

**POLITECNICO DI TORINO**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**La fermentazione aerobica per la produzione  
di poliidrossibutirrato: un approccio di  
economia circolare per la valorizzazione di  
scarti zuccherini industriali**



**Relatore**

Prof.ssa Debora Fino

**Co-relatori**

Prof.ssa Tonia Tommasi

Dott.ssa Silvia Bellini

**Candidato**

Sara Di Domenico

Luglio 2021



## Indice

1.	Introduzione .....	1
2.	Poliidrossialcanoati (PHA) .....	5
2.1.	Cosa sono e proprietà .....	5
2.2.	Poliidrossibutirrato (PHB) .....	9
2.3.	Biosintesi dei PHA .....	11
2.3.1.	Microrganismi produttori di PHA .....	12
2.4.	Applicazioni dei PHA .....	14
2.5.	Cenni sui parametri fermentativi che influenzano la produzione di PHA .....	16
3.	Cenni su <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 .....	19
3.1.	Caratteristiche metaboliche .....	19
3.2.	Influenza dell'acido acetico sulla produzione di PHB .....	22
4.	Materiali .....	25
4.1.	Ceppo batterico .....	25
4.2.	Terreni di coltura .....	25
4.2.1.	Fonti di carbonio .....	27
4.3.	Estrazione di PHB .....	28
4.4.	Strumentazione .....	28
5.	Metodi .....	29
5.1.	Fermentazione in beuta .....	29
5.1.1.	Preparazione dell'inoculo .....	29
5.1.2.	Prove effettuate .....	30
5.1.3.	Induzione con acetato di sodio .....	31
5.2.	Fermentazione in bioreattore .....	31
5.2.1.	Preparazione dell'inoculo .....	31
5.2.2.	Parametri del reattore e strategia di alimentazione .....	32
5.2.3.	Induzione con acetato di sodio .....	33
5.3.	Preparazione della biomassa e del surnatante .....	34
5.4.	Estrazione del PHB .....	34
5.5.	Analisi tramite HPLC .....	35

5.6.	Modellazione matematica per la crescita batterica .....	38
6.	Risultati .....	39
6.1.	Risultati fermentazione in beute .....	39
6.1.1.	Prove in glucosio e fruttosio .....	39
6.1.2.	Prove con retentati zuccherini.....	41
6.1.3.	Confronto tra le prove preliminari: produzione di PHB e parametri di fermentazione.....	42
6.1.4.	Prove di induzione con acetato di sodio .....	45
6.2.	Risultati fermentazione in bioreattore.....	54
6.2.1.	Prove di fermentazione <i>batch</i> .....	54
6.2.2.	Prova di fermentazione <i>fed-batch</i> .....	57
6.2.3.	Prove <i>fed-batch</i> di induzione con acetato di sodio .....	58
7.	Conclusioni .....	63
	Lista degli acronimi .....	65
	Elenco dei simboli.....	66
	Elenco delle figure .....	67
	Elenco delle tabelle .....	69
	Bibliografia .....	71

## 1. Introduzione

Al giorno d'oggi la maggior parte delle plastiche utilizzate in quasi tutte le industrie manifatturiere deriva dal petrolio. Si tratta di polimeri sintetici altamente vantaggiosi in quanto possono essere chimicamente manipolati e modellati in quasi tutte le forme desiderabili, incluse le fibre e i film sottili. Inoltre, le plastiche convenzionali presentano un costo di produzione contenuto, un'elevata resistenza chimica e una modesta elasticità, che le rende adatte a contenere e imballare diversi prodotti [1].

Tuttavia, i materiali polimerici di origine petrolchimica sono diventati così ampiamente utilizzati che nel 2015 la loro produzione mondiale è stata stimata a 322 milioni di tonnellate e si è osservato che, tra il 1950 e il 2015, la produzione globale di plastica è aumentata in maniera quasi esponenziale con un tasso di crescita annuale del 9,4% [2]. Sulla base di tali dati, si prevede che entro il 2050 la produzione mondiale di plastica supererà le 500 milioni di tonnellate [3].

