua distillata e dopo aver raggiunto una buona omogeneità si è aggiunta una soluzione di NaOH 0,1N. Sono state effettuate 4 prove: 2 della durata di 90 minuti e 2 della durata di 60 minuti. Per ciascuna prova la temperatura di digestione è di 30°C e con miscelazione della soluzione.

Sono stati effettuati dei prelievi da 1 ml ogni 10 minuti per i primi 40 minuti e successivamente ogni 5 minuti fino alla fine della digestione per le prime 2 prove, mentre per le ultime 2 i prelievi sono stati effettuati ogni 5 minuti dall'inizio della digestione. I campioni sono stati subito centrifugati a 15000 g per 20 minuti alla temperatura di 4°C e poi riposti in stufa ad asciugare. La determinazione della purezza è avvenuta tramite analisi termogravimetrica (*TGA 4000 - Perkin Elmer*).

#### ESPERIMENTI GRUPPO B

**Obiettivo:** Valutare tempo di azione ottimale dell'etanolo sul polimero per avere purezza più elevata

Per determinare il tempo di azione ottimale dell'etanolo sul polimero già sottoposto a digestione con NaOH nelle modalità descritte per gli esperimenti del gruppo A, al fine di ottenere un aumento della purezza, è stata diluita la biomassa così ottenuta con una soluzione al 20% (v/v) di etanolo. Sono state effettuate 2 prove: per ciascuna la temperatura di digestione è di 30°C e con miscelazione della soluzione; sono stati effettuati dei prelievi da 1 ml ogni 15 minuti. I campioni sono stati subito centrifugati a 15000 g per 20 minuti alla temperatura di 4°C e poi riposti in stufa ad asciugare. La determinazione della purezza è avvenuta tramite

analisi termogravimetrica (*TGA 4000 - Perkin Elmer*) come per gli esperimenti del gruppi precedente.

## **ESPERIMENTI GRUPPO C**

**Obiettivo:** Determinare condizioni migliori per la digestione di *PHA* e ottenere elevato grado di purezza finale.

Per la procedura di estrazione di *PHA* dal pellet prodotto come descritto nel paragrafo 3.2.1, è stato usato un processo di digestione con NaOH seguito da un trattamento con etanolo.

Durante il primo step una frazione di biomassa è stata diluita con acqua fino a concentrazione stabilita e dopo aver raggiunto una buona omogeneità, è stata aggiunta una soluzione di NaOH a concentrazione nota. Il compito dell'idrossido di sodio è quello di rimuovere la parte *NPCM* costituita soprattutto da proteine solubili.

Al termine della digestione i campioni sono stati centrifugati a 15000 g a 4°C per 20 minuti (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012) e successivamente lavati con acqua distillata.

Il secondo step consiste in una successiva digestione della biomassa così ottenuta con una soluzione al 20% (v/v) di etanolo per una durata di 3 ore, la cui azione aumenta di qualche punto percentuale la purezza finale del campione di *PHA* processato. Difatti l'etanolo agisce sulla restante parte di proteine solubili non rimosse durante il primo step (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012). Al termine di questo secondo passaggio si procede ad un'ulteriore centrifugazione del campione nelle medesime condizioni di prima e ad un seguente lavaggio con acqua distillata.

Il campione così ottenuto è messo in stufa ad asciugare e la purezza del polimero è determinata tramite analisi termogravimetrica (*TGA 4000 - Perkin Elmer*).

Durante la sperimentazione sono state effettuate diverse prove variando la temperatura di digestione, le condizioni di miscelazione della soluzione, la concentrazione di partenza della biomassa, la concentrazione della soluzione di NaOH ed infine la durata della digestione con l'idrossido di sodio.

### ESPERIMENTO 1: Variazione della temperatura di digestione e della miscelazione della soluzione

Per questa prova si è scelto di utilizzare una concentrazione della soluzione di NaOH di 0,1 N, una concentrazione iniziale della biomassa pari a 20 g/L per una durata della digestione di 1 ora (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012). La miscelazione della soluzione è stata effettuata con ancoretta magnetica.

L'obiettivo dell'esperimento è stabilire quali siano i migliori valori dei parametri variati tali da consentire una buona purezza del polimero finale.

**TABELLA 3-3: ESPERIMENTI GRUPPO C-1, VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA DELLA DIGESTIONE E MISCELAZIONE DELLA SOLUZIONE**

<b>C biomassa (g/L)</b>	<b>C NaOH (N)</b>	<b>t digestione (h)</b>	<b>T digestione (°C)</b>	<b>Mix digestione (rpm)</b>
20	0,1	1	4	750
			4	NO
			30	750
			30	NO

Tutte le condizioni sono state ripetute due volte in modo da avere una maggiore affidabilità dei risultati.

L'analisi termogravimetrica dei campioni ottenuti ha evidenziato una maggiore purezza del polimero la cui digestione avveniva a 30°C e senza miscelazione della soluzione. Tuttavia bisogna sottolineare che i campioni non miscelati sono stati centrifugati due volte al termine della digestione con NaOH. Difatti, dopo la prima centrifugazione il surnatante appare molto concentrato e questo induce a pensare che siano presenti una gran quantità di *PHA* al suo interno che andrebbero persi eliminando il surnatante e pertanto si otterrebbe un recupero basso. Solo dopo la seconda centrifugazione il surnatante appare limpido. Per tali motivi **si è deciso di diminuire la velocità della miscelazione durante la digestione a 100 rpm** e non di eliminarla completamente. Pertanto per i successivi esperimenti la condizione adottata è stata temperatura di 30 °C e miscelazione 100 rpm.

### ESPERIMENTO 2: Variazione della concentrazione iniziale di biomassa

La concentrazione della soluzione di NaOH utilizzata è di 0,1 N e la temperatura di digestione così come la miscelazione della soluzione sono quelli determinati dall'esperienza 1. La durata della digestione è sempre di 1 ora.

L'obiettivo di tale prova è quello di determinare un range di concentrazione entro il quale ottenere una elevata purezza del polimero.

**TABELLA 3-4: ESPERIMENTI GRUPPO C-2, VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI BIOMASSA**

<b>C biomassa (g/L)</b>	<b>C NaOH (N)</b>	<b>t digestione (h)</b>	<b>T digestione (°C)</b>	<b>Mix digestione (rpm)</b>
10				
20				
50	0,1	1	30	100
100				
150				
200				

Tutte le condizioni sono state ripetute due volte in modo da avere una maggiore affidabilità dei risultati.

L'analisi dei differenti campioni alla TGA ha evidenziato come tra 150 e 200 g/L la purezza tenda a diminuire di qualche punto percentuale e pertanto per i successivi esperimenti si è scelto di procedere con una concentrazione pari a 50 g/L per i cui campioni si è riscontrata una purezza praticamente identica a quella dei polimeri a 20 g/L.

### ESPERIMENTO 3: Variazione della concentrazione della soluzione di NaOH e durata della digestione

La concentrazione della biomassa, la temperatura di digestione e il grado di miscelazione della soluzione sono quelli determinati nei due esperimenti precedenti. Nella prima parte dell'esperimento la durata della digestione è di 1 ora a concentrazione di NaOH variabile.

Obiettivo di questa fase è quello di constatare se cambiando la concentrazione della soluzione di NaOH, la purezza del polimero subisce variazioni considerevoli. Difatti un risparmio di

NaOH è coerente con i principi di sostenibilità e *green economy* discussi nell'introduzione e a cui questo elaborato fa riferimento.

**TABELLA 3-5: ESPERIMENTI GRUPPO C-3, VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLA SOLUZIONE DI IDROSSIDO**

<b>C biomassa (g/L)</b>	<b>C NaOH (N)</b>	<b>t digestione (h)</b>	<b>T digestione (°C)</b>	<b>Mix digestione (rpm)</b>
50	0,1	1	30	100
	0,05			

Tutte le condizioni sono state ripetute due volte in modo da avere una maggiore affidabilità dei risultati.

L'analisi dei campioni alla *TGA* mostra come anche con concentrazione di idrossido di sodio inferiore a 0,1 N la purezza del polimero sia piuttosto elevata pertanto tale approccio potrebbe essere approfondito per esperimenti futuri.

Nella seconda parte della prova mentre la concentrazione della biomassa, la temperatura di digestione, il grado di miscelazione e la concentrazione della soluzione di idrossido di sodio sono quelli determinati negli esperimenti 1, 2, 3, si è variata la durata della digestione.

