

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea magistrale in ANALISI E GESTIONE
DELL'AMBIENTE

**METODOLOGIE "GREEN" PER
L'OTTENIMENTO DI
BIOPOLIMERI DA COLTURE
MICROBICHE**

Tesi di laurea in CHIMICA ORGANICA AMBIENTALE

RELATORE
Prof. Emilio Tagliavini

PRESENTATA DA
Davide Marchi

CORRELATORE

Dott. ssa Chiara Samorì

II sessione

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Poliidrossialcanoati	7
1.2 I surfattanti anionici naturali e i surfattanti switchable	13
1.3 Scopo della tesi	16
2. MATERIALI E METODI	18
2.1 Reagenti	18
2.2 Organismi utilizzati	18
2.3 Dissoluzione della matrice cellulare mediante SAS	20
2.4 Riciclo SAS	21
2.5 Pre-trattamento colture miste	21
2.6 Post-trattamento PHB	22
2.7 Analisi recupero PHB	23
2.8 Analisi elementare	23
2.9 Metapirolisi	25

3. RISULTATI E DISCUSSIONE	26
3.1 Estrazione PHB da <i>Cupriavidus necator</i>	26
3.2 Purezza e peso molecolare	33
3.3 Recupero SAS	34
3.4 Pre-trattamento per colture miste	36
3.5 Post-trattamento per PHB estratto	38
4. CONCLUSIONE	42
5. BIBLIOGRAFIA	44

1. INTRODUZIONE

In questo ultimo mezzo secolo, l'industria delle materie plastiche ha subito uno sviluppo notevole come nessun altro materiale nella storia dell'umanità. Il motivo di questa rapida ascesa è dovuto alla grande versatilità di questi materiali, costituiti da polimeri puri, o miscelati con additivi (coloranti, antiossidanti, lubrificanti), così da dare caratteristiche diverse ed idonee per una vasta gamma di applicazioni⁽¹⁾.

Dal 1907 con la scoperta della bakelite, la prima resina termoindurente sintetica, da parte del chimico belga Leo Baekeland, si apre la cosiddetta "Era della Plastica" che arrivò al suo culmine con la produzione in massa del polietilene (PE) negli anni '50. Il PE $(-C_2H_4-)_n$, prodotto a partire dall'etilene secondo varie procedure tra cui la polimerizzazione ideata da Ziegler e Natta (che vinsero il premio Nobel per tale sintesi), ha ottime proprietà isolanti, è versatile ed economico; grazie a ciò è stato utilizzato per molti prodotti: dall'imballaggio ai tubi, dai giocattoli ai rivestimenti.

Altre materie plastiche sintetiche di grande importanza economico/sociale sono:

- Polietilentereftalato (PET), resina termoplastica utilizzata principalmente per fabbricare contenitori per bevande;
- Polivinilcloruro (PVC), polimero del cloruro di vinile utilizzato per la produzione di tubi, cavi elettrici, finestre, imballaggi;
- Poliaccoppiati (PI), un unico imballaggio costituito in modo strutturale da più imballaggi ed utilizzato come contenitore per alimenti (Tetrapak);
- Polipropilene (PP), un polimero vinilico simile al PE ed utilizzato per la produzione di oggetti di uso comune, come isolante per i cavi elettrici e di tubature per l'acqua.

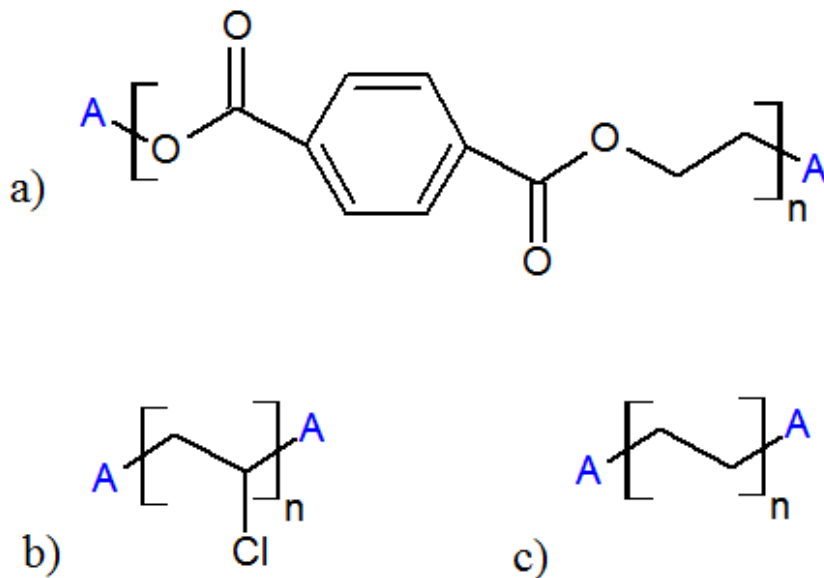


Figura 1.1: Formule chimiche di struttura a) PET b) PVC c) PP

Tutte queste materie plastiche sintetiche non sono biodegradabili in natura. Tuttavia ne esistono alcune che pur essendo sintetiche sono biodegradabili, come il poli(ϵ -caprolattone) (PCL), i poliuretani (PUR), il poli(propilene fumarato) (PPF). Essendo comunque la maggior parte delle materie plastiche sintetiche non degradabili naturalmente, e considerando l'enorme utilizzo, il problema del loro smaltimento alla fine del ciclo di vita ha rappresentato e rappresenta tutt'ora un enorme problema ambientale e socio-economico. Il riciclo è possibile, ma spesso è reso difficoltoso dall'alto costo del processo e dalla varietà dei diversi materiali plastici. Inoltre non va dimenticato che queste plastiche sono ricavate dal petrolio, una risorsa non rinnovabile e quindi in costante diminuzione nel tempo.

A causa di ciò in questi ultimi anni, in molti Paesi è stata avviata la ricerca di nuovi materiali denominati "bioplastiche" che sostituissero le materie plastiche sintetiche più utilizzate e che fossero anche biodegradabili.

Le bioplastiche sono prodotte da materie prime rinnovabili e in genere sono biodegradabili, anche se questa corrispondenza non è sempre biunivoca. Esistono infatti materie plastiche che derivano da fonti naturali che non sono biodegradabili,

come il caucciù vulcanizzato. Nella tabella 1.1 viene riportato il tempo di biodegradazione, espresso in anni, di alcuni tipi di plastica.

Tabella 1.1: Tempo di biodegradabilità plastica

Polimero	Tempo di biodegradazione (anni)
PET	>1000
PVC	>1000
PP	>1000
PCL	5-10
Plastica a base di amido	1-5
PHA	0,5-2

Le materie prime da cui ottenere bioplastiche sono varie (cellulosa, amido, acido lattico, zuccheri...) e impartiscono proprietà diverse ai polimeri risultanti.

Le plastiche a base di amido ad esempio sono quelle attualmente più prodotte. L'amido assorbe facilmente l'umidità, per questo viene trattato con additivi (glicerina e sorbitolo) per renderlo resistente all'acqua e più facilmente lavorabile, senza intaccare la sua biodegradabilità. Una delle bioplastiche più utilizzate al momento è costituita da un "blend" di amido e policaprolattone: tale prodotto, chiamato Mater-Bi®, è prodotto dall'azienda italiana Novamont ed è biodegradabile e compostabile.

1.1 Polioidrossialcanoati

I polioidrossialcanoati (PHA), argomento di questo lavoro di tesi, appartengono alla categoria delle bioplastiche. Sono poliesteri lineari, prodotti da diversi gruppi di batteri gram negativi e gram positivi^(2,3). Essi rappresentano una classe di poliesteri termoplastici molto ampia che comprende più di 100 polimeri ottenuti da diversi monomeri di partenza. I principali polimeri prodotti sono il polioidrossibutirrato (PHB), il polioidrossivalerato (PHV) e il loro copolimero polioidrossibutirrato-co-valerato (Figura 1.2).

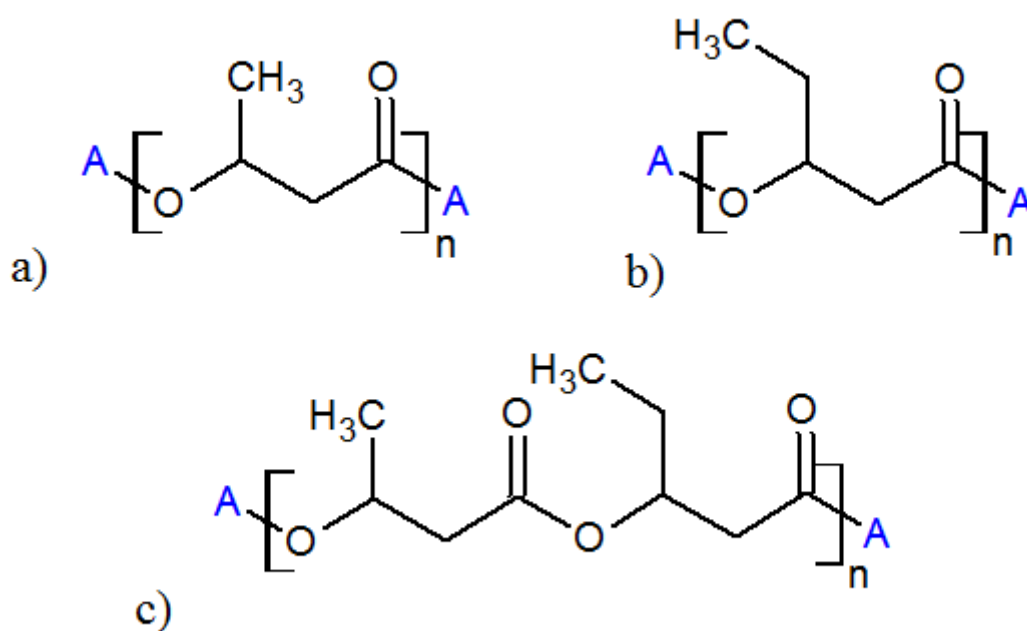


Figura 1.2: Strutture chimiche dei più importanti PHA a) PHB b)PHV c)PHBV

La biosintesi microbica di PHA avviene in condizioni aerobiche in carenza di nutrienti (azoto o fosfati) ed in presenza abbondante di carbonio⁽⁴⁾. Il PHA è prodotto intracellularmente sotto forma di granuli, che possono raggiungere elevate concentrazioni, fino anche il 90% del peso secco della massa batterica⁽⁵⁾. A

seconda del substrato carbonioso fornito dalla coltura microbica si ottengono monomeri di varia lunghezza che vengono combinati insieme per dare i corrispondenti polimeri.

Il ceppo batterico più utilizzato per produrre PHA è *Cupriavidus necator*, detto anche *Ralstonia eutropha*. È un batterio che si può trovare sia nel suolo che in acqua. Questo batterio ha un grande potenziale nell'ambito di tecnologie di biorisanamento, in quanto è in grado di degradare un gran numero di composti aromatici clorurati e sostanze inquinanti chimicamente correlate. È un batterio gram-negativo, ha una buona mobilità ed è aerobio facoltativo, cioè può vivere sia in ambienti aerobici che anaerobici. Possiede due flagelli e due membrane cellulari e ha la forma di un'asta. Per la sopravvivenza richiede un ambiente non alofilo e una temperatura di circa 30°C.

Importante caratteristica di questi batteri è quella di produrre PHA in assenza di nutrienti usando glucosio o altre piccole molecole contenenti carbonio.

La biosintesi di PHA inizia con la condensazione di due molecole di acetil-CoA da parte dell'enzima β -ketotiolasi (PhaA) per dare acetoacetil-CoA. L'acetoacetil-CoA riduttasi, un'enzima NADPH-dipendente, catalizza la riduzione dell'acetoacetilCoA all' isomero R del 3-idrossibutirril-CoA, successivamente polimerizzato in PHA dalla PHA sintetasi (PhaC)⁽⁶⁾(Figura 1.3).