Derivando da idrocarburi fossili e presentando un elevato peso molecolare e una struttura complessa, le plastiche non sono biodegradabili, quindi, anziché decomporsi, si accumulano nelle discariche o nell'ambiente naturale generando una contaminazione quasi permanente [4]. Infatti, la plastica è in grado di persistere nell'ambiente per centinaia o migliaia di anni, durata che probabilmente aumenta sui fondali marini [5]. Si nota, perciò, che la loro produzione e utilizzo non sono più sostenibili, costituendo un problema significativo a livello ambientale [6]. I rifiuti plastici sono ormai presenti lungo le coste, sulla superficie e sul fondo del mare, nelle acque dolci, negli habitat terrestri e nei ghiacciai del Mar Artico [7]. Solo nel 2010 è stato stimato che dalle 4 alle 12 milioni di tonnellate di rifiuti plastici prodotti sulla terraferma sono state riversate nell'ambiente marino [4]. I detriti di plastica nel mare costituiscono un problema considerevole dal momento che possono ferire, fino a causarne la morte, centinaia di specie marine, tra cui tartarughe, pesci, invertebrati e mammiferi [8]; inoltre, possono frammentarsi generando microplastiche che vengono successivamente ingerite dalla fauna marina fino ad arrivare nei nostri piatti [5].

Negli ultimi anni questa consapevolezza ha generato una spinta a livello globale verso i concetti di sostenibilità, di chimica "verde" e di economia circolare con lo scopo di sviluppare risorse rinnovabili e sostituti plastici alternativi che siano ecologici e biodegradabili [6], [9]. Si parla quindi di bioplastiche, polimeri derivanti da biomassa o fonti rinnovabili, che possono essere biodegradabili e compostabili. Secondo l'American Society for Testing of Materials (ASTM) e l'International Standards Organization (ISO), una plastica è biodegradabile se la sua struttura chimica subisce cambiamenti significativi quando sottoposta all'azione enzimatica di micro- e/o macrorganismi in specifiche condizioni ambientali [10]. Invece, una plastica è compostabile se, durante i processi biologici di compostaggio, si degrada in anidride carbonica, acqua, sali minerali e altri composti a basso peso molecolare e se si disintegra, non lasciando residui visibili nel compost finale [11].

I biopolimeri sono un'importante innovazione dello sviluppo sostenibile in quanto offrono non solo la conservazione delle risorse fossili, ma anche la riduzione delle emissioni di CO<sub>2</sub>

[12]. Inoltre, non si ha la generazione di rifiuti tossici che è invece presente nella produzione di plastiche di origine petrolchimica [9].

I biopolimeri possono essere divisi in tre gruppi in base ai processi di produzione e al tipo di polimero [13]:

- Biopolimeri sintetizzati direttamente da microrganismi, come i poliidrossialcanoati (PHA);
- Biopolimeri derivanti dalla polimerizzazione chimica di monomeri di origine biologica, come l'acido polilattico (PLA);
- Biopolimeri naturali, come la cellulosa, l'amido e il chitosano.

Negli ultimi anni sono stati ricercati e sviluppati numerosi polimeri cosiddetti “verdi”, tra cui i PHA, il PLA, il polibutilene succinato (PBS) e il policaprolattone (PCL). Si tratta di materiali molto interessanti non solo grazie alla loro elevata biodegradabilità, ma anche per le loro proprietà fisico-chimiche, termiche e meccaniche che possono essere molto simili a quelle di alcune plastiche convenzionali come il polipropilene (PP) e il polietilene a bassa densità (LDPE) [14], [15]. La caratteristica che differenzia il PHA dal PLA e dal PBS è che il PHA è ottenuto semplicemente tramite fermentazione, infatti può essere prodotto da diversi ceppi batterici, mentre il PLA e il PBS vengono prodotti tramite la polimerizzazione, rispettivamente, dell'acido lattico e dell'acido succinico [15]. I microrganismi produttori di PHA accumulano tale biopolimero come riserva di energia quando la loro crescita è rallentata da concentrazioni limitanti dei nutrienti essenziali (azoto, fosforo, ossigeno, ecc.) e/o da un eccesso di fonte di carbonio [16].