Rispetto alle prove precedenti qui variano le modalità con cui è stata condotta la digestione: difatti il procedimento è stato diviso in due step di 30 minuti ciascuno. Dopo aver diluito la biomassa con acqua distillata è stata sottoposta ad una prima fase digestiva di 30 minuti al termine della quale i campioni sono stati centrifugati a 15000 g per 20 minuti a 4°C e poi sottoposti ad una seconda fase digestiva della stessa durata. Al termine di questa seconda fase si è proceduto come descritto per gli esperimenti del gruppo A.

Lo scopo di quest'ultimo esperimento è quello di verificare se una variazione del tempo e delle modalità del processo digestivo è in grado di aumentare la purezza finale del polimero.

**TABELLA 3-6: ESPERIMENTI GRUPPO C-3, VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI IDROSSIDO E DURATA DELLA DIGESTIONE**

<b>C biomassa (g/L)</b>	<b>C NaOH (N)</b>	<b>t digestione (h)</b>	<b>T digestione (°C)</b>	<b>Mix digestione (rpm)</b>
50	0,1 ----- 0,05	1 (30 min + 30 min)	30	100

Tutte le condizioni sono state ripetute due volte in modo da avere una maggiore affidabilità dei risultati.

I campioni utilizzati rivelano un grado di purezza praticamente identico rispetto al procedimento canonico di digestione pertanto è conveniente utilizzare quest'ultimo in quanto più veloce e maggiormente diffuso.

Inoltre, bisogna sottolineare, che alla concentrazione di 150 g/L la variazione della modalità di digestione come descritto, conduce ad un buon livello di purezza paragonabile agli altri risultati ottenuti pertanto potrebbe essere un aspetto da indagare nelle sperimentazioni future.

## **ESPERIMENTI GRUPPO D**

**Obiettivo:** Aumentare la purezza del polimero finale attraverso un pretrattamento con acido.

Per la procedura di estrazione di *PHA* dal pellet prodotto come descritto nel paragrafo 3.2.1, è stato usato un processo di digestione con NaOH preceduto da un pretrattamento con acido e seguito da un trattamento con etanolo.

Durante il primo step una frazione di biomassa con concentrazione pari a 50 g/L è stata diluita con acqua e dopo aver raggiunto una buona omogeneità, è stata aggiunta una soluzione di acido a concentrazione nota. Durante tale pretrattamento la temperatura della soluzione è stata mantenuta ad 80°C e la miscelazione effettuata con ancorotta magnetica a 100 rpm.

Al termine di tale prima fase della durata di 2 ore, i campioni sono stati centrifugati a 15000 g per 20 minuti a 4°C e successivamente sottoposti a digestione con NaOH 0,1 N per 1 ora alla temperatura di 30°C e miscelati (condizioni migliori determinate con gli esperimenti del gruppo A). Finita la digestione i campioni sono stati centrifugati a 15000 g a 4°C per 20 minuti



(Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012) e successivamente lavati con acqua distillata.

Il terzo step consiste in una successiva digestione della biomassa così ottenuta con una soluzione al 20% (v/v) di etanolo per una durata di 3 ore, la cui azione aumenta di qualche punto percentuale la purezza finale del campione di *PHA* processato. Si procede infine ad un'ulteriore centrifugazione del campione nelle medesime condizioni di prima e ad un seguente lavaggio con acqua distillata.

Il campione così ottenuto è messo in stufa ad asciugare e la purezza del polimero è determinata tramite analisi termogravimetrica come per le prove precedenti.

Durante la sperimentazione sono state effettuate diverse prove variando il tipo di acido utilizzato, la temperatura del pretrattamento e la sua durata.

#### ESPERIMENTO 1: Variazione del tipo di acido utilizzato

Gli acidi utilizzati sono stati il solforico largamente diffuso sia per applicazioni di laboratorio che per usi industriali e poi i due acidi organici, lattico e acetico, prodotti anche durante il metabolismo anaerobico di molte specie batteriche, pertanto il loro recupero e riutilizzo ben si sposa con i principi di un'economia sostenibile capace di ridurre gli scarti.

**TABELLA 3-7: ESPERIMENTI GRUPPO D-1, PRETRATTAMENTO CON ACIDI ORGANICI E INORGANICI**

C biomassa (g/L)	Tipo di acido	C acido (N)	t pretratt (h)	T pretratt (°C)
50	Solforico	0,1	2	80
	Lattico			
	Acetico			

L'analisi alla *TGA* del polimero finale ha rilevato come il pretrattamento con acido solforico abbia aumentato la purezza dello stesso di qualche punto percentuale.

#### ESPERIMENTO 2: Variazione della temperatura e della durata del pretrattamento

Stabilito che l'utilizzo dell'acido solforico durante il pretrattamento prima della digestione con NaOH, conduce ad un aumento della purezza del polimero finale, si è deciso di diminuire la temperatura dello stesso così come la sua durata in modo da accorciare i tempi del processo.

**TABELLA 3-8: ESPERIMENTI GRUPPO D-1, PRETRATTAMENTO CON ACIDO SOLFORICO E VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA E DELLA DURATA DELLO STESSO**

C biomassa (g/L)	Tipo di acido	C acido (N)	t pretratt (min)	T pretratt (°C)
50	solforico	0,1	15	80
				30

Tutte le condizioni sono state ripetute due volte in modo da avere una maggiore affidabilità dei risultati.

L'analisi termogravimetrica dei campioni ha evidenziato come un contributo fondamentale sia dato non tanto dalla durata del pretrattamento quanto dalla sua temperatura. Difatti i campioni processati a 30 °C hanno una purezza inferiore rispetto a quelli processati a 80, mentre vi è una differenza minima dei campioni a 80 °C processati per 15 minuti e per 2 ore.

### 3.3 Metodi analitici

#### 3.3.1 Determinazione del peso secco della biomassa

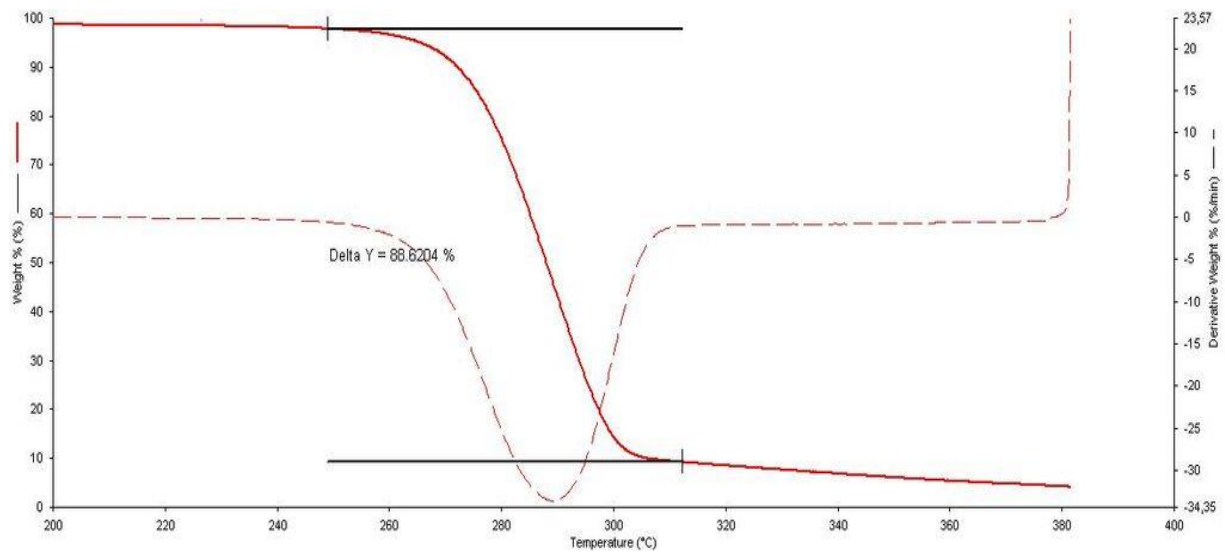
Per determinare il peso secco della biomassa, ossia analizzare il contenuto di umidità nella biomassa fresca, si è utilizzato un *Moisture Analyzer Ohaus MB 45*.

Un campione di peso inferiore a 0,5 g della sostanza di interesse viene riposto nel crogiolo dello strumento e pesato da una bilancia elettronica la quale circonda l'elemento riscaldante. L'analisi avviene alla temperatura di 120°C finché non si raggiunge un peso costante.

#### 3.3.2 Determinazione della purezza dei PHA

La purezza del campione di PHA asciugato in stufa è stata determinata attraverso l'analisi termogravimetrica eseguita con *TGA 4000 – Perkin Elmer*. Lo stesso strumento è stato utilizzato per misurare la quantità di PHA nella biomassa prodotta al termine della fermentazione in *fed-batch*.