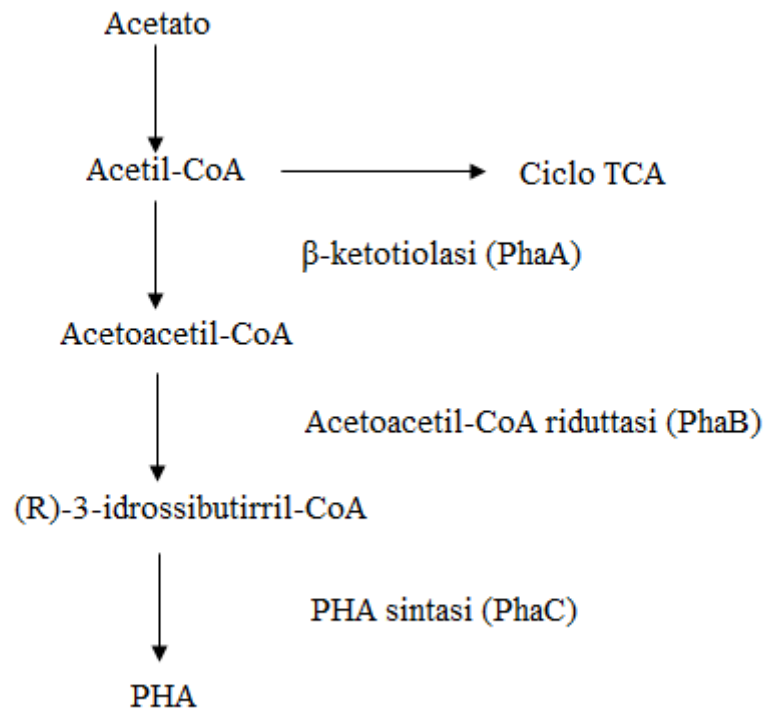


Figura 1.3: Via metabolica per la biosintesi dei PHA

I PHA possono essere prodotti anche dalle colture batteriche miste utilizzate nel trattamento delle acque reflue. Questo tipo di ambiente ha condizioni spesso variabili⁽⁷⁾, a causa di ciò questi microorganismi si sono evoluti per adattarsi rapidamente ai cambiamenti delle condizioni di disponibilità di nutrienti e a diversi tipi di substrato. Le colture miste sono quindi capaci di immagazzinare PHA come riserva energia per sopravvivere alle condizioni instabili derivanti da un regime di alimentazione discontinuo. Questo fa sì che siano più competitivi rispetto ad altri microorganismi⁽⁹⁾. Le colture miste accumulano PHA fino a circa il 50% del loro peso a secco in condizioni aerobiche. Anche se la quantità di PHA è minore rispetto alle monospecie, essi non richiedono specifici substrati, ed essendo più resistenti possono crescere in ambienti non sterili (al contrario delle monospecie che richiedono strette condizioni di sterilità).

In letteratura non ci sono molti articoli che trattano delle colture miste, gli studi vengono fatti principalmente sulle monoculture che hanno caratteristiche omogenee tra loro. Inoltre ancora non ci sono aziende che optano per l'utilizzo di queste comunità microbiche miste, vista l'incertezza dell'intero processo produttivo.

Il PHB è il poliidrossialcanoato più studiato nonché uno dei pochi PHA prodotti ad oggi a livello industriale. Ha proprietà fisiche simili al polipropilene⁽⁸⁾:

- È insolubile in acqua ma prontamente biodegradabile sia in acqua che in suolo;
- Ha una buona permeabilità all'ossigeno;
- Ha una buona resistenza agli ultravioletti;
- È biocompatibile, cioè non provoca nessun effetto dannoso alle funzioni vitali degli organismi con cui entra in contatto.

Il PHB disponibile commercialmente può essere usato per lo stampaggio ad iniezione, per rivestimenti in carta e per formatura per estrusione⁽⁹⁾. I prodotti creati potrebbero ricoprire un vasto range di applicazioni: posate e piatti, imballaggi (borse, scatole, schiume), teli da pacciamatura agricola, prodotti per la cura personale (rasoi, spazzolini), oggetti da ufficio, giocattoli e oggetti per la casa. Grazie alla buona performance del PHB in termini di biocompatibilità nel tessuto umano, potrebbe essere anche utilizzato in campo medico per il rilascio controllato dei farmaci, suture chirurgiche, produzione di valvole cardiache^(10,11).

Nella tabella 1.2 sono mostrate le più importanti aziende produttrici di PHA con il prezzo al kg e la produzione annua⁽¹²⁾.

Tabella 1.2: Prezzo e produttività annua delle maggiori aziende produttrici di PHA

Nome del prodotto	Tipo di PHA	Azienda	Prezzo	Produzione (t/y)
Biomer	P(3HB) ^a	Biotechnoly Co., Germania	3-5 €/kg	50
Biocycle	P(3HB)	PHB Industrial S/A company, Brasile	/	60
Biogreen	P(3HB)	Mitsubishi GAS Chemical, Giappone	2,5-3 €/kg	60.000
Biopol	P(3HB-co-3HV) ^b	Metabolix, USA	3-5 €/kg	1100
ENMAT	P(3HB-co-3HV)	Tianan Biologic Material, Cina	/	10.000
Nodax	P(3HB-co-3HHx) ^c	Procter & Gamble, USA	2,5 €/kg	50.000

^a P(3HB), poli(3-idrossibutirrato)

^b P(3HB-co-3HV), poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato)

^c P(3HB-co-3HHx), poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato)

Ad oggi le applicazioni di questo polimero sono limitate dal costo di produzione. Il processo di crescita (lavorare in condizioni sterili) e il costo del substrato possono rappresentare fino a metà del costo di produzione^(13,14).

Un altro fattore che incide sul costo finale del materiale è il processo di recupero. Il PHA infatti è insolubile in quasi tutti i solventi organici tranne quelli clorurati, noti per la loro pericolosità ambientale e la loro tossicità, come il cloroformio, cloruro di metilene, 1,2-dicloroetano⁽¹⁵⁾.

Per rispondere a queste problematiche ambientali, nel corso degli ultimi anni, la ricerca in questo campo è stata indirizzata verso lo sviluppo di metodologie più “green”. Sono stati testati solventi meno pericolosi, come 1,2-propilene carbonato o l’acetato di etile, ma l’utilizzo di grandi quantità di solvente, la bassa qualità del polimero estratto (ridotto peso molecolare) e l’applicabilità per specifiche tipologie di PHA (utilizzabili solo per polimeri con monomeri a catena lunga) non fanno dei solventi testati idonee alternative⁽¹⁶⁾.

Sono state sperimentate anche metodologie di recupero senza solventi, basate sulla distruzione della matrice cellulare non polimerica (NPCM). Tuttavia anche queste metodologie non sono esenti da problematiche. La digestione con ipoclorito di sodio ad esempio comporta l’estrazione di un polimero poco puro e il problema dello smaltimento in ambiente dell’ipoclorito⁽¹⁷⁾; il trattamento termico delle biomasse seguita da digestione enzimatica, processo troppo oneroso per il costo degli enzimi; e la rottura delle cellule mediante surfattanti o acidi/basi^(18,19). Il trattamento con i solventi clorurati rimane comunque quello col maggior rendimento, soprattutto in termini di purezza; per questo motivo c’è bisogno di identificare una classe di sostanze con rendimenti simili all’estrazione coi solventi, ma economicamente ed ambientalmente sostenibili.

1.2 I surfattanti anionici e i surfattanti switchable

I surfattanti sono sostanze che hanno la proprietà di abbassare la tensione superficiale di un liquido, agevolando la bagnabilità delle superfici o la miscibilità tra liquidi diversi. In genere sono composti organici con una “testa” polare e una “coda” apolare. Si dividono in quattro classi:

- Non ionici, come i derivati poliossietilenici degli acidi grassi o gli APG (alchil-poli-glucosidi);
- Anionici, cioè sali costituiti da lunghe catene di atomi di carbonio, terminanti con un gruppo carbossilato, solfato o solfonato;
- Cationici, cioè sali con la parte positiva costituita da lunghe catene di atomi di carbonio terminanti con un gruppo ammonio quaternario;
- Anfoteri, sono zwitterioni (molecola neutra con cariche localizzate) e si comportano, a seconda del pH della soluzione, da acidi o basi.

Il problema principale dei surfattanti, soprattutto nei processi di estrazione del PHB da matrici batteriche, è il recupero. Infatti sono molecole molto solubili in acqua e vengono utilizzate in grandi quantità, comportando elevati costi di recupero e problemi nel trattamento delle acque reflue⁽¹²⁾.

Negli ultimi anni nell'ambito della ricerca scientifica si è affermato l'interessante concetto di molecole (solventi, surfattanti, additivi) switchable. I solventi switchable ad esempio, grazie all'aggiunta e alla rimozione di CO₂ possono cambiare le loro proprietà da idrofobiche a idrofile.

Nello specifico, nei surfattanti switchable, la proprietà fisica di idrofilia/idrofobia può cambiare in modo diretto (“on” e “off”) tramite l'applicazione di un innesco come il cambiamento di luce⁽²⁰⁾, di pH⁽²¹⁾ e tramite agenti redox^(22,23).

I surfattanti switchable sono classificati in cationici e anionici.

I surfattanti cationici switchable (SCS) hanno una “testa” formata principalmente da gruppi ammidina o guanidina, con caratteristiche e range di applicazioni diversi. Purtroppo la loro sintesi non è sempre semplice, e prevede l’utilizzo di composti chimici costosi e non molto ambientalmente compatibili. ^(22,24).

I surfattanti anionici switchable (SAS) si comportano come surfattanti emulsio-stabilizzanti nella loro forma anionica (A^-), in assenza di CO_2 e in soluzione basica; mentre aggiungendo CO_2 si convertono nella loro forma neutra (HA), che non è in grado di stabilizzare emulsioni. Rimuovendo CO_2 si inverte la reazione.



\leftrightarrow = aggiunta di innesco

I SAS non sono mai stati utilizzati per l’estrazione di PHA. In letteratura, Ceschi E. et al. ⁽²⁵⁾ hanno utilizzato vari SAS, tra cui il sodio –(ottilossi) benzoato, il sodio 2-nitro-4-((ottilossi) carbonil) fenolato e il laurato di sodio (Figura 1.4) per pulire le sabbie contaminate da petrolio, ottenendo ottimi risultati (95% di rimozione del petrolio dalla fase acquosa a 50°C).

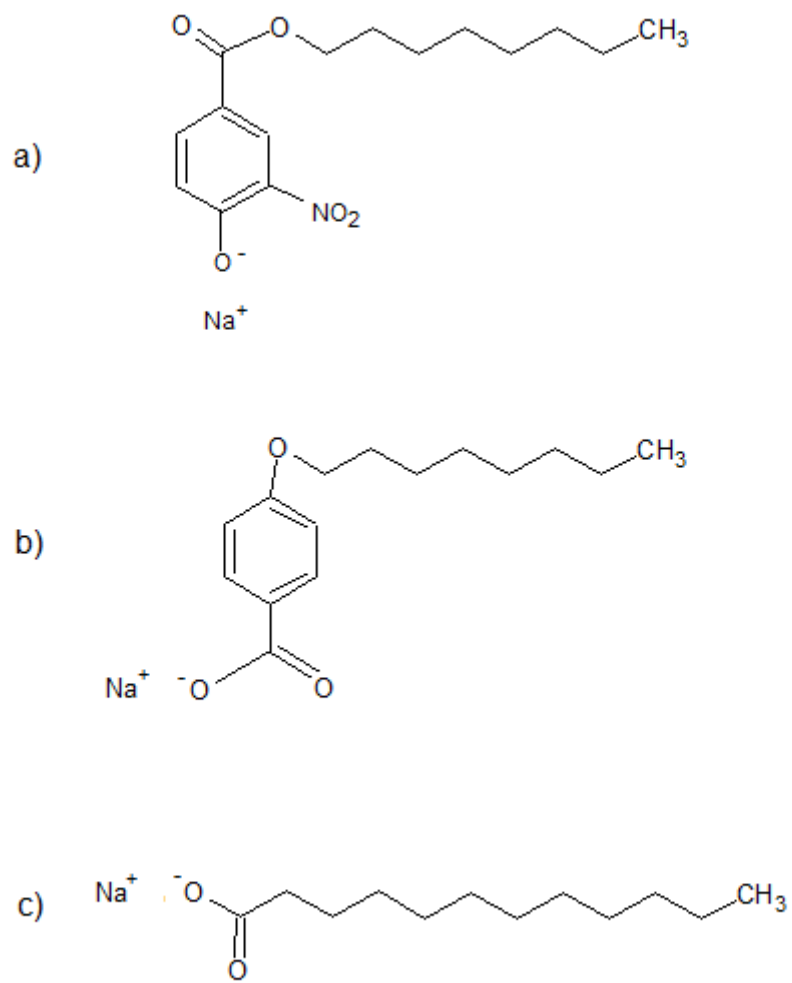


Figura 1.4: Struttura chimica a) 2-nitro-4-((ottilossi) carbonil) fenolato b) sodio -((ottilossi) benzoato c) laurato di sodio

1.2 Scopo della tesi

Questa tesi si propone di studiare nuovi metodi per l'estrazione dei PHB da colture microbiche, sia singole (*Cupriavidus necator*) che miste.