Tuttavia, la produzione di polimeri “verdi” è ancora caratterizzata da costi molto elevati, dovuti principalmente ai costi della fonte di carbonio. Una possibile soluzione per diminuirli consiste nell'utilizzo di substrati poco costosi e/o di scarto provenienti da altri processi industriali (olio di palma, melassa, amido, ecc.) [17], realizzando così un modello di economia circolare. Tale concetto riguarda anche questo lavoro di tesi, che rientra nel progetto PRIME (Processi e prodotti Innovativi di chimica vErde) promosso dalla Regione Piemonte, il quale ha lo scopo di studiare e sviluppare processi di chimica avanzata per la produzione di nuovi biomateriali e prodotti inseriti in diversi settori economici (agricoltura, alimentare, tessile, cosmetico, automotive, ecc.).

L'obiettivo della tesi è quello di studiare la crescita del ceppo batterico *Cupriavidus necator* DSM 545 per la produzione di poliidrossibutirrato (PHB), biopolimero appartenente al sottogruppo dei PHA, impiegando come substrato delle fonti di carbonio di scarto (retentati zuccherini) provenienti da un'industria del territorio che produce amido e prodotti amidacei (Sedamyl S.p.A.). I retentati zuccherini impiegati per la fermentazione presentano una composizione di circa 50% glucosio e 50% fruttosio. In letteratura è stata trovata un'ampia varietà di ricerche che impiegano *C. necator* per la produzione di PHA utilizzando diversi substrati a basso costo, tra cui glicerolo di scarto [18], glucosio [19], melassa [20] e siero di latte [20], [21].

A tale scopo, sono state eseguite delle prove di fermentazione preliminari in beuta e, successivamente in bioreattore per analizzare la crescita del ceppo batterico. Inoltre, dopo aver

svolto una ricerca bibliografica, sono state effettuate delle prove di fermentazione inducendo la crescita batterica con acetato di sodio per osservare eventuali variazioni nella produzione di PHB.

La prima parte del lavoro (Capitoli 2 e 3) presenta una breve ricerca bibliografica sui PHA e sul ceppo batterico *Cupriavidus necator*. In particolare, nel Capitolo 2 vengono presentate le caratteristiche e le proprietà dei PHA sottolineando i motivi per cui possono essere degli ottimi sostituti delle plastiche di origine petrolchimica; inoltre, vengono descritti il processo di biosintesi e alcune loro potenziali applicazioni. Il Capitolo 3, invece, si concentra sul ceppo wild type *Cupriavidus necator* DSM 529 e sul ceppo mutato *C. necator* DSM 545, utilizzato per le prove sperimentali: vengono illustrati le caratteristiche metaboliche del batterio, il motivo della sua scelta e l'influenza dell'acetato sul suo metabolismo illustrando due casi trovati in letteratura.

La seconda parte della tesi (Capitoli 4, 5 e 6), invece, è dedicata alla descrizione del lavoro sperimentale. Nel Capitolo 4 vengono descritti i materiali e la strumentazione impiegati durante le prove di fermentazione aerobica, mentre nel Capitolo 5 sono descritte le metodologie adottate durante gli esperimenti: inizialmente, sono presentate le prove preliminari eseguite in beuta impiegando come fonti di carbonio glucosio, fruttosio e i retentati zuccherini e successivamente sono descritte le prove di fermentazione in bioreattore utilizzando gli stessi substrati. In entrambi i casi (beuta e bioreattore), viene anche spiegato come sono state eseguite le prove di induzione con l'acetato di sodio. In seguito, sono descritte le procedure eseguite per analizzare i campioni prelevati durante le prove: vengono spiegati la preparazione della biomassa secca, il recupero del surnatante, l'estrazione del PHB dalla biomassa e le analisi tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) per determinare l'andamento del consumo dei substrati e della produzione di PHB. Infine, viene presentato il modello matematico impiegato per approfondire lo studio della crescita batterica. Nel Capitolo 6, invece, sono presentati e discussi i risultati ottenuti dalle prove di fermentazione effettuate in beuta e in bioreattore analizzando innanzitutto l'andamento nel tempo del consumo dei substrati (glucosio, fruttosio e acetato di sodio), della produzione di PHB e del pH. Successivamente, viene effettuato un confronto tra le produzioni di PHB tra le varie prove svolte e vengono mostrati i parametri ottenuti dalla modellazione matematica.