Il campione, avente un peso compreso tra 8-20 mg, è stato riposto nel crogiolo di una termobilancia a sua volta posta in un forno. Il programma di temperatura impostato è quello da 150°C a 400°C con una velocità di riscaldamento pari a 10°C/min. Per spurgare il forno e prevenire l'ossidazione del campione è stato utilizzato un flusso di azoto. Il risultato dell'analisi viene espresso solitamente con un termogravigramma che riporta in ascissa la temperatura e sulle ordinate la variazione di massa come valore assoluto o percentuale che rappresenta la nostra purezza.



**FIGURA 3-2: TERMOGRAVIGRAMMA TGA, IL DELTA Y RAPPRESENTA IL VALORE DI PUREZZA DEL POLIMERO**

## 3.4 Strumentazione

### 3.4.1 Moisture Analyzer

L'analizzatore di umidità determina la massa secca rimanente dopo un processo di essiccaimento con energia infrarossa della materia preventivamente pesata. Quindi, l'umidità viene calcolata in funzione del peso della materia umida. Durante il processo di essiccaimento la diminuzione di umidità nel materiale viene visualizzata sul display. L'analizzatore di umidità è un dispositivo ideale per determinare l'umidità e la quantità di sostanza secca, nonché la

consistenza delle sostanze volatili e fisse con elevata precisione. Esso viene utilizzato principalmente nel settore industriale per analizzare paste, legno, materiali adesivi e polveri per la produzione e il controllo dei materiali.



FIGURA 3-3:MOISTURE ANALYZER

### 3.4.2 TGA – Analisi Termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica è un metodo di analisi termica in cui le variazioni di proprietà fisiche e chimiche dei materiali sono misurate in funzione di un aumento della temperatura (con velocità di riscaldamento costante), o come una funzione del tempo (con temperatura costante e/o perdita di massa costante)

La *TGA* è comunemente utilizzata per determinare le caratteristiche di materiali che presentano sia perdita che aumento di massa a causa della decomposizione, dell'ossidazione, o della perdita di sostanze volatili. Le applicazioni più comuni della *TGA* sono la caratterizzazione dei materiali attraverso l'analisi dei modelli caratteristici, studi di meccanismi di degrado e cinetica di reazione, determinazione del contenuto organico in un campione e determinazione di materiale inorganico (ad esempio cenere) contenuto in un campione. Si tratta di una tecnica particolarmente utile per lo studio dei materiali polimerici termoplastici, termoindurenti, elastomeri, compositi, film plastici, fibre, rivestimenti e vernici.

La strumentazione utilizzata per la termogravimetria è composta da quattro parti:

- una bilancia termica;
- un forno;
- un sistema di gas di spurgo che assicura un ambiente inerte o reattivo a seconda del caso;

- un computer per il controllo dello strumento.

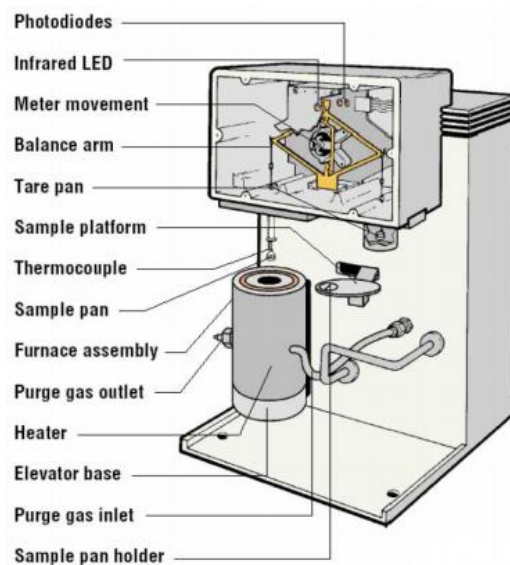


FIGURA 3-4: SCHEMATIZZAZIONE TGA

Le bilance disponibili per tali tipi di analisi hanno range operativo compreso tra 5-20 mg, anche se per esigenze specifiche ci sono bilance che arrivano fino a 100 g. Nella termobilancia il campione è posto nel forno, mentre il resto è isolato termicamente. Una variazione di massa del campione produce una deflessione del giogo che va a interporre un otturatore tra la lampada ed uno dei due fotodiodi. La conseguente variazione di corrente del fotodiodo viene amplificata e inviata ad una bobina situata tra i poli di un magnete permanente. Il campo magnetico generato dalla corrente nella bobina riporta il giogo nella sua posizione originale. La corrente amplificata dai fotodiodi viene misurata e tradotta in massa o perdita di massa tramite il sistema di elaborazione.

Il forno opera solitamente nel range compreso tra temperatura ambiente e 1500 °C, con una velocità di riscaldamento che può essere variata da poco più di zero fino a 200 °C al minuto. Solitamente vengono utilizzati azoto o argon per spurgare il forno e prevenire l'ossidazione del campione. In altri casi si può anche alimentare ossigeno se si vogliono studiare fenomeni di ossidazione. La presenza, all'interno del forno, di un'atmosfera inerte favorisce la decomposizione del campione, che altrimenti verrebbe ostacolata dalla saturazione dell'ambiente.

## 4. RISULTATI

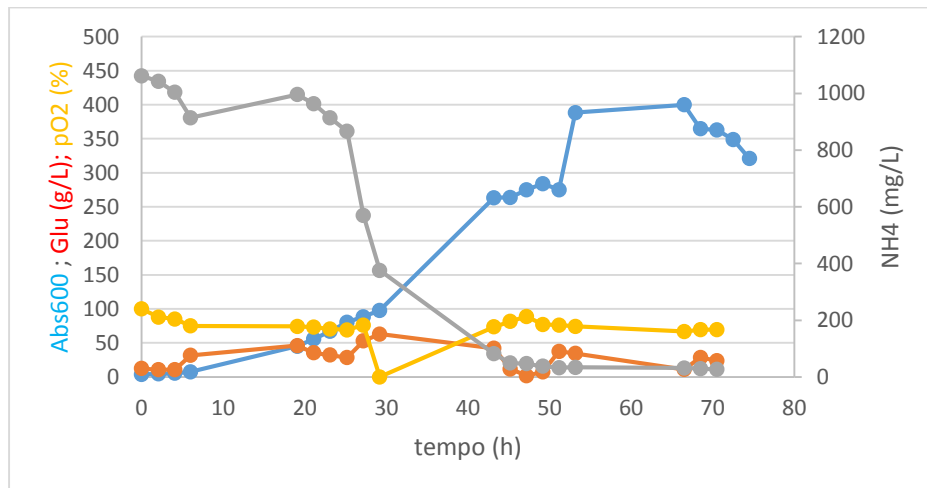
Nel seguente capitolo si riportano i risultati ottenuti durante le prove descritte nel capitolo 3.

### 4.1 Produzione e accumulo di *PHA*

Durante la prima fase di accumulo e produzione di *PHA* da parte del microrganismo si nota come ad una contemporanea diminuzione della quantità di azoto, corrisponda un aumento della biomassa prodotta espressa come valore di assorbanza a 600 nm. Infatti sulla base del consumo di ammonio, identifichiamo le condizioni per le quali il microrganismo non si stia duplicando ma accumuli *PHA* in assenza di tale composto limitante. Quando anche la concentrazione di glucosio comincia a diminuire fino a tendere a zero, allora si nota una diminuzione dell'assorbanza proprio perché il microrganismo comincia ad utilizzare il *PHA* accumulato come fonte di carbonio ed energia.

Di seguito si riportano i valori di concentrazione di glucosio, azoto, concentrazione di biomassa espressa come assorbanza a 600 nm e la pressione dell'ossigeno all'interno del reattore durante la coltivazione in *fed-batch* del microrganismo per ottenere l'accumulo di *PHA*.

**CDW:** Cell Dry Weight



**FIGURA 4-1:** ANDAMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO, PRESSIONE DI OSSIGENO, CONCENTRAZIONE DELLA BIOMASSA ESPRESSA IN TERMINI DI ASSORBANZA E CONCENTRAZIONE DELLO IONE AMMONIO DURANTE IL FED-BATCH.