L'obiettivo principale è quello di utilizzare e sviluppare processi che siano economici da un punto di vista della produzione e sostenibili con l'ambiente seguendo i principi della Green Chemistry. Nello specifico lo scopo è minimizzare l'impatto ambientale che i metodi attualmente in uso nel processo di estrazione hanno. Infatti finora tutti i metodi di estrazione di PHB prevedono un uso eccessivo di sostanze (spesso tossiche) non riciclabili e quindi un aumento significativo di rifiuti. Inoltre queste sostanze hanno un costo economico non indifferente.

Il prevenire la formazione dei rifiuti è uno dei principi su cui la Green Chemistry si basa. Infatti questo "strumento" si propone di prevenire l'inquinamento ed i suoi effetti modificando sia la chimica del prodotto sia il suo processo di produzione chimica. Altri punti della Green Chemistry, che in questo lavoro sono stati rispettati sono quelli dell'uso di prodotti chimici non tossici e riciclabili; infatti per una produzione sostenibile è importante che la maggior parte dei reagenti utilizzati non solo non diventino rifiuti tossici, ma che con poche e veloci trasformazioni possano essere riutilizzati.

In particolare, è stato messo a punto un nuovo protocollo di estrazione basato sull'utilizzo di SAS, sfruttando la loro peculiarità di "cambiare forma" mediante l'aggiunta e la rimozione di CO₂, reagente economico, non tossico e disponibile in grandi quantità. Grazie a ciò, i SAS possono essere riutilizzati più e più volte, abbattendo così i costi e i problemi ambientali di smaltimento.

Inoltre sono stati messi a punto nuovi protocolli di pre-trattamento per esplorare l'utilizzo delle colture microbiche miste come produttrici di biopolimeri. La loro capacità di utilizzare differenti tipi di substrato e di adattarsi a varie condizioni ambientali li rende importanti dal punto di vista della facilità di crescita (non c'è bisogno di sterilità) e dal punto di vista economico (utilizzano substrati economici). Al momento però non ci sono molti studi che riguardano l'estrazione

di PHB da colture miste, perché più resistenti rispetto alle monospecie ai vari trattamenti; in questo lavoro di tesi, sono state testate varie opzioni di pre-trattamento già riportate in letteratura e si è provato a sviluppare un protocollo basato sulla fotocatalisi del nano-TiO₂ in presenza di luce UV (utilizzato come antibatterico) per cercare di indebolire le pareti e membrane cellulari e facilitare l'estrazione del polimero.

Il nano-TiO₂, in soluzione acquosa, assorbe le radiazioni UV e produce radicali ossidrilici OH⁻. Questi potrebbero attaccare la superficie della membrana batterica indebolendola o decomponendola, facilitando il successivo trattamento con surfattanti o solventi.

Infine è stato messo a punto anche un post-trattamento al fine di eliminare eventuali impurezze presenti sul polimero estratto (eventuali impurezze potrebbero impedire l'utilizzo del polimero per alcune applicazioni, specialmente quelle biomediche), utilizzando il nano-TiO₂ supportato su tessuti.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti

Tutti i solventi e i reagenti utilizzati in questo lavoro sono stati forniti da Sigma-Aldrich (purezza $\geq 98\%$) e sono stati utilizzati senza purificazione. Il P(3HB) commerciale è stato fornito dalla Biomer (DE).

2.2 Organismi utilizzati

In questo lavoro di tesi è stato scelto il batterio *Cupriavidus necator* DSM 545 contenente alte quantità di PHA. *C.necator* è stato fornito dai laboratori di Padova, ed è stato cresciuto sotto diversi regimi alimentari, affinché producesse diversi PHA: omo-polimero P(3HB), co-polimero P(3HB-co-4HB), co-polimero P(3HB-co-3HV) (Figura 2.1).

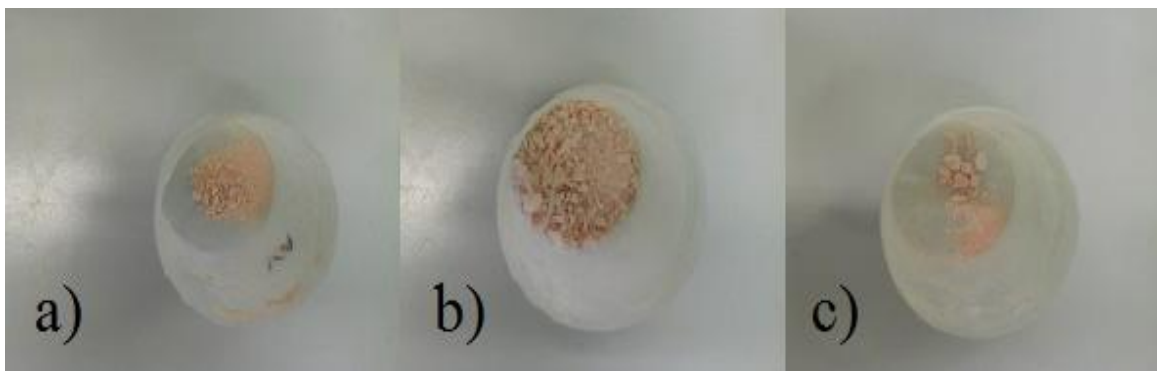


Figura 2.1: *C.necator* a) P(3HB-co-3HV) b) P(3HB-co-4HB) c) P(3HB).

In tabella 2.1 sono mostrate le quantità di substrato e i corrispondenti polimeri ottenuti (quantità e tipologia).

Tabella 2.1: Substrato necessario alla crescita di *C.necator* e contenuto polimerico in base al substrato

Polimero prodotto	Substrato 1	Substrato 2	Contenuto polimero
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Glucosio (30 g L ⁻¹)	Acido valerico (1 g L ⁻¹)	54±2 wt% (3HB/3HV 80/20)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	Glucosio (30 g L ⁻¹)	Acido idrossibutirrico (1,1 g L ⁻¹)	64±1 wt% (3HB/4HB 90/10)
P(3HB)	Glucosio (30 g L ⁻¹)	/	74±2 wt% P(3HB)

^a Il contenuto polimerico delle varie tipologie di *C.necator* è stato determinato estraendo con CH₂Cl₂ (5 mL) per tre ore a 60°C su 200 mg di batterio.

L'estrazione di PHB è stata fatta anche su colture microbiche miste, ottenute da fanghi attivi provenienti dall'impianto di trattamento di acqua a Ravenna. A questi batteri sono stati sottoposti cicli di eccesso/carenza di nutrienti, in modo da far produrre biopolimeri.

La quantità media di PHB presente in queste colture miste è di circa il 16 wt% (Figura 2.2) (misurata tramite metapirólisi a 300°C per 20 minuti).



Figura 2.2: Biomassa batterica mista liofilizzata

2.3 Dissoluzione della matrice cellulare mediante SAS

È stato aggiunto NH_4OH (0,93 mmol, 100 μL , 33% NH_3 in H_2O) ad una sospensione di acido laurico (125 mg, 0,625 mmol) in 3 mL di acqua. A $\text{pH}\approx 10$ l'acido carbossilico passa dalla forma dissociata o neutra (insolubile in acqua) a quella dissociata o ionica (solubile in acqua).

Alla soluzione è stato aggiunto 50 mg di *C.necator*.

La miscela è stata scaldata a 90°C per tre ore in un bagno a silicone. Dopodiché è stata centrifugata a 4000 rpm per 15 minuti. Il PHB, rilasciato per effetto della dissoluzione della matrice cellulare non polimerica e depositatosi sul fondo del reattore di estrazione, è stato lavato in EtOH e H_2O e seccato ad 80°C sotto vuoto.

Sono stati fatti diversi esperimenti a condizioni sperimentali variabili: tempo di dissoluzione (1, 2, 3 ore), quantità di acido laurico utilizzato (250, 200, 100 wt% rispetto al peso secco del batterio), estrazione senza acido laurico.

Sono stati testati anche altri SAS: l'acido miristico (100 wt%, 0,44 mmol), l'acido palmitico (100 wt%, 0,39 mmol) e l'acido stearico (100 wt%, 0,35 mmol).

Ed infine sono state testate anche due diverse basi oltre al NH_4OH : imidazolo (2 mmol) e il 1,5-diazabicyclo(5.4.0)undec-5-ene (DBU) (2 mmol). Nella tabella 2.2 sono state riassunte tutte queste condizioni.

Tabella 2.2: Condizioni sperimentali dei vari trattamenti

Tipologia Polimero	Tempo di Dissoluzione	Tipo di surfattante	Tipo di base
- P(3HB-co-3HV)	- 1 ora	- Acido laurico	- NH_4OH
- P(3HB-co-4HB)	- 2 ore	- Acido miristico	- Imidazolo
- P(3HB)	- 3 ore	- Acido palmitico	- DBU
		- Acido Stearico	

2.4 Riciclo SAS

Alla soluzione NH₄-laurato, pH \approx 10 (NH₄OH (0,93 mmol) in 3 mL di H₂O e 125 mg di acido laurico), è stata aggiunta CO₂ gassosa per un tempo di 10 minuti in modo da far tornare l'acido laurico nella sua forma neutra (pH 7,6). In questa forma, il SAS si è depositato sul fondo, ed è stato facilmente recuperato tramite centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti, lavato in H₂O e seccato in stufa a vuoto (80°C).

2.5 Pre-trattamento colture miste

Per l'estrazione di PHB dalla biomassa di batteri misti, ottenuta liofilizzando le colture miste, sono stati testati dei pre-trattamenti in modo da indebolire la membrana cellulare ed estrarre più facilmente i granuli di PHB.

Sono stati provati pre-trattamenti meccanici utilizzando l'omogenizzatore e il sonicatore ad ultrasuoni (Figura 2.3), risultati attivi su colture monospecie ^(26,27).