Infine, nel Capitolo 7 vengono tratte le conclusioni sul lavoro svolto e vengono presentati i possibili sviluppi futuri.



## 2. Poliidrossialcanoati (PHA)

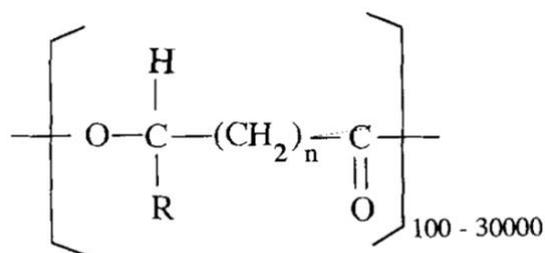
In questo capitolo viene spiegato cosa sono i poliidrossialcanoati (PHA), ponendo innanzitutto l'attenzione sulle loro caratteristiche e sulle proprietà fisiche, meccaniche e termiche (paragrafo 2.1). Successivamente, vengono descritti il poliidrossibutirrato (PHB), composto di interesse di questo lavoro di tesi (paragrafo 2.2), il processo di biosintesi dei PHA (paragrafo 2.3) e alcune loro possibili applicazioni (paragrafo 2.4). Infine, sono presentati alcuni cenni sui principali fattori fermentativi che influenzano la produzione di questo biopolimero (paragrafo 2.5).

### 2.1. Cosa sono e proprietà

I poliidrossialcanoati (PHA) sono dei biopolimeri che vengono sintetizzati da diversi microrganismi sotto forma di carbonosomi, ossia di granuli intracellulari per lo stoccaggio di carbonio ed energia [6]. In particolare, i PHA sono poliesteri alifatici di diversi idrossialcanoati che vengono prodotti da più di 90 specie di batteri, sia Gram-positivi che Gram-negativi, in ambienti aerobici o anaerobici [22], [23].

I PHA furono scoperti per la prima volta nel 1925 dallo scienziato francese Lemoigne all'interno di *Bacillus megaterium* nella forma di poli-3-idrossibutirrato (PHB) [6]. Nel 1958, invece, fu dimostrato dagli scienziati Macrae e Wilkinson che i PHA svolgono il ruolo di materiale di riserva all'interno delle cellule batteriche [24]. Infatti, osservarono che l'accumulo di PHB in *B. megaterium* aveva inizio quando nel mezzo di coltura era presente un alto rapporto tra glucosio e azoto e che il PHB veniva successivamente degradato in assenza di fonti di carbonio ed energia [25].

La struttura generale dei PHA è mostrata in Figura 2.1, dove  $n$  varia da 1 a 4 ed  $R$  è la catena laterale alchilica. Se  $n = 1$  e il gruppo laterale  $R$  è costituito da  $\text{CH}_3$  (gruppo metile), il polimero risultante è chiamato poli-3-idrossibutirrato, mentre se  $R = \text{C}_3\text{H}_7$  (gruppo propile) il polimero è chiamato poli-3-idrossiesanoato e così via (Tabella 2.1) [6].