**TABELLA 4-1: CARATTERISTICHE DELLA BIOMASSA AL TERMINE DELLA PRODUZIONE IN FED-BATCH**

<b>C finale cellule (g CDW/L)</b>	<b>C finale PHA % (g PHA/ g CDW)</b>	<b>C finale glucosio (g/L)</b>	<b>C finale NH<sub>4</sub> (mg/L)</b>	<b>P finale O<sub>2</sub> (%)</b>
60	77	0	70	70

#### 4.1.2 Determinazione del peso secco della biomassa

Di seguito si riportano i risultati ottenuti durante le prove per la determinazione del peso secco della biomassa effettuate con Moisture Analyzer.

**CFW:** Cell Fresh Weight

**CDW:** Cell Dry Weight

**TABELLA 4-2: DETERMINAZIONE DEL PESO SECCO DELLA BIOMASSA**

<b>CFW (g)</b>	<b>CDW (g)</b>	<b>CDW/CFW</b>
0,534	0,287	53,7%
0,511	0,224	43,8%
0,502	0,217	43,2%
0,517	0,229	44,3%
0,525	0,233	44,4%
<b>MEDIA</b>		<b>43,9% ±0,5</b>

## 4.2 Purificazione e recupero

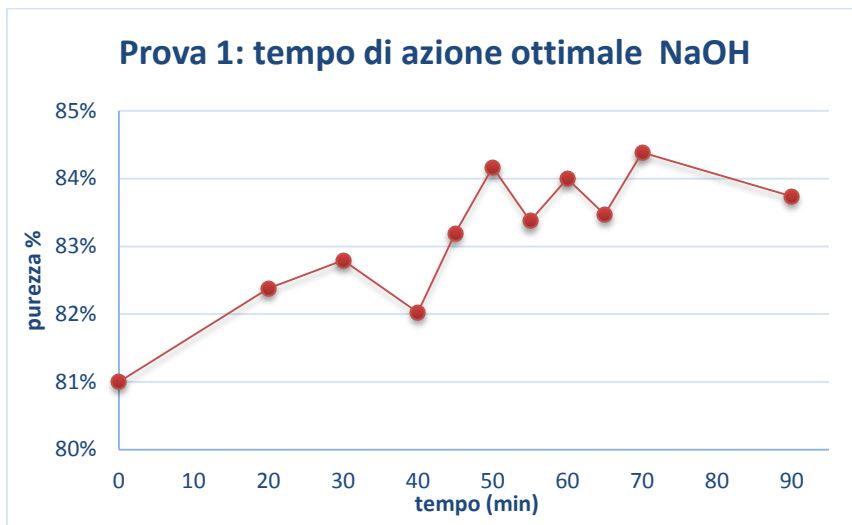
### ESPERIMENTI GRUPPO A

**Obiettivo:** Valutare tempo di azione ottimale dell'NaOH sul polimero per ottenere elevata purezza

La concentrazione della biomassa è di 50 g/l mentre quella di NaOH è 0,1 N, la temperatura di digestione è 30 °C e con miscelazione della soluzione.

Si riportano i grafici e le tabelle delle prove effettuate considerando il valore medio tra le due prove.

**PROVA 1**



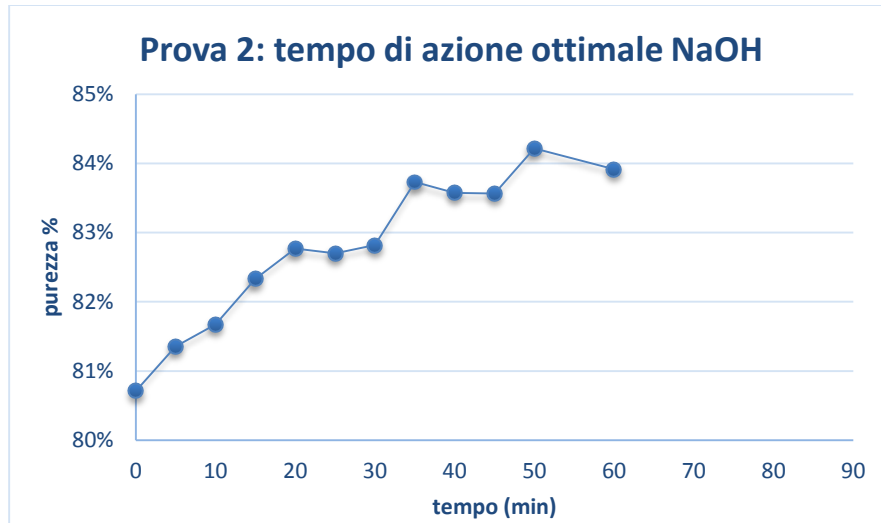
**FIGURA 4-2: VALUTAZIONE TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO DI SODIO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE LA DIGESTIONE**

**TABELLA 4-1: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-1 PER LA STIMA DEL TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO DI SODIO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE LA DIGESTIONE**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Purezza (%)</b>
0	81,0 ± 0,0
20	82,4 ± 0,8
30	82,8 ± 1,0
40	82,0 ± 0,1
45	83,2 ± 0,1
50	84,2 ± 0,6
55	83,4 ± 0,7
60	84,0 ± 0,3
65	83,5 ± 0,5
70	84,4 ± 0,4
90	83,7 ± 0,3



## PROVA 2



**FIGURA 4-3: VALUTAZIONE TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO DI SODIO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE LA DIGESTIONE**

**TABELLA 4-2: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO A-1 PER LA STIMA DEL TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO DI SODIO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE LA DIGESTIONE**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Purezza (%)</b>
0	80,7 ± 0,3
5	81,4 ± 0,2
10	81,4 ± 0,6
15	82,3 ± 0,4
20	82,8 ± 0,9
25	82,7 ± 0,8
30	82,8 ± 0,3
35	83,7 ± 0,7
40	83,6 ± 1,1
45	83,6 ± 0,8
50	84,2 ± 1,4
60	83,9 ± 0,7

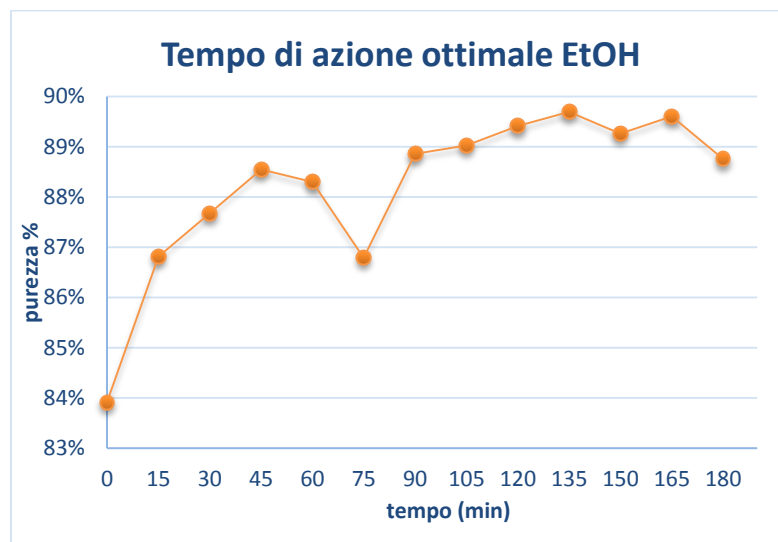
È evidente come, se pur con delle oscillazioni, il valore della purezza del polimero aumenti nel tempo grazie all'azione dell'idrossido di sodio.

## ESPERIMENTI GRUPPO B

**Obiettivo:** Valutare tempo di azione ottimale dell'etanolo sul polimero per avere purezza più elevata

La concentrazione della biomassa è di 50 g/l mentre quella di NaOH è 0,1 N, la temperatura di digestione è 30 °C e con miscelazione della soluzione. La concentrazione di etanolo è pari al 20% (v/v) e la biomassa è stata trattata per 3 ore.

Si riportano il grafico e la tabella delle prove effettuate considerando il valore medio tra le due prove.