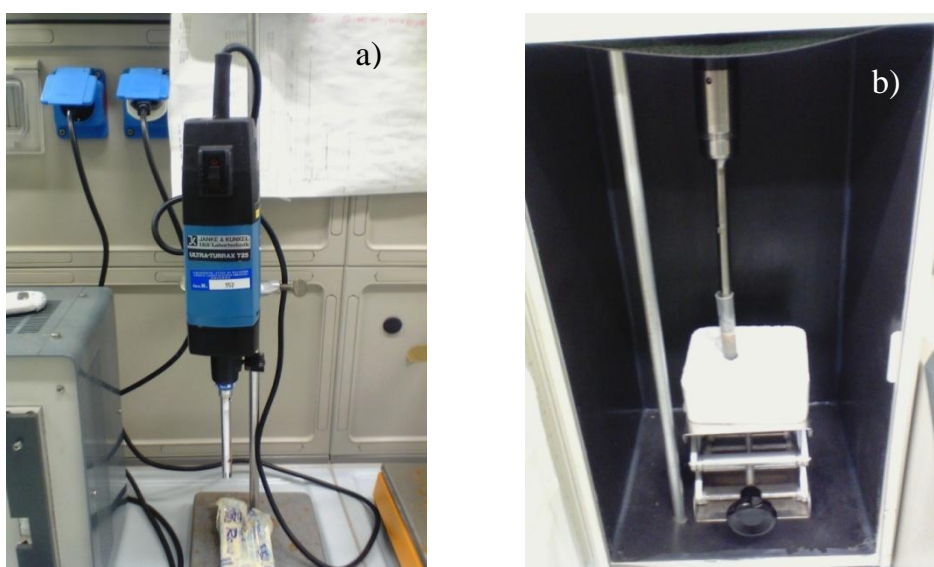


Figura 2.3: a) Omogenizzatore b) Sonicatore ad ultrasuoni

Nel primo trattamento meccanico una provetta contenente 1 g di biomassa mista umida è stata messa in un omogenizzatore (Ultra-Turrax T25) a 25.000 rpm a cicli di 5 minuti per un tempo totale di 30 minuti. Dopodiché è stato estratto il polimero tramite CH_2Cl_2 (3 ore, 60°C).

Nel secondo trattamento meccanico una provetta contenente 100 mg di biomassa mista secca, 2,7 g di sfere di quarzo e 5 mL di H_2O è stata messa in un sonicatore ad ultrasuoni (Sonicator Ultrasonic Processor XL) a cicli di 2 minuti per 30 minuti. Dopodiché è stato estratto il polimero tramite CH_2Cl_2 (3 ore, 60°C).

È stato testato anche un trattamento con nano- TiO_2 in sospensione acquosa 1%. La biomassa è stata messa in piccoli becker con del nano- TiO_2 (2 mL, 1% di nano- TiO_2 in H_2O) sotto una lampada UV (300 watt) per 1, 2, 3, 4, 24 ore. Dopo questo trattamento i campioni sono stati centrifugati e recuperati. Infine è stato estratto il polimero con il metodo dei SAS.

2.6 Post-trattamento PHB

Il PHB estratto da *C.necator* è stato trattato con tessuto di cotone imbevuto di nano- TiO_2 (1%).

In un porta capsule è stato messo un disco di tessuto (cotone) nano- TiO_2 (25 mg) con 2 mL di acqua e 10 mg di biomassa (figura 2.4), sotto una lampada UV per 3 ore. La miscela è stata centrifugata (4000 rpm, 15 minuti) e la parte solida è stata estratta e seccata.

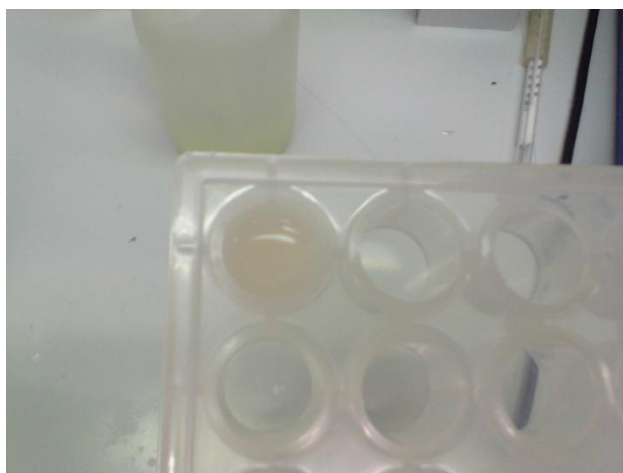


Figura 2.4: Portacapsule con tessuto di nano-TiO₂, H₂O e PHB

2.7 Analisi recupero PHB

Il recupero del PHB estratto dai campioni è stato calcolato come percentuale rispetto alla quantità di polimero presente in *C.necator*, estratto con CH₂Cl₂ a 60°C per 3 ore (Equazione 2.1).

Equazione 2.1: Equazione per il recupero (%) di PHB. PHBa: polimero estratto dal campione PHBb: polimero estratto con CH₂Cl₂

$$X = \frac{PHBa * 100}{PHBb}$$

2.8 Analisi elementare

La composizione elementare del polimero estratto è stata determinata usando un analizzatore elementare CHN (Thermo Scientific, Flash 2000, Organic Elemental Analyzer) mediante la tecnica della flash combustion (Figura 2.5).



Figura 2.5: Analizzatore elementare

2.9 Metapirolisi

È stata utilizzata una nuova tecnica per determinare la quantità di PHA presente nella biomassa, la metapirolisi. Questo metodo utilizza le linee base della pirolisi analitica ma evita l'uso di un pirolizzatore.

È stata determinata, con un gascromatografo, la quantità (Q_{ac}) dei più abbondanti tipi di acido 2-alchenoico (acido crotonico, acido penta-2-enoico, acido esa-2-enoico) formati dalla pirolisi dei corrispondenti monomeri nella catena del polimero. La quantità Q_{ac} è stata calcolata dalla formula:

$$Q_{ac} = Q_{is} * \frac{A_{ac}}{A_{is}}$$

Dove Q_{is} è la quantità (mg) dello standard interno (acido 2-etilbutanoico), mentre A_{ac} e A_{is} sono rispettivamente le aree del GC della somma degli acidi 2-alchenoici e dello standard. Utilizzando la curva di calibrazione ($Q_{PHA} = a(Q_{ac}) + b$) è stato

possibile determinare dalla quantità di 2-acido alchenico il corrispondente di PHA (Q_{PHA}).

In una piastra riscaldata a 300°C viene posto un vial con tappo con 2 mg di campione per 20 minuti.

Al campione poi è stato aggiunto 100 μL di standard (2-etilbutanoico) e 2 mL di acetonitrile; poi è stato analizzato nel gascromatografo 6850 Network GC System (Agilent Technologies, USA). In figura 2.6 sono mostrati i passaggi della meta pirolisi.

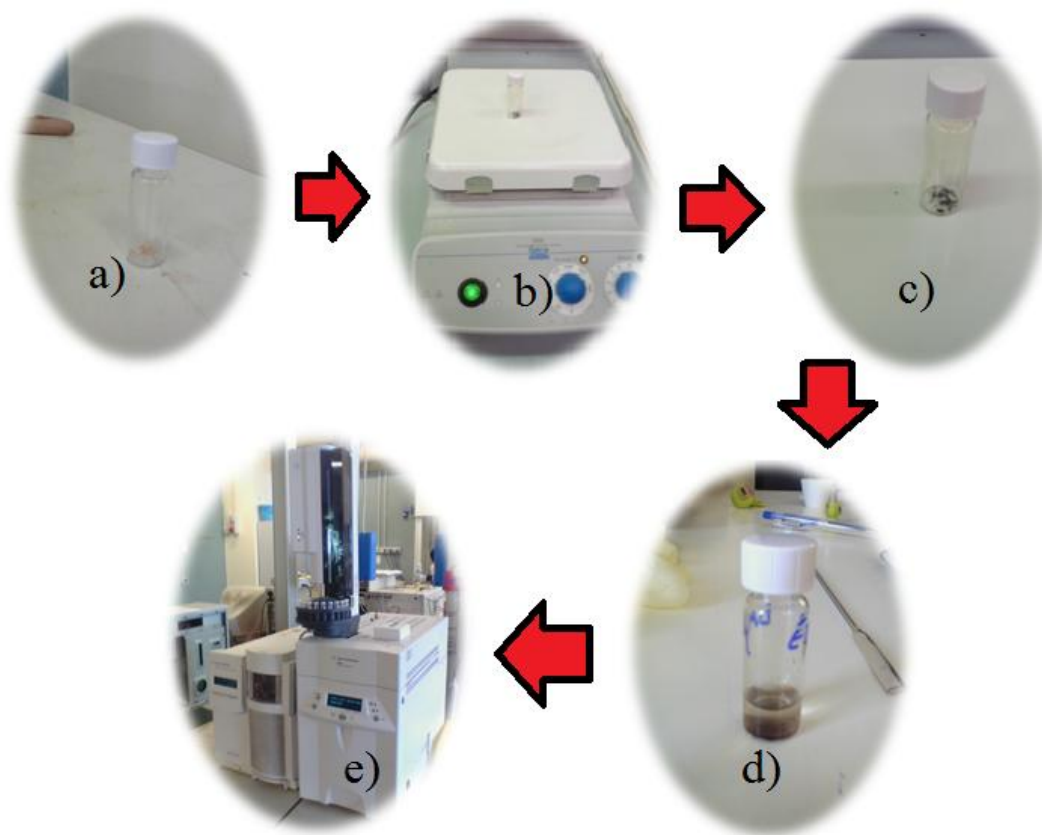


Figura 2.6: Passaggi metapirolisi. a) Campione dentro un vial con tappo b) campione in piastra a 300°C per 20 minuti c) Campione pirolizzato d) Aggiunta di 50 μL di standard e 2 mL di aceto nitrile e) Analisi GC-MS.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Estrazione di PHB da *Cupriavidus necator*

In questo lavoro di tesi sono stati messi a punto nuovi protocolli basati sui SAS per l'estrazione di PHB da *C.necator*.

In letteratura i surfattanti utilizzati per l'ottenimento di PHA sono il sodio dodecil solfato (SDS), il sodio α olefine solfonato (AOS-40), il poliossietilene20 cetil etere (Brij®58), l'acido solfonicoalchibenzene (LAS-99), l'ottilfenossipolietossietanolo (IGEPAL®CA 630). Nella tabella 3.1 sono riassunte le percentuali di recupero e la purezza del polimero estratto con citati questi surfattanti⁽²⁸⁾.

Tabella 3.1: Recupero PHA e purezza polimero tramite l'utilizzo di diversi surfattanti (60°C per 3 ore)

Surfattante	Tipo di surfattante	% Recupero PHA	% Purezza
SDS	Anionico	81±2	90±1
AOS-40	Anionico	87±3	91±2
Brij®58	Non ionico	99±1	83±1
LAS-99	Anionico	87±2	86±0
IGEPAL®CA 630	Non ionico	91±9	86±1

L'estrazione con questi surfattanti ha sia buoni valori di recupero di polimero sia un'elevata purezza di quest'ultimo. Il problema principale di queste sostanze è che non sono riciclabili. Oltretutto la quantità di surfattante utilizzata è molto alta e questo fa sì che vengano prodotti molti rifiuti chimici.

I SAS invece hanno come loro caratteristica quella di essere riciclabili, diminuendo così la produzione di rifiuti.

Come SAS principale è stato utilizzato l'acido laurico, perché economico, biocompatibile e facilmente disponibile.

Il processo di estrazione di PHB da colture microbiche si divide in quattro fasi (Figura 3.1). Nella prima fase la biomassa batterica viene aggiunta ad una soluzione di SAS sciolto in acqua basica ($\text{NH}_4\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$) ($\text{pH} \approx 10$). Il SAS è in grado di promuovere la lisi della membrana cellulare e il PHB, insolubile in acqua, può essere facilmente recuperato tramite centrifugazione. Nella terza fase è stata aggiunta CO_2 gassosa nella miscela rimanente in modo da abbassare il ($\text{pH} \approx 7,6$) e far tornare il SAS nella sua forma neutra, recuperabile tramite centrifugazione.