**Figura 2.1.** Tratta da [26]. Struttura generale dei poliidrossialcanoati.

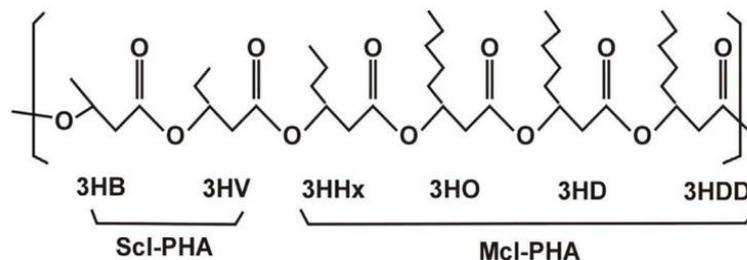
**Tabella 2.1.** Nomi di alcuni PHA in base alla struttura generale in Figura 2.1 [26].

		Nome PHA
n = 1	R = idrogeno	Poli-3-idrossipropionato
	R = metile	Poli-3-idrossibutirrato
	R = etile	Poli-3-idrossivalerato
	R = propile	Poli-3-idrossiesanoato
	R = pentile	Poli-3-idrossiottanoato
	R = nonile	Poli-3-idrossidodecanoato
n = 2	R = idrogeno	Poli-4-idrossibutirrato
n = 3	R = idrogeno	Poli-5-idrossivalerato

I vari monomeri dei PHA possono essere classificati in base al numero di atomi di carbonio in: PHA a corta catena (scl-PHA), PHA a media catena (mcl-PHA) e PHA a lunga catena (lcl-PHA). I PHA a corta catena presentano monomeri con massimo 5 atomi di carbonio e sono sintetizzati da diversi batteri come, ad esempio, *Cupriavidus necator*, i PHA a media catena sono composti da monomeri che contengono da 6 fino a 14 atomi di carbonio e sono prodotti principalmente dal genere *Pseudomonas* [24], mentre i PHA a lunga catena consistono di monomeri con più di 14 atomi di carbonio, ma sono poco comuni e meno studiati [14].

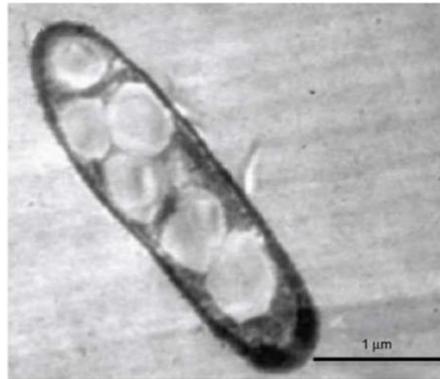
Esempi di monomeri che vanno a formare scl-PHA sono il 3-idrossibutirrato e il 3-idrossivalerato, invece il 3-idrossiesanoato, il 3-ottanoato e il 3-idrossidecanoato sono monomeri che costituiscono gli mcl-PHA. I PHA a media catena sono stati osservati per la prima volta in *Pseudomonas oleovorans* nel 1983 [6].

Nella Figura 2.2 è riportata la struttura generale dei PHA con la loro classificazione strutturale.



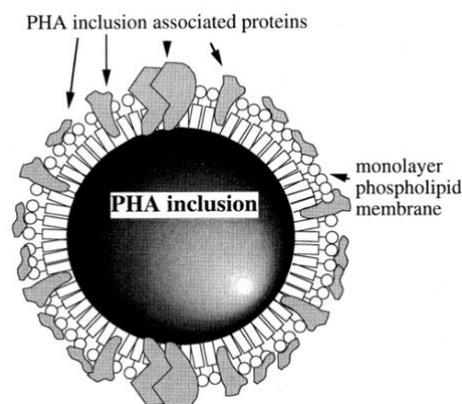
**Figura 2.2.** Tratta da [6]. Struttura dei PHA in base alla classificazione strutturale.

I carbonosomi, strutture granulari citoplasmatiche in cui vengono accumulati i PHA, presentano dimensioni variabili da 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ , come si può vedere nella Figura 2.3, dove è mostrata la morfologia dei granuli di PHA esaminati tramite microscopia a trasmissione elettronica [14]. È stato osservato che in condizioni ottimali i granuli di PHA possono raggiungere fino al 90% del peso secco cellulare [1].