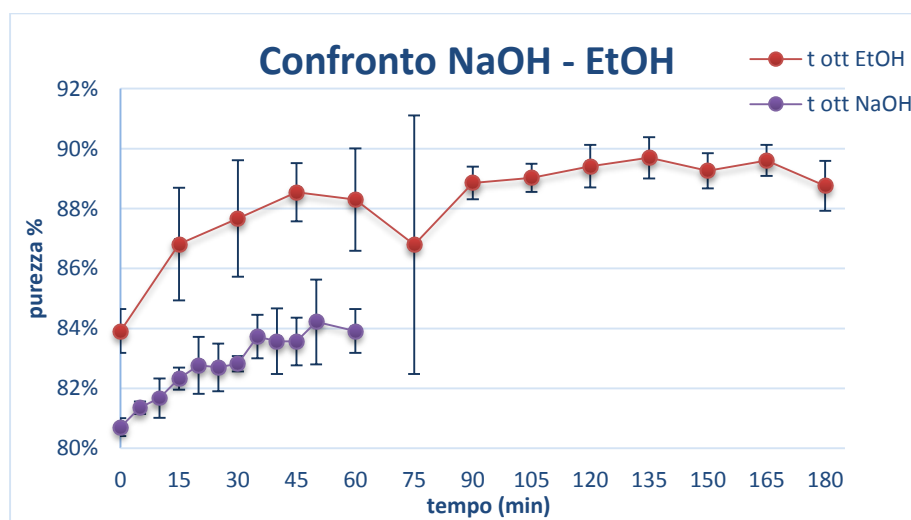
**FIGURA 4-4:** VALUTAZIONE TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'ETANOLO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE IL TRATTAMENTO

**TABELLA 4-3: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO B-1 PER LA STIMA DEL TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'ETANOLO IN SEGUITO ALLA MISURAZIONE DELLA PUREZZA DEL POLIMERO DURANTE IL TRATTAMENTO**

Tempo (min)	Purezza (%)
0	83,9 ± 0,7
15	86,8 ± 1,9
30	87,7 ± 1,9
45	88,5 ± 0,1
60	88,3 ± 1,7
75	86,8 ± 4,3
90	88,9 ± 0,5
105	89,0 ± 0,5
120	89,4 ± 0,7
135	89,7 ± 0,7
150	89,3 ± 0,6
165	89,6 ± 0,5
180	88,8 ± 0,8

Si nota come l'impiego dell'etanolo faccia aumentare la purezza del polimero di alcuni punti fino ad arrivare al 90%.

Di seguito si mostra un confronto tra le prove per la valutazione del tempo di azione ottimale di idrossido ed etanolo.



**FIGURA 4-5: CONFRONTO DEL TEMPO DI AZIONE OTTIMALE DELL'IDROSSIDO E DELL'ETANOLO. DURANTE IL TRATTAMENTO CON L'ALCOL LA PUREZZA AUMENTA FINO AL 90%.**

## ESPERIMENTI GRUPPO C

**Obiettivo:** Determinare condizioni migliori per la digestione di *PHA* e ottenere elevato grado di purezza finale.

Nelle tabelle seguenti si riportano i valori medi di purezza e recupero delle prove effettuate descritte nel capitolo 3.

Il recupero,  $\eta$ , è stato calcolato nel modo seguente:

$$\eta = \frac{CDW \times Purezza}{CFW \times \frac{CDW}{CFW} \times C_{0,PHA}}$$

Il valore di purezza del polimero è ottenuto dal termogravigramma mentre  $C_{0,PHA}$  è la concentrazione di *PHA* al termine della fermentazione calcolata anch'essa con analisi termogravimetrica.

### ESPERIMENTO 1: Variazione della temperatura di digestione e della miscelazione della soluzione

**TABELLA 4-4: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-1 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA E DELLA MISCELAZIONE DELLA SOLUZIONE**

C bio-massa (g/l)	C NaOH (N)	t digestione (h)	T digestione (°C)	Mix dig (rpm)	purezza (%wt)	recupero (%wt)
20	0,1	1	30	750	89,2 ± 0,1	86,2 ± 5,2
				NO	89,8 ± 0,8	89,9 ± 6,6
			4	750	86,3 ± 0,0	94,4 ± 5,2
				NO	86,4 ± 0,0	58,1 ± 9,6

I valori di purezza e recupero maggiori sono stati ottenuti nella condizione 30°C e senza miscelazione. Per le prove successive si è adottata la condizione 30°C e miscelazione a 100 rpm per i motivi discussi nel paragrafo 3.2.2.

## ESPERIMENTO 2: Variazione della concentrazione iniziale di biomassa

**TABELLA 4-5: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-2IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI BIOMASSA**

C bio-massa (g/l)	C NaOH (N)	t digestione (h)	T digestione (°C)	Mix dig (rpm)	purezza (%wt)	recupero (%wt)
10					89,2 ± 0,0	90,8 ± 0,3
20					89,2 ± 0,0	86,2 ± 5,2
50	0,1	1	30	100	88,4 ± 1,0	88,1 ± 1,2
100					88,5 ± 0,0	88,8 ± 1,2
150					86,5 ± 0,4	87,4 ± 0,1
200					85,8 ± 1,2	86,9 ± 0,0

Alla concentrazione di 100 g/L si nota una lievissima diminuzione della purezza del polimero mentre tra 150 e 200 g/L il calo percentuale della purezza è più evidente, circa il 3% in meno. Gli esperimenti successivi sono stati condotti con una concentrazione della biomassa pari a 50 g/L.

## ESPERIMENTO 3: Variazione della concentrazione della soluzione di NaOH e durata della digestione

### PROVA 1: Variazione della concentrazione della soluzione di NaOH

**TABELLA 4-6: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-3 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI IDROSSIDO DI SODIO**

C bio-massa (g/l)	C NaOH (N)	t digestione (h)	T digestione (°C)	Mix dig	purezza (%wt)	recupero (%wt)
50	0,1	1	30	100	88,4 ± 1,0	88,1 ± 1,2
	0,05				92,1 ± 0,6	85,1 ± 0,1

Si nota come anche con concentrazione di NaOH pari a 0,05 N si ottengano dei buoni risultati sia per la purezza che per il recupero del polimero pertanto questo approccio potrebbe essere indagato in futuro.

#### PROVA 2: Variazione della durata della digestione a differente concentrazione di NaOH

**TABELLA 4-7: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO C-3 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI IDROSSIDO DI SODIO E DURATA DELLA DIGESTIONE**

<b>C bio-massa (g/l)</b>	<b>C NaOH (N)</b>	<b>t digestione (h)</b>	<b>T digestione (°C)</b>	<b>Mix dig</b>	<b>purezza (%wt)</b>	<b>recupero (%wt)</b>
50	0,1	1 (30min + 30 min)	30	100	88,4 ± 1,0	86,7 ± 2,8
	0,05				89 ± 0,0	86,8 ± 2,9
150	0,1				90,5 ± 0,8	88,7 ± 0,6

Per le prove svolte a concentrazione pari a 50 g/L, variare le modalità della digestione come descritto nel paragrafo 3.2.2, conduce agli stessi valori di purezza e recupero delle prove precedenti. Una maggiore purezza invece è stata osservata per i campioni di biomassa a 150 g/L.

#### **ESPERIMENTI GRUPPO D**

**Obiettivo:** Aumentare la purezza del polimero finale attraverso un pretrattamento con acido.

Nelle tabelle seguenti si riportano i valori medi di purezza e recupero delle prove effettuate descritte nel capitolo 3.

Il recupero,  $\eta$ , è stato calcolato nel modo seguente:

$$\eta = \frac{CDW \times Purezza}{CFW \times \frac{CDW}{CFW} \times C_{0,PHA}}$$

Il valore di purezza del polimero è ottenuto dal termogravigramma mentre  $C_{0,PHA}$  è la concentrazione di PHA al termine della fermentazione calcolata anch'essa con analisi termogravimetrica.

ESPERIMENTO 1: Variazione del tipo di acido utilizzato

**TABELLA 4-8: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO D-1 IN SEGUITO A VARIAZIONE DEL TIPO DI ACIDO UTILIZZATO PER IL PRETRATTAMENTO DELLA BIOMASSA**

<b>PRETRATTAMENTO</b>					
<b>C biomassa (g/l)</b>	<b>Tipo Acido</b>	<b>C Acido (N)</b>	<b>t (h)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Mix (rpm)</b>
50	solforico lattico acetico	0,1	2	80	100
<b>DIGESTIONE</b>					
<b>Tipo Acido PT</b>	<b>t (h)</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Mix (rpm)</b>	<b>Purezza (%wt)</b>	<b>Recupero (%wt)</b>
solforico				95,6%	83,8%
lattico	1	30	100	91,4%	85,8%
acetico				89,1%	83,5%

Si nota come i risultati migliori siano ottenuti utilizzando l'acido solforico per il pretrattamento.