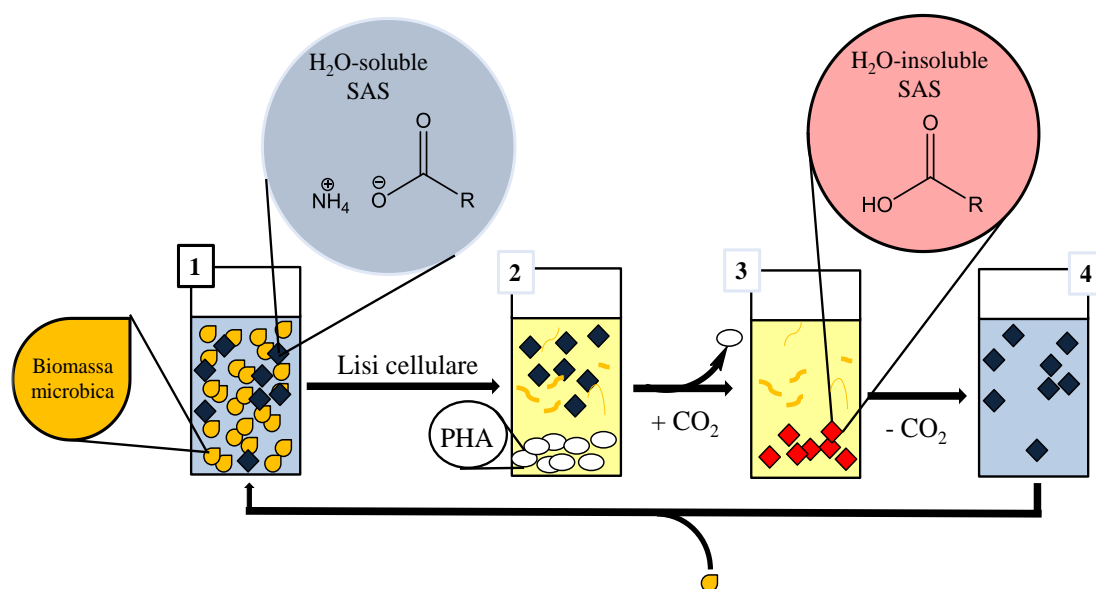


Figura 3.1: Protocollo di estrazione del PHB da colture batteriche.

Seguendo il protocollo descritto nella figura 3.1, i primi esperimenti sono stati condotti confrontando l'utilizzo del sistema SAS NH_4 -laurato con la corrispondente base (NH_4OH) per verificarne l'efficacia nell'estrazione delle varie tipologie di PHA da *C.necator*: omopolimero P(3HB) 74 ± 2 wt% P(3HB), e copolimeri P(3HB-co-4HB) 64 ± 1 wt% (3HB/4HB 90/10) e P(3HB-co-3HV) 54 ± 2 wt% (3HB/3HV 80/20) (Figura 3.2). Alla soluzione contenente NH_4 -laurato e NH_4OH sono state aggiunte le tre tipologie di *C.necator*. I due tipi di trattamento

(con e senza SAS) hanno recuperato circa la stessa percentuale di polimero, che è oltre il 100%; questo perché viene recuperato anche parte del materiale cellulare non PHB (impurezza).

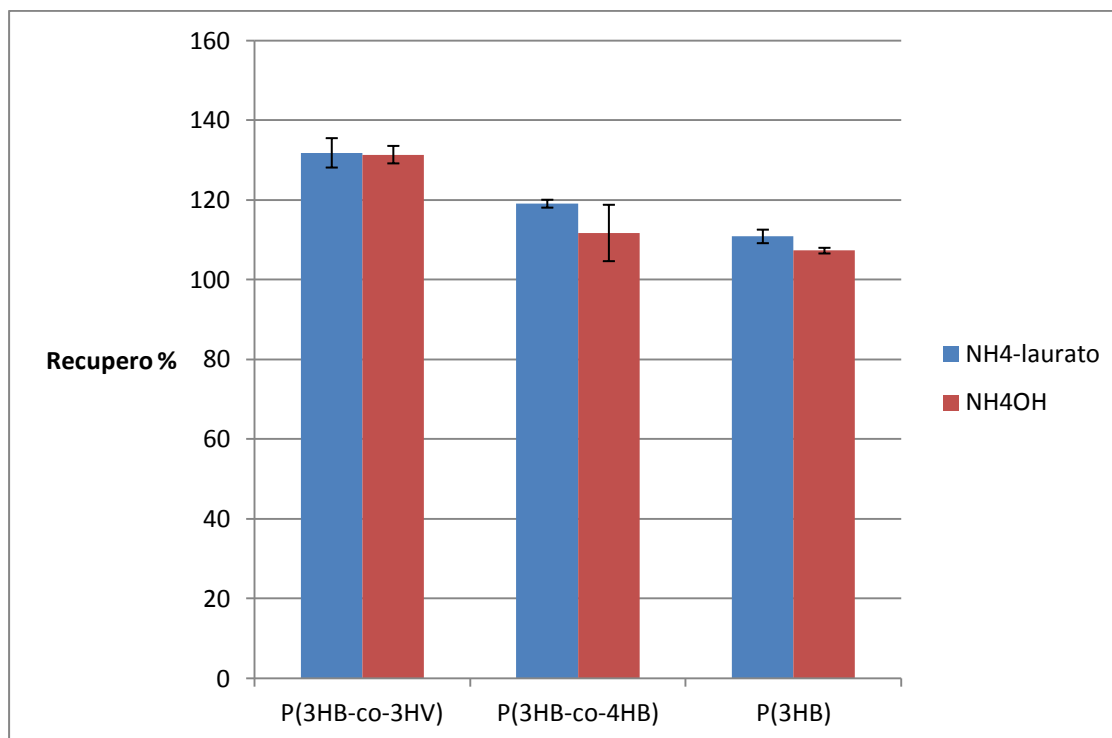


Figura 3.2: Recupero di PHB (espresso in percentuale rispetto alla quantità di PHB contenuto nelle cellule di P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB) e P(3HB)) ottenuto dopo un trattamento di 3 ore con NH₄-laurato e NH₄OH a 90°C.

Dall'analisi elementare possono essere apprezzate le differenze tra i due sistemi di estrazione (Tabella 3.2).

Tabella 3.2: Analisi elementare del P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB), P(3HB) ottenuti dopo un trattamento di 3 ore con NH₄-laurato e NH₄OH.

Trattamento	Polimero	N	C	H	S
NH ₄ -laurato	P(3HB-co-3HV)	0,27±0,16	57,63±1,60	8,06±0,32	0,00±0,00
NH ₄ -laurato	P(3HB-co-4HB)	0,17±0,04	56,67±0,37	7,52±0,14	0,00±0,00
NH ₄ -laurato	P(3HB)	0,10±0,05	56,52±0,43	7,24±0,09	0,00±0,00
NH ₄ OH	P(3HB-co-3HV)	2,23±0,64	59,26±12,53	7,57±1,58	0,00±0,00
NH ₄ OH	P(3HB-co-4HB)	1,39±0,19	52,26±0,29	6,68±0,07	0,00±0,00
NH ₄ OH	P(3HB)	0,91±0,06	53,15±0,44	6,90±0,04	0,00±0,00

Nell'estrazione con solo NH₄OH, il contenuto di N del polimero recuperato (corrispondente ad una contaminazione di materiale proteico) è più alto rispetto all'estrazione col NH₄-laurato. In accordo con la bibliografia⁽²⁹⁾, l'NH₄OH non riesce ad estrarre selettivamente il PHB. Da ciò si evince come l'uso dei SAS sia un buon metodo per l'estrazione di PHB.

Provata l'efficacia dell'utilizzo dei SAS, è stata testata la tempistica ottimale di dissoluzione della NPCM in NH₄-laurato. La miscela NH₄-laurato-batteri (tipologia P(3HB-co-3HV)) è stata lasciata per 1, 2, 3 ore a 90°C.

Questa metodologia è stata confrontata con l'azione del surfattante anionico SDS. (Figura 3.3).

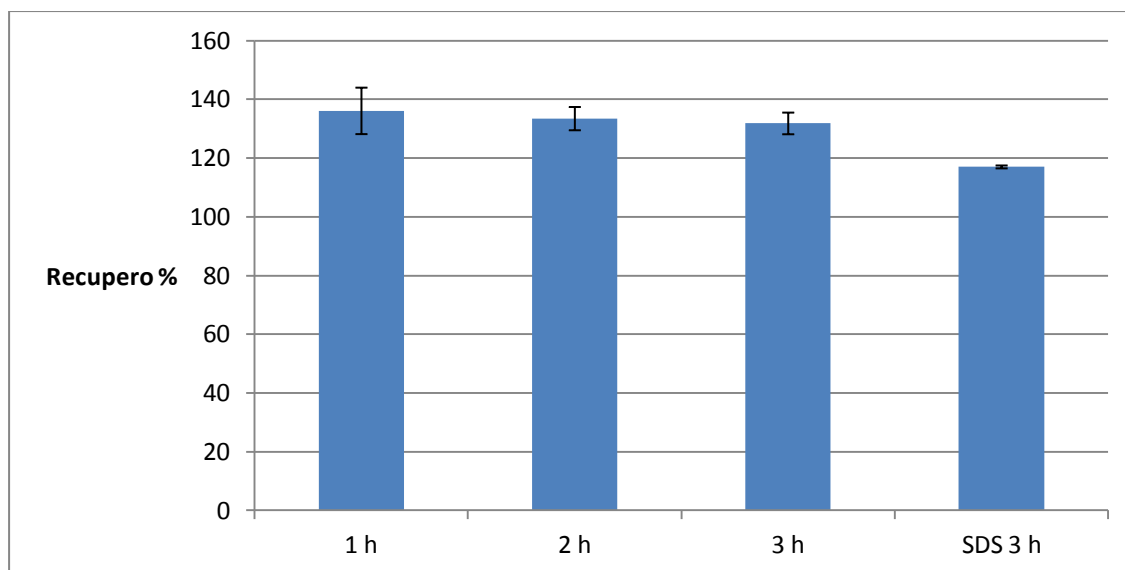


Figura 3.3: Recupero di PHB (espresso in percentuale rispetto alla quantità di PHB contenuto nelle cellule batteriche) ottenuto dopo un trattamento di 1, 2, 3 ore in NH_4 -laurato e SDS

Da questo grafico si comprende che l'estrazione con NH_4 -laurato è alquanto simile a quella con SDS, ritenuto una delle migliori sostanze non tossiche per l'estrazione del polimero.

Anche in questo caso, l'analisi elementare (Tabella 3.3) mostra le differenze tra le diverse condizioni sperimentali.

Tabella 3.3: Analisi elementare del PHB ottenuto dopo un trattamento di 1, 2, 3 ore in NH_4 -laurato.

	N	C	H	S
NH_4-laurato 1 h	1,15±1,00	86,15±14,24	6,84±0,11	0,02±0,03
NH_4-laurato 2 h	0,56±0,28	62,79±8,46	7,90±0,22	0,00±0,00
NH_4-laurato 3 h	0,27±0,16	57,63±1,60	8,06±0,32	0,00±0,00
SDS 3 h	0,06±0,01	53,90±0,50	6,90±0,10	0,00±0,00

L'estrazione con SDS è nettamente più pulita in termini di quantità di azoto rimanente sul polimero ($0,06 \pm 0,01\%$). Delle estrazioni con NH_4 -laurato, quella che si avvicina di più al surfattante anionico, è quella con la tempistica a tre ore, che determina meno quantità di azoto nel polimero rispetto a due e un' ora. L'estrazione ad un' ora contiene perfino tracce di zolfo, quindi il sistema SAS-base ha bisogno almeno di tre ore per agire completamente sul batterio.

Al fine di ottimizzare il rapporto surfattante/biomassa sono state testate diverse quantità di acido laurico: 250, 200, 100 wt% rispetto alla biomassa batterica utilizzata (Figura 3.4). Questo perché se la quantità di SAS necessaria a dissolvere la NPMC fosse minore diminuirebbero i costi di estrazione (Figura 3.4).