**Figura 2.3.** Tratta da [14]. Morfologia dei granuli di PHA all'interno di una cellula batterica osservata tramite microscopia a trasmissione elettronica.

Fino a qualche anno fa si credeva che i carbonosomi fossero circondati da proteine e da un monostrato di fosfolipidi disposti con le code idrofobiche rivolte verso il nucleo idrofobico del biopolimero e le teste polari rivolte verso il citoplasma, come è mostrato nella Figura 2.4. Tuttavia, questa osservazione è stata effettuata su granuli di PHB isolati *in vitro*. Infatti, recenti studi [27] hanno dimostrato che i granuli di PHA e PHB *in vivo* non presentano fosfolipidi sulla loro superficie, ma solamente proteine, quali le fasine, che influenzano la dimensione e il numero di granuli di PHA all'interno dei microrganismi [28]. Inoltre, si suppone che la presenza di fosfolipidi sui granuli di PHB sia un artefatto *in vitro* che rispecchia la possibilità dei carbonosomi di ospitare lipidi sulla loro superficie quando si trovano in condizioni non fisiologiche [27].



**Figura 2.4.** Tratta da [29]. Rappresentazione della struttura dei granuli di PHA con proteine e monostrato di fosfolipidi sulla superficie (disegno non in scala).

I PHA sono polimeri termoplastici che presentano proprietà differenti a seconda della loro composizione chimica, infatti possono essere omo- o co-polimeri. Le proprietà fisiche variano a seconda che si tratti di un PHA a corta catena o a media catena. Infatti, gli scl-PHA sono polimeri cristallini con basse temperature di transizione vetrosa e alti punti di fusione; la loro cristallinità li rende abbastanza fragili e rigidi [24]. Gli mcl-PHA, invece, sono elastomeri termoplastici caratterizzati da bassa cristallinità e scarsa resistenza alla trazione, ma elevato allungamento a rottura; inoltre, presentano temperature di transizione vetrosa e punti di fusione inferiori rispetto al polipropilene (PP) [9]. La Tabella 2.2 riassume queste proprietà confrontandole con il PP.

**Tabella 2.2.** Confronto delle proprietà di scl-PHA e mcl-PHA con il polipropilene [9], [30].

	scl-PHA	mcl-PHA	Polipropilene
Cristallinità [%]	40 – 80	20 – 40	70
Punto di fusione [°C]	80 – 180	30 – 80	176
Temperatura di transizione vetrosa [°C]	-148 – 4	-40 – 150	-10
Densità [g/cm <sup>3</sup> ]	1,25	1,05	0,91
Allungamento a rottura [%]	6 – 10	300 – 450	400
Resistenza alla luce UV	Buona	Buona	Scarsa
Resistenza ai solventi	Scarsa	Scarsa	Buona
Biodegradabilità	Buona	Buona	Nulla

Nonostante queste differenze, tutti i PHA presentano alcune caratteristiche generali, infatti sono biocompatibili (quindi, adatti ad applicazioni mediche), biodegradabili, insolubili in acqua, resistenti alla degradazione idrolitica e ai raggi ultravioletti, solubili in cloroformio e in altri idrocarburi clorurati, poco resistenti agli acidi e alle basi e non sono tossici. Inoltre, si comportano come materiali piezoelettrici e affondano in acqua, facilitando la loro biodegradazione anaerobica nei sedimenti [12].

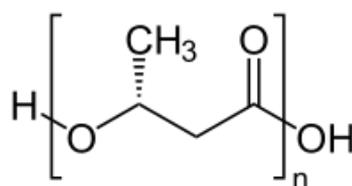
La biodegradabilità dei poliidrossialcanoati è la caratteristica principale che li contraddistingue dalle plastiche di origine petrolchimica; essa dipende da diversi fattori, tra cui le condizioni ambientali (umidità, temperatura, pH), la composizione chimica del polimero, il tipo di microrganismo presente nell'ambiente (che degrada i PHA tramite la produzione di diverse PHA-depolimerasi), la stereoconfigurazione del polimero e il suo peso molecolare [6], [31]. La degradazione dei PHA avviene quando entrano in contatto con il suolo, con sedimenti marini o con il compost [1]. Quando vengono degradati, i PHA danno origine ad acqua e anidride carbonica in condizioni aerobiche oppure ad acqua e metano in condizioni anaerobiche [31]: si tratta perciò di prodotti innocui per l'ambiente a differenza dei prodotti derivanti dalla degradazione della plastica convenzionale.