ESPERIMENTO 2: Variazione della temperatura e della durata del pretrattamento

**TABELLA 4-9: RISULTATI ESPERIMENTI GRUPPO D-2 IN SEGUITO A VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA E DURATA DEL PRETRATTAMENTO CON ACIDO SOLFORICO**

<b>PRETRATTAMENTO</b>						
<b>C biomassa (g/l)</b>	<b>Tipo Acido</b>	<b>C Acido (N)</b>	<b>t (min)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Mix (rpm)</b>	
50	solforico	0,1	15	30 80	100	
<b>DIGESTIONE</b>						
<b>Tipo Acido PT</b>	<b>T PT (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Mix (rpm)</b>	<b>Purezza (%wt)</b>	<b>Recupero (%wt)</b>
solforico	30 80	1	30	100	90,4 ± 0,2 94 ± 1,4	77,1 ± 0,5 81,2 ± 1,2

La condizione migliore al fine di ottenere elevati valori di purezza è quella di svolgere il pre-trattamento alla temperatura di 80 °C.



## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 Approccio generale

La produzione e la diffusione della bioplastica si inseriscono nel contesto attuale di crescente preoccupazione per le tematiche che riguardano l'aumento del prezzo del petrolio, la salvaguardia dell'ambiente e la transizione verso un'economia sostenibile.

La plastica viene oggi maggiormente prodotta partendo dalla nafta, miscela di idrocarburi caratterizzata da bassa volatilità derivante dal processo di distillazione del petrolio e contenente una gran quantità di polimeri quali polietilene, polistirene, polipropilene, ecc.

È ormai sapere comune che l'industria petrolifera abbia significativi impatti sociali e ambientali derivanti da incidenti e da attività di routine come l'esplorazione sismica, le perforazioni e gli scarti inquinanti e a questo si affianca, inoltre, la difficoltà dello smaltimento della materia plastica e la sua conseguente dispersione nei rifiuti solidi urbani e nelle discariche.

Pertanto il passaggio verso una plastica non nociva né per l'ambiente né per l'uomo, è una necessità. La cosiddetta bioplastica è un tipo di plastica che deriva da materie prime rinnovabili oppure è biodegradabile o ha entrambe le proprietà (Bioplastic) e il suo utilizzo si pone come obiettivo quello di minimizzare la dipendenza dal petrolio in previsione della diminuzione del numero di giacimenti e quindi della sua disponibilità.

I *PHA* sono tra i migliori candidati per la produzione di bioplastiche grazie alla loro biodegradabilità e biocompatibilità poiché naturalmente presenti all'interno di molti microrganismi in corpi di inclusione intracellulari.

Per la produzione su larga scala, i costi per l'estrazione di *PHA* devono essere i più bassi possibili compatibilmente con un valore della purezza elevata del polimero così come del suo recupero; i costi dipendono innanzitutto dal tipo di metodo utilizzato poiché il processo sarà più economico quanto più il solvente avrà un basso costo.

Scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di definire un processo di *downstream* per il recupero e la purificazione di *PHA* preceduto da una produzione in *fed - batch* del polimero utilizzando come microrganismo un ceppo di *C. necator* (*DSMZ 545*), al fine di ottenere valori di purezza e recupero del polimero elevati.

Tale microrganismo è stato scelto per la sua robustezza e capacità di accumulare una gran quantità di *PHA* durante la sua crescita, al contrario ad esempio dell'*Escherichia Coli*, batterio comunque utilizzato (Efficient and Economical Recovery of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli* by Simple Digestion with Chemicals, 1999) ma modificato geneticamente a tale scopo.

Uno dei metodi maggiormente diffusi per l'estrazione di *PHA* dalla cellula è l'utilizzo di un solvente, basato sul fatto che i *PHA* sono insolubili in acqua ma solubili in un limitato numero di solventi clorurati quali cloroformio e 1,2-diclorometano (*PHA* recovery from biomass, 2013). Tale metodo fornisce un valore di purezza elevato, richiesto ad esempio per le applicazioni in campo medico. Dopo aver rimosso i componenti cellulari tramite centrifugazione, il polimero viene fatto precipitare sfruttando etanolo o metanolo. Con tale trattamento si raggiunge una purezza superiore al 98% (Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, 2001). Pur molto diffuso in laboratorio, questo processo è di scarso successo su scala industriale (Development of a process for the biotechnological large-scale production of 4-hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties, 2001). Infatti il costo del recupero di *PHA* con solvente potrebbe essere fino al 50% superiore rispetto al costo dell'intero processo (Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate, 2001).

Questo alto costo può essere notevolmente ridotto puntando sulla digestione della *NPCM* da parte di un tensioattivo come l'ipoclorito: esso è un forte agente ossidante, che conduce a livelli di purezza del 99% tuttavia è un agente non-selettivo che digerisce oltre alla *NPCM* anche i *PHA*, con conseguente basso recupero e peso molecolare ridotto. (Characterization of poly- $\alpha$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria, 1965).

La purezza, la resa e le dimensioni molecolari sono i fattori principali per il processo di *downstream* di *PHA* e possono essere migliorati utilizzando un agente chimico selettivo per la sola dissoluzione delle cellule non-*PHA* mentre i granuli del polimero vengono lasciati intatti.

L'agente chimico scelto per il processo di digestione è stato l'idrossido di sodio (NaOH) (Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the *PHA* synthase of *Chromobacterium* sp. USM2, 2013) poiché è di facile reperibilità, ha un prezzo basso ed è semplice da smaltire al contrario ad esempio dei solventi alogenati.

La sperimentazione è durata complessivamente 5 mesi durante i quali sono state svolte prove differenti variando i parametri fondamentali del processo.

## 5.2 Esperimenti gruppi A e B: verifica del tempo di azione ottimale di NaOH ed etanolo

Prima di partire con gli esperimenti veri propri variando i parametri del processo, si è proceduto alla verifica del tempo di azione ottimale dell'NaOH e dell'etanolo sulla nostra biomassa.

Dalle prove effettuate con una concentrazione della biomassa pari a 50 g/L, NaOH 0,1 N e tempo di digestione di 1 ora a 30°C e con miscelazione della soluzione, si nota come la purezza del polimero aumenti nel tempo (FIG 4.2, FIG. 4.3), dimostrazione che l'idrossido sta indebolendo la parete cellulare del microrganismo incentivando un rilascio dei granuli di PHA. Allo scadere dell'ora di digestione si nota una lieve diminuzione della purezza, quindi possiamo ipotizzare che l'NaOH cominci ad intaccare il polimero stesso, ed è proprio questo che si vuole evitare.

Pertanto un'ora di trattamento con NaOH, mutuato dai risultati di letteratura (Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2, 2013), sembra essere il tempo ottimale.

Allo stesso modo si nota dalla FIG. 4.4 come l'azione di una soluzione di etanolo al 20% (v/v) per 3 ore sulla biomassa previamente centrifugata e lavata a 15000g per 20 min a 4°C, aumenti di circa il 6% la purezza finale del polimero poiché esso degrada le restanti componenti solubili non digerite durante il primo step (Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2, 2013) e di conseguenza aumenta anche il recupero del polimero.

## 5.3 Esperimenti gruppo C: scelta delle condizioni migliori del processo

I punti focali su cui si è concentrata la sperimentazione per le prove appartenenti a questo gruppo sono stati: a) definire quali fossero le condizioni ottimali da adottare durante il processo

di digestione e b) stabilire i parametri che maggiormente lo condizionano al fine di ottenere valori elevati di purezza e recupero del polimero finale.

Per perseguire questi obiettivi sono state necessarie più prove durante le quali sono state variate la temperatura, la velocità di miscelazione della soluzione durante la digestione, la concentrazione della biomassa e quella di NaOH ed infine le modalità della digestione stessa per quanto riguarda la prima fase del trattamento.

Successivamente alla digestione con NaOH, la biomassa viene sempre trattata con una soluzione di etanolo al 20% (v/v) per una durata di 3 ore.

La scelta dei parametri da variare è stata determinata sulla base degli studi trovati in letteratura: utilizzando un ceppo ricombinato di *C.necator* contenente il 40% iniziale di PHA e sottoponendolo ad una digestione con NaOH 0,1 N per 1 ora, a 4 °C e senza miscelare la soluzione, e successivamente ad un trattamento con etanolo 1% (v/v) per 3 ore, si otteneva una purezza del 74% e un recupero del 79% mentre lo stesso esperimento condotto a 30°C conduceva ad una purezza del 73% e un recupero dell'85% (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012). Si è deciso pertanto di indagare innanzitutto l'influenza della temperatura e della miscelazione durante il processo.