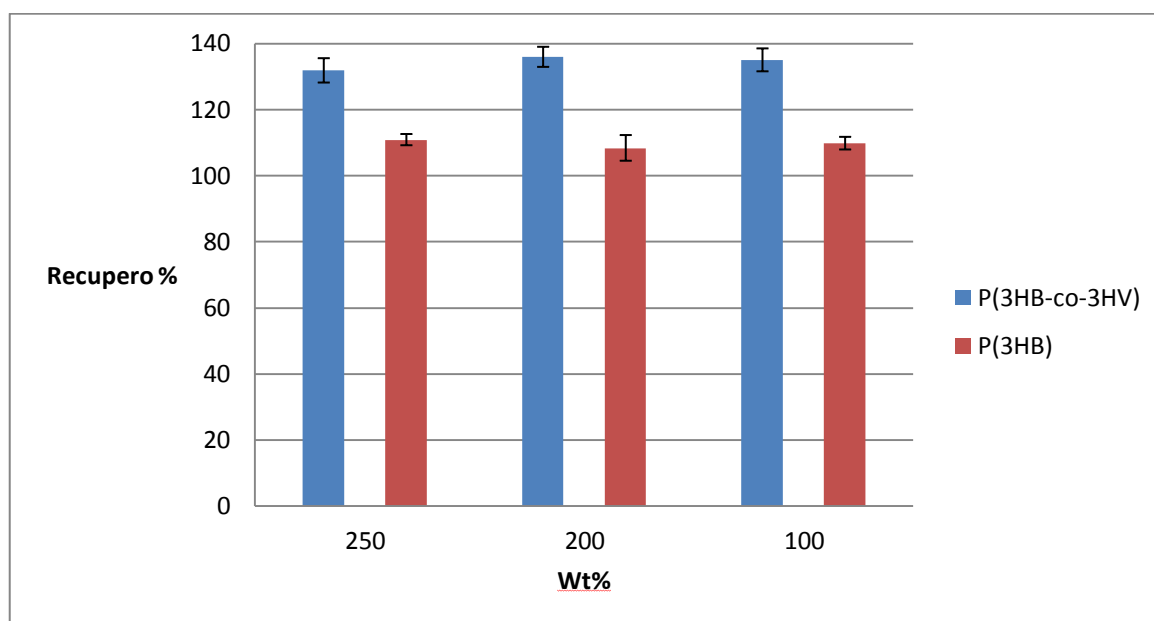


Figura 3.4: Recupero di PHA (espresso in percentuale rispetto alla quantità di polimero contenuto nelle cellule) ottenuto dopo un trattamento di 3 ore in NH_4 -laurato a diverse concentrazioni di acido laurico (espresso in percentuale rispetto alla quantità di biomassa)

Dal grafico del recupero di polimero non è evidente alcuna differenza tra l'utilizzo di quantità diverse di acido. Quindi ciò significa che anche con quantità minori di SAS il recupero di PHB è sempre lo stesso. Questa affermazione trova conferma con l'analisi elementare (Tabella 3.4) dei polimeri estratti, infatti non risultano

particolari differenze tra i trattamenti. Anzi, osservando la quantità di azoto, il valore decresce al diminuire della quantità di acido laurico.

Tabella 3.4: Analisi elementare del polimero recuperato dopo un trattamento di 3 ore in NH₄-laurato a diverse concentrazioni di acido laurico (espresso in percentuale rispetto alla quantità di biomassa batterica)

250 wt%		N	C	H	S
	P(3HB-co-3HV)	0,27±0,16	57,63±1,60	8,06±0,32	0,00±0,00
	P(3HB)	0,10±0,05	56,52±0,43	7,24±0,09	0,00±0,00
200 wt%					
	P(3HB-co-3HV)	0,13	57,48	7,29	0,00
	P(3HB)	0,04	55,18	7,21	0,00
100 wt%					
	P(3HB-co-3HV)	0,17	54,82	7,58	0,00
	P(3HB)	0,03±0,02	55,61±0,43	7,34±0,01	0,00±0,00

Dopo questi esperimenti, si può affermare che il protocollo ottimale per l'estrazione di PHB da *C.necator* è:

- 100 wt% di acido laurico rispetto alla quantità di batteri;
- 3 ore di dissoluzione della NPCM da parte del NH₄-laurato.

Sono stati testati anche altri tipi di SAS, l'acido miristico, palmitico, stearico. Ma in tutti e tre i casi la solubilizzazione non è avvenuta, nemmeno a basse concentrazioni (SAS 0.4 mmol)

Per comprendere il problema della non solubilizzazione sono state provate altre due basi organiche, l'imidazolo e l'1,5-diazabicyclo(5.4.0)undec-5-ene (DBU), sui medesimi acidi carbossilici a lunga catena. Tuttavia non è stato ottenuto un risultato migliore rispetto a quello ottenuto con NH_4OH .

Quindi l'utilizzo dell' NH_4 -laurato come SAS rimane il migliore.

3.2 Purezza e peso molecolare

Sono state osservate differenze significative tra i polimeri trattati col NH_4 -laurato 200 e 100 wt%, col NH_4OH e con l' SDS rispetto al PHB commerciale Biomer, sia per quanto riguarda il peso molecolare (M_w) (analisi GPC) che per la purezza (analisi TGA). Il peso molecolare è un parametro molto importante per un polimero in quanto ne influenza il range di applicabilità. Più il peso molecolare è alto maggiore sarà la lunghezza del polimero.

Per quanto riguarda la purezza (Figura 3.5), l' SDS e il NH_4 -laurato 200 wt% sono molto vicini al valore del PHB commerciale, mentre il trattamento con il solo NH_4OH ha un grado di purezza molto basso. Il trattamento con NH_4 -laurato 100 wt% mostra un valore basso di purezza rispetto a quanto visto con l'analisi elementare precedente (Tabella 3.4) probabilmente perché è stato considerato solo l'azoto come elemento di riferimento.

Per quanto riguarda il peso molecolare, il trattamento col SDS ha valori ottimi, anche superiori al valore del PHB commerciale; mentre gli altri trattamenti abbassano il peso molecolare perché l'alta basicità della miscela idrolizza in parte i legami esteri del PHB.

Tabella 3.5: Purezze, Temperatura massima di degradazione e peso molecolare del polimero ottenuto con diversi trattamenti

Trattamento	Purezza	T max deg (°C)	M_w (MDa)
PHB Biomer	98±2	284	0,8
NH ₄ -laurato 200 wt%	98±2	264	0,6
NH ₄ -laurato 100 wt%	80±1	245	0,4
NH ₄ OH	70±11	272	0,7
SDS (200 wt%)	99±1	271	1,2

3.3 Recupero SAS

La caratteristica peculiare dei SAS è di cambiare forma da neutra (insolubile in acqua) a ionica (solubile in acqua ed attiva), e viceversa, tramite la modifica di una condizione che può essere, il cambiamento di pH, l'irraggiamento elettromagnetico, o le reazioni redox. Nel grafico della figura 3.5, ad una soluzione NH₄-laurato (pH ≈10) è stata aggiunta CO₂ gassosa tramite insufflazione per 10 minuti. La conversione dalla forma ionica a quella neutra (acido laurico) è stata ottenuta a pH ≈7,9. Dopodiché la miscela è stata riscaldata con una piastra a 50°C per rimuovere la CO₂ (pH≈ 9,8) e riportare l'acido laurico nella sua forma ionica e solubile. Questa procedura è stata ripetuta per altre due volte, per un totale di tre cicli di insufflazione/rimozione CO₂. L'andamento dell'acido laurico da forma neutra a ionica e viceversa, rimane costante nel tempo; ciò conferma la proprietà switchable del SAS.

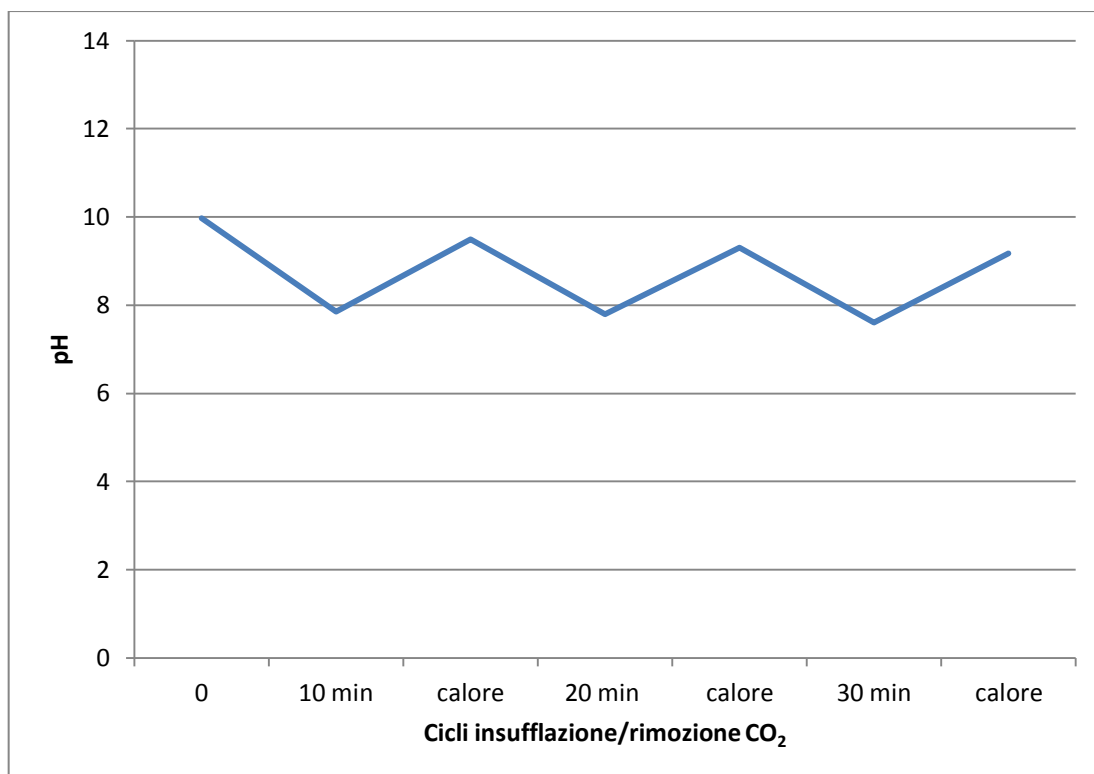


Figura 3.5: Andamento del pH dell'acido laurico con NH_4HO con cicli di insufflazione di CO_2 di dieci minuti seguiti da evaporazione della CO_2 tramite evaporazione

Il recupero totale di acido laurico dopo la rimozione di CO_2 è stato del 98%. Da questo dato è possibile ipotizzare un processo di riutilizzo delle emissioni di CO_2 , prodotte ad esempio da un'industria, per modificare la forma del SAS in modo semplice ed economico. Altra considerazione importante è che questo reagente può essere utilizzato più e più volte e che il processo di cambiamento di forma del SAS può essere fatto direttamente dall'azienda produttrice.

3.4 Pre-trattamenti per colture miste

In questo studio di tesi sono stati sviluppati protocolli per l'estrazione di PHB anche da colture batteriche miste. Questi batteri, avendo meno quantità di polimero che fa pressione alla membrana cellulare, sono più resistenti e quindi è più difficile l'estrazione. I surfattanti non riescono a distruggere completamente la membrana e il recupero di polimero è di molto inferiore della quantità dello stesso nel batterio. Per questo motivo sono stati testati metodi di pre-trattamento per questi microorganismi. Come primo esperimento sono stati provati i metodi di distruzione cellulare meccanica mediante omogenizzatore e sonificatore ad ultrasuoni. In bibliografia questi metodi sono stati testati solamente per le colture monospecie^(12,30) e sono risultati efficaci per l'indebolimento della membrana cellulare.

Mentre per le colture miste sia con l'utilizzo dell'omogenizzatore sia con il sonificatore ad ultrasuoni, le membrane batteriche non si sono disgregate completamente. Infatti il PHB recuperato è di molto inferiore alla quantità di polimero iniziale del batterio, in media circa il 50%.

Avendo constatato che i metodi di distruzione cellulare utilizzati per le monoculture non funzionano, è stato testato un nuovo metodo che prevede l'utilizzo di nano-TiO₂ in sospensione acquosa 1% sotto l'azione delle radiazioni UV. Il nano-TiO₂ viene utilizzato in molti settori, dall'industria di vernici e ceramiche^(31,32) all'utilizzo come antibatterico. In questa specifica applicazione, il TiO₂ assorbe le radiazioni UV formando radicali -OH -O₂, i quali ossidano la membrana cellulare distruggendola e liberando tutto il materiale intracellulare (Figura 3.6).