I valori indicati nella Tabella 2.2 variano a seconda della composizione dell'unità monomerica e dipendono dalla lunghezza della catena laterale e dal suo gruppo funzionale; essi, infatti, influenzano alcune proprietà come il punto di fusione, la temperatura di transizione vetrosa o la cristallinità del biopolimero, determinandone quindi l'applicazione finale [30].

In base alle loro proprietà, i PHA più comuni e maggiormente impiegati sono il poli-3-idrossibutirrato (PHB), il poli-3-idrossivalerato (PHV) e il copolimero poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato P(3HB-co-3HV).

## 2.2. Poli-idrossibutirrato (PHB)

Il poli-3-idrossibutirrato (P3(HB)), o poli-idrossibutirrato (PHB), è un omopolimero di 3-idrossibutirrato ed è il PHA maggiormente diffuso e studiato [12], [32]. Si tratta di un scl-PHA e la sua struttura è mostrata nella Figura 2.5. Il PHB è un polimero biodegradabile che viene accumulato come materiale di riserva da diversi microrganismi in determinate condizioni di crescita [19].



**Figura 2.5.** Struttura molecolare del PHB.

Il PHB è un polimero termoplastico altamente cristallino (60-70% di cristallinità), isotattico, stereo regolare con una configurazione 100% R che permette un alto livello di degradabilità [12]. Si tratta di un materiale rigido e piuttosto fragile [33].

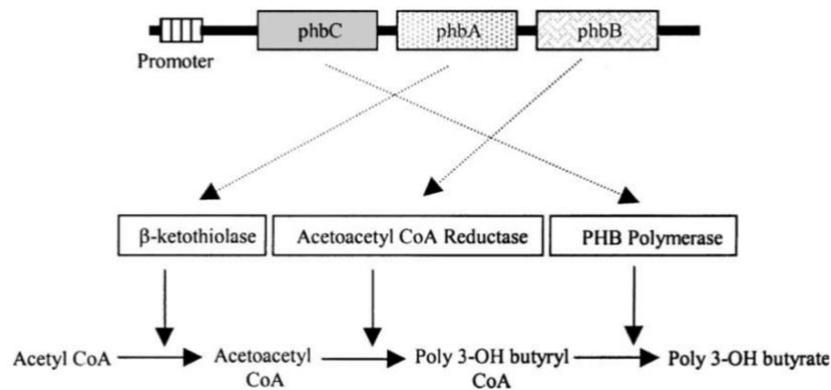
Il PHB presenta alcune proprietà che lo rendono paragonabile ai polimeri di origine petrolchimica, come il polipropilene (PP), infatti mostra una resistenza a trazione relativamente alta (30-35 MPa) e un'elevata temperatura di fusione (175 °C) [12]; inoltre, è caratterizzato da una buona resistenza all'umidità e presenta eccellenti proprietà barriera nei confronti dei gas. Tuttavia, il PHB puro non trova molte applicazioni a causa della stretta finestra di lavorazione e della sua fragilità. Infatti, presenta un punto di fusione molto vicino alla temperatura alla quale inizia la sua degradazione in acido crotonico, che è di circa 185 °C [16]. Inoltre, il PHB è caratterizzato da un basso allungamento a rottura: il PP mostra un allungamento a rottura del 400%, mentre quello del PHB è solamente del 5% [12].