I primi esperimenti hanno evidenziato come la temperatura sia un fattore determinante per la buona riuscita del processo. Difatti, come si evince dalla TAB 4.4, gli esperimenti condotti a 4°C conducono ad una purezza del polimero di circa l'85% contro il 90% riscontrato per la biomassa trattata alla temperatura di 30°C ed anche la quantità recuperata è maggiore a 30°C, in cui abbiamo una media del 90% piuttosto che a 4°C dove ci fermiamo al 76%. Inoltre, non miscelando la soluzione durante il processo digestivo si hanno maggiori valori di purezza in entrambi i casi; la condizione migliore è quella a 30°C e senza miscelazione. Tuttavia, bisogna sottolineare il fatto che i campioni trattati secondo questa ultima modalità siano stati centrifugati due volte al termine della digestione con NaOH. Difatti, dopo la prima centrifugazione il surnatante appariva molto concentrato e questo induce a pensare che sia presente una gran quantità del polimero al suo interno che andrebbe perso eliminando il surnatante stesso e pertanto si otterrebbe un recupero basso. Solo dopo la seconda centrifugazione esso appare limpido. Inoltre, pensando ad un impianto industriale, svolgere due centrifugazioni consecutive aumenta sia i tempi del trattamento *downstream* che i costi di gestione complessivi. Per tali

motivi si è deciso di diminuire la velocità della miscelazione durante la digestione a 100 rpm e non di eliminarla completamente.

Si è partiti con una concentrazione della biomassa pari a 20 g/L (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012) ma avendo la necessità di stabilire se anche il trattamento di frazioni a concentrazione maggiore conducesse agli stessi risultati. Dai dati ottenuti descritti in TAB 4.5, utilizzando sempre NaOH 0,1N e un tempo di digestione di 1 ora, si evince come a 50 g/L il valore medio di purezza sia dell'88,4% così come quello del recupero, e se a 100 g/L si notano solo delle lievi diminuzioni, a 150 e 200 g/L il calo della purezza percentuale è più evidente e si attesta intorno al 3%. Tale fatto può essere giustificato in due modi: 1) il tempo di digestione è troppo breve e l'idrossido di sodio non riesce ad agire su tutta la biomassa per degradare la parte non-*PHA*; 2) la concentrazione dell'idrossido è troppo bassa per la biomassa considerata.

È bene sottolineare che non sono stati trovati studi in letteratura in cui gli esperimenti sono stati condotti ad una concentrazione della biomassa superiore a 50 g/L.

Sulla base di tali considerazioni sono state variate sia la concentrazione di NaOH che le modalità della digestione.

Pur ottenendo dei valori di purezza elevati a 50 g/L con concentrazione di NaOH 0,1N, dai dati di letteratura si notava che a 0,05N di NaOH i risultati sarebbero stati migliori (Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant *Cupriavidus necator* by Using Low Concentration of NaOH, 2012) di sicuro oltre il 90%.

Come si evince dalla TAB. 4.6, per le prove effettuate a 50 g/L e NaOH 0.05 N con tempo di digestione pari a 1 ora, il valore medio di purezza è stato del 92%. Tale risultato perciò, induce a pensare che la concentrazione di 0.1N di idrossido di sodio sia troppo elevata almeno fino a 100 g/L, e che questo non degradi solo la parte non-*PHA* ma anche il polimero accumulatosi nella cellula.

Effettuando invece la digestione in due step di 30 minuti ciascuno (paragrafo 3.2.2 ESPERIMENTO 3), i valori di purezza a 0.1 e 0.05 N di NaOH riportati in TAB. 4.7 sono pressoché identici rispettivamente di 88,4% e 88,7% così come quelli del recupero pari a 89% e 87%. Difatti interrompendo la digestione dopo 30 minuti, quando siamo a metà del processo come si evince dai grafici in FIG. 4.2 e 4.3 degli esperimenti del gruppo A, dopo la centrifugazione

della soluzione e lo scarto del surnatante rimuoviamo la parte *NPCM* su cui l'idrossido ha già agito, facilitando, durante il secondo step, la rimozione dei non-*PHA* dalla cellula. Supportati da tale deduzione, tale procedimento in due step è stato applicato alla biomassa a concentrazione di 150 g/L: il valore di purezza raggiunto è stato del 90% mentre il recupero dell'88% (TAB. 4.7). Pertanto sembra essere confermata la nostra idea iniziale: effettuando la digestione in due fasi consecutive si rimuove la materia già digerita dopo 30 minuti e la successiva aggiunta della soluzione di NaOH fresca, può agire senza impedimenti sulla restante parte solubile rimanente facendo così giungere a valori di purezza e recupero molto più elevati che non la digestione in un'unica soluzione.

## 5.4 Esperimenti gruppo D: pretrattamento con acidi organici e inorganici

Dopo aver definito i valori dei parametri che conducono a migliori risultati di purezza e recupero del polimero, sulla base degli studi di Yu & Chen (Cost-Effective Recovery and Purification of Polyhydroxyalkanoates by Selective Dissolution of Cell Mass, 2006) si è deciso di tentare un nuovo approccio aggiungendo un pretrattamento con un acido (organico e non) prima del vero e proprio processo digestivo.

Difatti è stata osservata una cristallizzazione del granulo di *PHA* indotta dall'acido e la decomposizione in prodotti solubili come monomeri e oligomeri, senza tuttavia intaccare la parte interna del granulo stesso. L'azione dell'acido risulta infatti meno invasiva rispetto a quella dell'idrossido inducendo una minore perdita del peso molecolare del polimero (Cost-Effective Recovery and Purification of Polyhydroxyalkanoates by Selective Dissolution of Cell Mass, 2006). Pertanto tale pretrattamento favorisce la successiva digestione della *NPCM* da parte dell'NaOH portando a dei valori di purezza finale più elevati.

Gli acidi scelti per questa prima fase sono stati il solforico, l'acetico e il lattico. Gli ultimi due sono prodotti anche dalla fermentazione batterica, pertanto il loro utilizzo si inserisce nel quadro di un approccio ecosostenibile che punta al riuso di materiale di scarto di altri processi biotecnologici.

La concentrazione degli acidi è di 0.1 N, il tempo di pretrattamento è di 2 ore e la temperatura a cui viene condotto è pari a 80°C, mentre tutti gli altri parametri sono mantenuti invariati

rispetto alle prove precedenti. Dalla TAB. 4.8 si nota che l'uso dell'acido solforico conduce ad un livello di purezza pari a 95,6% contro il 91,4% del lattico e l'89% dell'acetico; il recupero è invece più simile per tutti e tre i tipi intorno all'83%.

Avendo notato dagli esperimenti precedenti il ruolo fondamentale della temperatura durante il processo digestivo, si è deciso di condurre le successive prove variando tale parametro e diminuendo anche il tempo del pretrattamento da 2 ore a 15 minuti. Si è utilizzato solo l'acido solforico poiché aveva condotto a risultati migliori.

Quello che si evince dai risultati riportati in TAB. 4.9 è che alla temperatura di 80°C si hanno dei valori sensibilmente più elevati di purezza e recupero rispettivamente pari a 94% e 81% contro i 90,5% e 77% delle prove effettuate a 30°C.

Anche in questo secondo caso pertanto una temperatura più elevata conduce ad un risultato migliore confermando quindi i risultati degli esperimenti del gruppo C.

## 6. CONCLUSIONI

La plastica è una materia fondamentale per la produzione di una grande varietà di oggetti di uso comune e non, con peso ridotto e soprattutto a basso costo. D'altro canto, bisogna anche ricordare come la sua produzione e il suo smaltimento abbiano un impatto non trascurabile sulla salute dell'uomo e dell'ambiente.

Grazie al miglioramento continuo delle opzioni nella gestione delle materie plastiche giunte alla fine del ciclo di vita e ad una crescente consapevolezza dei consumatori, la quantità di plastica smaltita in discarica è in costante diminuzione a vantaggio di un riciclo della materia plastica affiancato dal recupero energetico.

Per approfittare dell'intero valore insito nei rifiuti in plastica, è necessario combinare le diverse opzioni di gestione dei rifiuti; le soluzioni variano da un Paese all'altro a seconda delle infrastrutture, della strategia nazionale di gestione dei rifiuti e delle tecnologie disponibili.

Qualsiasi strategia volta a migliorare la gestione del ciclo rifiuti dovrebbe combinare il riciclaggio con il recupero di energia, interrompendo la messa in discarica di materie plastiche e assicurando che il trattamento e il recupero dei rifiuti rispetti definiti standard ambientali.

È in questo contesto che sta acquistando sempre maggiore importanza l'utilizzo della bioplastica: materiali e manufatti, derivanti sia da fonti rinnovabili che di origine fossile, che hanno la caratteristica di essere biodegradabili e compostabili. Il concetto di bioplastica si applica dunque a quei prodotti che nel fine vita garantiscono la riciclabilità organica certificata nei diversi ambienti (es. compostaggio, digestione anaerobica, suolo).