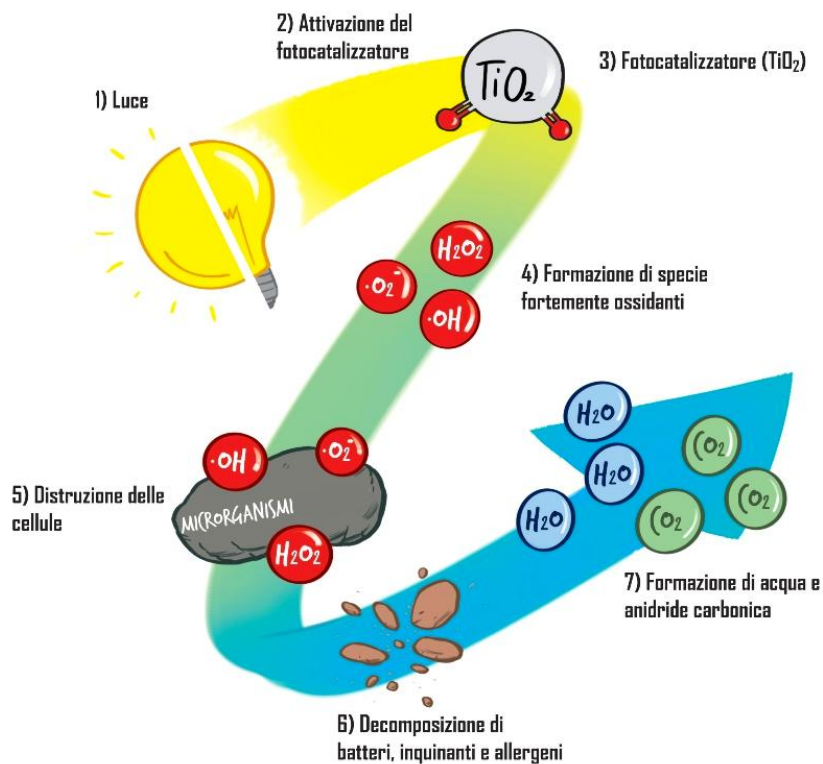


Figura 3.6: Fotocatalisi del nano- TiO_2 in trattamenti antibatterici

Gli esperimenti effettuati hanno mostrato come l'elevata torbidità della miscela biomassa-nano TiO_2 (Figura 3.7) ha ostacolato il passaggio delle radiazioni UV. Inoltre è stato recuperato più materiale di quello corrispondente al teorico contenuto di polimero nei batteri; probabilmente il nano- TiO_2 si è legato in parte alla biomassa batterica. Di conseguenza sarebbe necessario un altro trattamento per eliminare il titanio dal polimero, aumentando così i costi ed il lavoro.



Figura 3.7: Miscela biomassa-nano TiO_2

3.5 Post-trattamento per PHB estratto

Il PHB estratto con i SAS ha, seppur in minima percentuale, delle impurezze visibili nell'analisi elementare con la presenza di azoto nel polimero.

Per purificare il polimero, rendendolo così utilizzabile in tutte le applicazioni comprese quelle mediche, è stato testato un metodo che prevede sempre la fotocatalisi del nano-TiO₂. In questo esperimento è stato utilizzato un tessuto di cotone imbevuto di nano-TiO₂ 1%.

Dopo l'esposizione agli UV il tessuto è stato esaminato con uno spettrometro ad infrarossi per verificare eventuali alterazioni del tessuto stesso dopo il trattamento. Dal grafico di spettrografia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) (Figura 3.7) il tessuto adsorbe parte del PHB sulla sua superficie. Questo risultato si può notare osservando come il gruppo funzionale C=O (1750 cm⁻¹, che indica la presenza di PHB) venga assorbito dallo strumento indicandone la presenza.

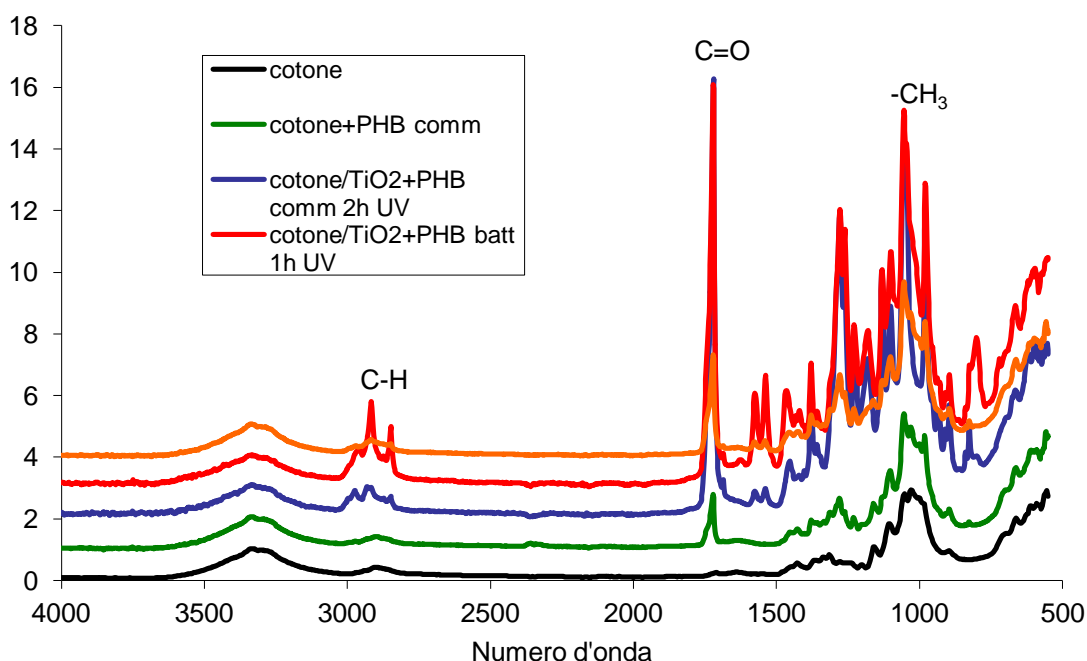


Figura 3.8: Analisi FT-IR del tessuto di cotone con e senza nano-TiO₂

L'analisi elementare dei campioni di PHB commerciale ed estratto dai batteri, mostra la presenza di azoto anche dopo il post-trattamento. Il tessuto utilizzato quindi conteneva tracce di azoto, perché nel PHB commerciale non ci sono impurezze, probabilmente questi tessuti sono stati lavati con detergenti azotati, che hanno rilasciato azoto nei polimeri.

Tabella 3.6: Analisi elementare post-trattamento del polimero

Polimero	N	C	H	S
PHB Biomer	0,27	55,41	7,32	0,00
P(3HB)	0,47	60,14	6,73	0,00

Sono stati utilizzati anche altri tipi di tessuto: polipropilene 17 GSM (PP), poliammide standard (PA66), poliestere type 777 standard (PET). Questi tessuti, che non contengono titanio, sono stati utilizzati per testare quale tessuto non adsorbe sulla sua superficie PHB.

In figura 3.9 è mostrata l'analisi FT-IR del tessuto di PET in confronto col tessuto e PHB commerciale. Essendo entrambi dei poliesteri, i gruppi funzionali assorbiti sono gli stessi, quindi non è possibile distinguere i due grafici tra di loro.

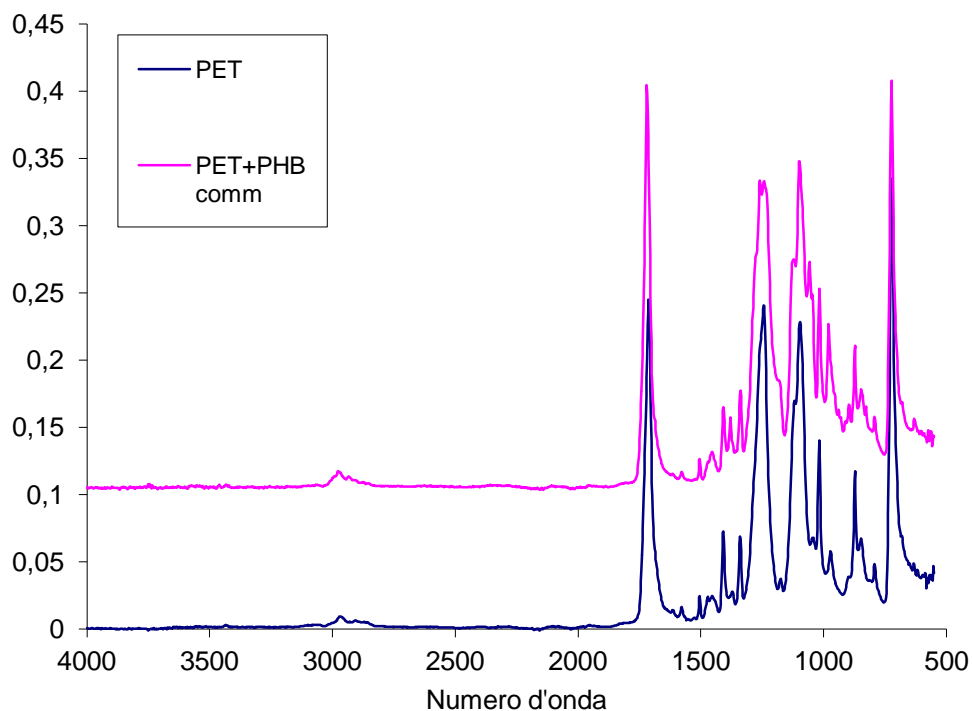


Figura 3.9: Analisi FT-IR del tessuto PET con e senza PHB

Per gli altri due tessuti, PP e PA66, i grafici FT-IR (Figura 3.10 e 3.11) mostrano l'assorbimento del gruppo funzionale C=O, quindi in entrambi i casi il polimero viene adsorbito nei tessuti.

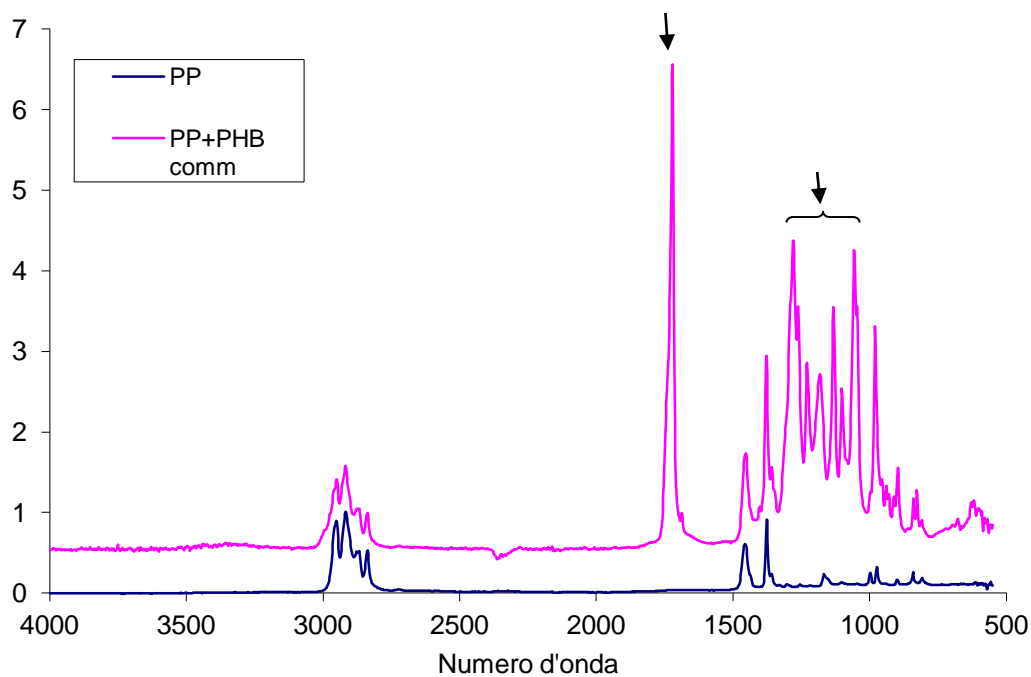


Figura 3.10: Analisi FT-IR del tessuto PP con e senza PHB

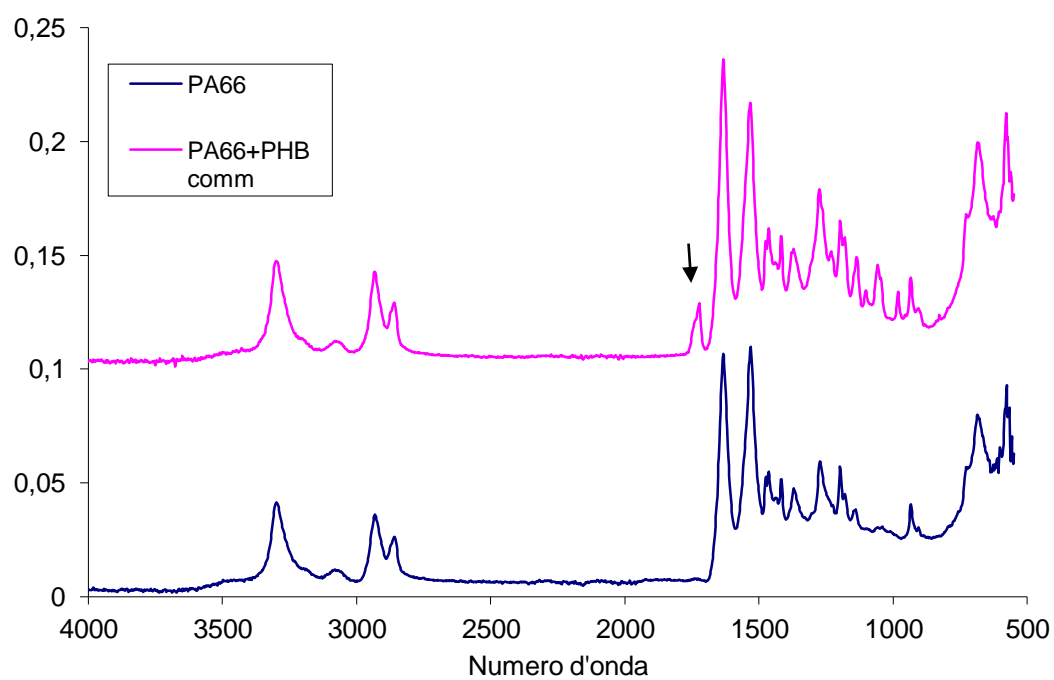


Figura 3.10: Analisi FT-IR del tessuto PA66 con e senza PHB

Un'ipotetica soluzione per utilizzare il nano-TiO₂ come post-trattamento, potrebbe essere di supportare, sulla superficie, il titanio in sfere o cilindri di quarzo, per poi sonicarli, in modo da avere sia un trattamento fotocatalitico che meccanico.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state sperimentate alcune metodologie “green” per l'estrazione dei poliidrossialcanoati (PHA) da colture batteriche singole e miste.

Seguendo i principi della Green Chemistry, è stato sperimentato un metodo di estrazione di PHB con l'utilizzo dei surfattanti anionici switchable (SAS). Questi composti sono sia non tossici che perfettamente riciclabili, circa il 98%.

Sono state testate condizioni sperimentali diverse, in modo da trovare il protocollo ottimale per l'estrazione del PHB sia dalla specie *Cupriavidus necator* sia dalle colture batteriche miste.

Per quanto riguarda l'estrazione da *C.necator* la tempistica di dissoluzione della NPCM ottimale è di 3 ore a 90°C. In questo modo tutte le parti non polimeriche della cellula vengono distrutte, rendendo il PHB di facile estrazione. Inoltre a tre ore i valori di azoto (sintomatici di eventuali impurezze) sono più bassi rispetto alla dissoluzione in una e due ore. È stato anche osservato che la quantità di surfattante utilizzato può essere ridotta, da 250 wt% a 100 wt%, senza che il polimero ne risenta in termini di resa e purezza.

Nelle estrazioni di PHB da colture batteriche miste sono state provate tecniche di distruzione cellulare meccanica e fotocatalitica tramite l'utilizzo del nano-TiO₂ in sospensione 1% sotto raggi UV. La distruzione meccanica, utilizzata già come pre-trattamento per le monospecie, non è una adeguata metodologia per questo tipo di batteri.

Anche il metodo della fotocatalisi con nano TiO₂ non è adatto a queste colture, infatti dopo l'esposizione agli UV, parte del titanio va ad attaccarsi al PHB, rendendo così necessario un altro trattamento extra per rimuoverlo.

Infine è stato testato un post-trattamento per il polimero estratto per eliminare le eventuali impurezze formati. È stato utilizzato un tessuto impregnato di nano-

TiO₂ . Ma questo tessuto conteneva particelle di azoto che nella reazione catalitica sono andate a diminuire la purezza del PHB estratto, inoltre adsorbiva sulla sua superficie parte del PHB.

Lo studio delle metodologie di estrazione di biopolimeri con i SAS è ancora agli inizi; però dai risultati ottenuti, questa tecnica potrà diventare in breve tempo uno dei migliori metodi “green” per l’ estrazione di PHB.

5. BIBLIOGRAFIA

1. IUPAC. **Terminology for biorelated polymers and applications.** *Pure and Applied Chemistry.* **84** (2012) pp.377-410
2. Madison L.L., Huisman G.W. **Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.** *Microbiol Mol Biol Rev.* **63** (2008) pp 21-53
3. Sudesh K., Abe H., Doi, Y. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological poliester.** *Prog Polym Sci.* **25** (2000) pp.1503-1555
4. Anderson A.J., Dawes e.A. **Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** *Microbio Rev.* **54** (1990) pp. 450-472
5. Khanna S., Srivastava A.K. **Recent avances in microbial polyhydroxyalkanoates.** *Process Biochemistry.***40** (2005) pp. 607-619
6. Sudesh K., Abe H., Doi Y., **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyester.** *Progress in Polymer Science.* **25** (2000) pp. 1503-1555
7. Van-Aalst Leeuwen M.A., Pot M.A., Van Loosdrecht M.C., Heijnen J.J. **Kinetic modeling of poly-(hydroxyalkanoate) production and consumption by Paracoccus pantotrophus under dynamic substrate supply.** *Biotechnol. Bioeng.* **55** (1997) pp. 773-782

8. Lee S.Y. **Bacterial polyhydroxyalkanoates.** *Biotechnology and Bioengineering.* **49** (1996) pp. 1-14.
9. Villavecchia V., Eigenmann G., Ubaldini I. **Nuovo dizionario di merceologia e chimica applicata.** *Hoepli.* **5** (1975)
10. Chen Y., Xu Z., Smith C., Sankar J. **Recent Biodegradable Plastics Development in China.** *Dept of Biological Sciences and Biotechnology.* **10** (2014) pp. 4561-4573
11. Jin Y., Chen G.Q., Wang Y. **Biodegradable plastic PHA and their application.** *International conference on Green Materials and Green Olympics.* **30** (2008) pp. 59-65
12. Jacquel N., Lo C.W., Wei Y.H., Wu H.S., Wang S.S. **Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)** *Biochemical Engineering Journal.* **39** (2008) pp. 15-27
13. Lee S.Y., Choi J. **Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*.** *Polym. Degrad. Stabil.* **59** (1998) pp. 397-393
14. Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** *J. Biotechnol.* **65** (1998) 127-161
15. Choi J.I., Lee S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals.** *Biotechnol Bioeng.* **62** (1999) pp. 546-553

16. Fiorese M., Freitas F., Pais J., Ramos A.M., Glaucia M.F. **Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate.** *Eng. Life Sci.* **9** (2009) pp. 454-465
17. Hahn S.K., Chang Y.K., Kim B.S., Lee K.M., Chang H.N. **The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite.** *Biotechnology Techniques.* **7** (1993) pp. 209-212
18. Thakor N., Lutke-Eversloh T., Steinbüchel A. **Application of the BPEC pathway for large-scale biotechnological production of poly(3-mercaptopropionate) by recombinant *Escherichia coli*, including a novel in situ isolation method.** *Appl Environ Microbiol* **71** (2005) pp. 835–841
19. Pohlmann, A., Fricke, W., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Vob, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B. and Bowien, B. (2006). **Genome sequence of the bioplastic-producing *Knallgas* bacterium *Ralstonia eutropha* H16.** *Nature Biotechnology* **24** (2010) pp. 1257–1262
20. A. F. Dexter, A. S. Malcolm and A. P. J. Middelberg, **Foaming properties of a peptide designed to form stimuli- responsive interfacial films.** *Soft matter.* *Nat. Mater.* **5** (2006) pp. 502–506.
21. C. B. Minkenberg, L. Florusse, R. Eelkema, G. J. M. Koper and J. H. v. Esch, **Triggered Self-Assembly of dynamic covalent surfactants** *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) pp.11274–11275.

22. Scott L., Robert T., Harjani J.R., Jessop P.G., **Designed the head group of CO₂-triggered switchable surfactants** *RSC Adv.*, **2** (2012) pp. 4925–4931.
23. Sakai H., Abe M., Imura T. **Thermodynamically stable vesicle formation from glycolipid biosurfactant sponge phase.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **43** (2005) pp. 507–543.
24. Fowler C.I., Muchemu C.M., Miller R.E., Phan L., O’Neil C., Jessop P.G., Cunningham M.F. **Emulsion polymerization of styrene and methyl methacrylate using cationic switchable surfactants.** *Macromolecules* **44** (2011) pp. 2501-2509
25. Ceschia E., Harjani J.R., Liang C., Ghoshouni Z., Andrea T., Jessop P.G. **Switchable anionic surfactants for the remediation of oil-contaminated sand by soil washing.** *RSC Adv.* **4** (2004) pp. 4638-4645
26. K.J. Hwang, S.F. You, T.M. Don, **Disruption kinetics of bacterial cells during purification of poly- γ -hydroxyalkanoates using ultrasonication.** *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* **37** (2006) 209–216.
27. Yang Y.H., Brigham C., Willis L., Rha C.K., Sinskey A. **Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs),** *Biotechnol Lett.* **33** (2011) pp. 937-942
28. Samorì C., Basaglia M., Casella S., Favaro L., Galletti P., Giorgini L., Marchi D., Mazzocchetti L., Torri C., Tagliavini E. **Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass.** *Green Chemistry.* (2014) DOI: 10.1039/c4gc01821d

29. Gao L., Zhang Q. **Effect of amorphous contents and particle size on the photocatalytic properties of TiO₂ nanoparticles.** *Script. Mater.* **44** (2001) 1195-1198
30. Tamer I.M., Moo-Young M., Chisti Y. **Optimization of poly(b-hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments.** *Bioprocess Engineering.* **19** (1998) pp. 459-468
31. Gao Y., Wahi R., Kan A.T., Falkner J.C., Colvin V.L., Tomson M.B. **Adsorption of cadmium on anatase nanoparticles-effect of crystal size and pH.** *Am. Chem. Soc.* **20** (2004) 9585-9593
32. Cai Y., Stromme M., Welch K. **Bacteria viability assessment after photocatalytic treatment.** *Biotech.* **4** (2014) pp. 149-157

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il mio relatore, il professor Tagliavini per l'aiuto fornito durante la stesura, per avermi chiarito ogni dubbio e per la disponibilità. Inoltre ringrazio sentitamente la dottoressa Samorì per aver revisionato la tesi, per l'interesse che ha dimostrato nei confronti del mio lavoro e per i consigli e l'aiuto durante le analisi in laboratorio.