Il presente lavoro di sperimentazione ha avuto come scopo l'allestimento di un processo di *downstream* per la purificazione e il recupero di *PHA* prodotti durante la coltivazione in *fed-batch* del *C.necator* (*DSMZ 545*), attraverso la digestione della biomassa con l'idrossido di sodio e seguita poi da un ulteriore trattamento con etanolo.

Dai risultati ottenuti si possono trarre le seguenti conclusioni:

- la digestione della biomassa con idrossido di sodio e il successivo trattamento con etanolo conducono a buoni livelli di purezza e recupero vicini al 90% fino ad una concentrazione della biomassa trattata pari a 100 g/L;



- i risultati migliori sia per purezza che per recupero sono stati ottenuti conducendo la digestione alla temperatura di 30°C e senza miscelare la soluzione durante il trattamento; la bassa temperatura non ha favorito il grado di depurazione;
- la concentrazione di 0.1N dell'idrossido sembra essere elevata per il trattamento della biomassa fino ad almeno 100 g/L, pertanto per i successivi esperimenti potrebbe essere interessante indagare l'azione dell'NaOH partendo da una concentrazione di 0.05N;
- il pretrattamento con acidi ad una temperatura di 80°C induce un aumento della purezza del polimero del 4% rispetto al solo utilizzo di NaOH ed etanolo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

**Belter, Cussler, Hu. 1988.** *BIOSEPARATION, DOWNSTREAM PROCESSING FOR BIOTECHNOLOGY.* 1988.

**Bioplastic, European.**

*Characterization of poly- $\delta$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria.* **Lundgren, D. G., et al. 1965.** 89, 1965, J. Bacteriol, p. 245-251.

**Comelli, Elena. 2013.** Viaggio nella fabbrica del riciclo della plastica. *Il sole 24 ore.* 2013.

*Cost-Effective Recovery and Purification of Polyhydroxyalkanoates by Selective Dissolution of Cell Mass.* **Jian Yu, Lilian X. L. Chen. 2006.** 2, 2006, Biotechnol. Prog, Vol. 22.

*Development of a process for the biotechnological large-scale production of 4-hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties.* **Gorenflo, V., et al. 2001.** 2001, Biomacromolecules, Vol. 2, p. 45-57.

*Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass.* **Chiara Samori, Marina Basaglia et al. 2014.** 2014, Green Chemistry.

*Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from Cupriavidus necator recombinant harboring the PHA synthase of Chromobacterium sp. USM2.* **Siti Nor Syairah Anis, Nurhezreen Md Iqbal, Sudesh Kumar, Al-Ashraf Amirul. 2013.** 102, 2013, Separation and Purification Technology, p. 111-117.

*Efficient and Economical Recovery of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Recombinant Escherichia coli by Simple Digestion with Chemicals.* **Jong-il Choi, Sang Yup Lee. 1999.** 5, 1999, BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol. 62.

*Efficient Polyhydroxyalkanoate Recovery from Recombinant Cupriavidus necator by Using Low Concentration of NaOH.* **Mitra Mohammadi, 1 Mohammad Ali Hassan, Lai-Yee Phang,1 Yoshihito Shirai, Hasfalina Che Man, Hidayah Ariffin, Al Ashraf Amirul, Siti Nor Syairah. 2012.** 8, 2012, ENVIRONMENTAL ENGINEERING SCIENCE, Vol. 29.

*Enhanced Recovery and Purification of P(3HB-co-3HHx) from Recombinant Cupriavidus necator Using Alkaline Digestion Method.* **Nor Syairah Anis, M. I. Nurhezreen, K. Sudesh, A. A. Amirul. 2012.** 2012, Appl Biochem Biotechnol, Vol. 167, p. 524-535.

**GCR, Associazione Gestione Corretta Rifiuti e Risorse di Parma -. 2011.** Incenerire plastica è soprattutto antieconomico. *ilcambiamento.it.* [Online] 2011.

**Group, Plastic Europe Market Research. 2013.** 2013.

*Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate).* **Chen, G., et al. 2001.** 57, 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol., p. 50-55.

*Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates.* **B. Kunasundari, K. Sudesh. 2011.** 7, 2011, eXPRESS Polymer Letters, Vol. 5, p. 620-634.

*Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate.* **Manfred Zinna, Bernard Witholtb, Thomas Eglia. 2001.** 2001, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 53, p. 5-21.

*PHA recovery from biomass.* **Mohamed H.Madkour, Daniel Heinrich, Mansour A. Alghamdi, Ibraheem I. Shabbaj, Alexander Steinbuchel. 2013.** 14, 2013, BIO MACROMELECULES, p. 2963-2972.

*Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass.* **Martin Koller, Horst Niebelschütz, Gerhart Braunegg. 2013.** 2013, els - journal, Vol. 00, p. 1-14.

*Sustainability of Biobased and Biodegradable.* **Kumar Sudesh, Tadahisa Iwata. 2008.** 5-6, 2008, Clean Journal, Vol. 36, p. 433 – 442.

*Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by Saccharophagus degradans.* **Luis Esteban Alva Munoz, Mark R. Riley. 2008.** 5, 2008, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 100, p. 882-888.

**Yasotha, K., Aroua, M. K., Ramachandran, K. B., & Tan. 2006.** 2006, Biochemistry Engineering Journal, Vol. 30, p. 260-268.

## RINGRAZIAMENTI

Ho sempre pensato che quando ormai mi sarei ritrovata a scrivere i ringraziamenti, allora il mio lavoro sarebbe terminato. In realtà non è così perché ancora devo trovare una copisteria clemente che mi stampi la tesi nel giro di un giorno e perfezionare la mia presentazione, ma siccome conviene sempre vedere il bicchiere mezzo pieno, direi che il grosso è fatto.

In questo caldo pomeriggio di luglio ripercorro tutti gli anni trascorsi sui libri a studiare per la vituperata sessione estiva e la consapevolezza che questa tesi rappresenti l'ultima fatica universitaria, crea una sensazione di gioia mista a malinconia.

Tutti non fanno altro che ripetermi che la vita da studente mi mancherà, che con il lavoro non avrò tempo libero e prima di tornare a casa alle 3 di notte, magari anche un po' alticcia, penserò alle incombenze del giorno dopo che non si ridurranno solo a qualche male post-serata ma saranno le scartoffie da ufficio con occhiatecce del capo annesse.

Eppure credo, che di fianco a questa concezione canonica dello studente, ve ne sia un'altra, più ampia, non rilegata ai banchi di scuola, che coinvolga per lo più un modus vivendi: la voglia di imparare, la curiosità di sapere, l'audacia nel confrontarsi e anche un briciolo di incoscienza, dovrebbero far parte del corredo comportamentale di ogni individuo.

Comincio a ringraziare il professor Lorenzo Bertin che mi ha seguito durante questo lavoro di sperimentazione, capace di trasmettere la passione per la ricerca, sempre gentile e disponibile, quasi come fossi una sua collega, autorevole e preciso.

Ringrazio Gonzalo, metodico, organizzato, perfezionista, che mi ha indicato la via da percorrere per approcciarsi in modo consapevole ad un lavoro di ricerca bibliografico e sperimentale, sempre pronto a chiarire ogni dubbio e a dare un consiglio.

Ringrazio le donne della mia vita, mia madre, mia nonna Teresa e mia zia Lena, esempi di forza, coraggio e leggerezza, in grado di strapparti un sorriso anche nei momenti più bui e sostenerti nelle situazioni più incresciose. E ce ne sono state.

Ringrazio mio fratello per il solo fatto di esserlo. E poi per il frigo vuoto quando tornavo a casa, le liti per l'utilizzo del computer, le delucidazioni di analisi matematica, le chiacchiere in terrazza, la capacità di farmi vedere le situazioni da più prospettive diverse.

Ringrazio le mie amiche di sempre Mariateresa, Irene e Chiara per essermi state vicine con i gesti e non solo con le parole, per essere cresciute e maturate insieme sempre all'insegna della sincerità, e le mie amiche dell'università inteso solo come periodo in cui le ho conosciute, Daniela, Giulia e Lommetta, ottime candidate a diventare amiche di una vita.

Allo stesso modo ringrazio gli amici di sempre Giuseppe e Antonio che anche se distanti hanno sempre trovato un attimo da concedermi e gli amici dell'università Gianni, quasi un secondo fratello, Pj, Paolo e Nic i più bei ingegneri atipici che abbia incontrato.

Infine ringrazio me stessa, per la testardaggine.

So che mio padre ne sarebbe fiero.