Quindi, gli sforzi della ricerca sono stati rivolti verso la produzione di copolimeri andando a incorporare monomeri composti da 3 o 5 atomi di carbonio all'interno del PHB. In questo modo si è ottenuta una diminuzione della temperatura di fusione e della cristallinità rispetto all'omopolimero. Un esempio di copolimero è il poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato (P(3HB-co-3HV)), ottenuto aggiungendo acido propionico o acido valerico al terreno di crescita contenente glucosio [16].

Il PHB può essere prodotto a partire da diverse fonti di carbonio, tra cui glucosio, glicerolo, fruttosio e acidi organici, tramite processi di fermentazione microbica che coinvolgono microrganismi procarioti e Archaea, come *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. e *Halomonas boliviensis* [34], come si vedrà nel dettaglio nel paragrafo successivo. È stato riportato in letteratura che alte concentrazioni di cellule (87 g/L) con l'80% in peso di PHB sono state raggiunte con una coltura *fed-batch* di un ceppo ricombinante di *E. coli* [35]. È noto che batteri che producono naturalmente PHB e biopolimeri in generale sono anche in grado di degradarli [34].

La biosintesi del PHB consiste in tre reazioni catalizzate da tre diversi enzimi, come riportato in Figura 2.6. La prima reazione consiste nella condensazione di due molecole di acetil coenzima A (acetil-CoA) in acetoacetil-CoA tramite l'enzima  $\beta$ -chetotilasi (codificata dal gene *phaA*). Nella seconda reazione un'acetoacetil-CoA riduttasi dipendente dal NADPH (codificata da *phaB*) effettua la riduzione dell'acetoacetil-CoA all'isomero R del 3-idrossibutiril-CoA, che viene infine polimerizzato in poli-3-idrossibutirrato dalla PHB polimerasi (codificata da *phaC*) [1], [28].

La produzione della  $\beta$ -chetotilasi, e quindi anche quella del PHB, è regolata dalla concentrazione intracellulare dell'acetil-CoA [23]. Durante la normale crescita batterica (senza limitazioni di nutrienti), il coenzima-A libero proveniente dal ciclo di Krebs inibisce la  $\beta$ -chetotilasi [28]. Invece, quando il microrganismo si trova in una situazione di limitazione di nutrienti non a base di carbonio, l'ingresso dell'acetil-CoA nel ciclo di Krebs è limitato e viene favorita la sintesi di PHB [23], [28].



**Figura 2.6.** Tratta da [1]. Via metabolica del PHB.

In conclusione, è fondamentale considerare un importante fattore limitante per l'utilizzo del PHB, ovvero il suo alto costo di produzione che è dovuto per il 40% del costo totale alla materia prima [19]. Infatti, il prezzo minimo del PHB è stato stimato a circa 7,5 \$/kg per colture su glucosio e a 5,1 \$/kg per colture su siero di latte impiegando ceppi ingegnerizzati di *E. coli* [36]. Tuttavia, una diminuzione del costo potrebbe essere ottenuta tramite la ricerca di nuovi substrati a basso costo, quali substrati di scarto, il miglioramento dei processi di fermentazione e delle fasi di recupero e purificazione e tramite l'impiego di ceppi batterici capaci di accumulare alte concentrazioni di PHA [19], [37].

### 2.3. Biosintesi dei PHA

I poliidrossialcanoati sono accumulati da diversi microrganismi generalmente in condizioni di stress ambientale o nutrizionale [24], cioè quando nel mezzo di coltura vi è carenza di un nutriente essenziale (come ossigeno, azoto, fosforo, magnesio) e/o eccesso di carbonio [15]. I PHA vengono immagazzinati come corpi di inclusione in modo tale da aumentare la possibilità di sopravvivenza dei microrganismi stessi quando si trovano in condizioni non favorevoli alla loro normale crescita [38]. Infatti, quando la disponibilità di carbonio diminuisce, il microrganismo produttore di PHA inizia a utilizzare i polimeri carboniosi accumulati, degradandoli attraverso l'azione enzimatica: nel caso del PHA attraverso la PHA-depolimerasi, per ottenere nuovamente carbonio come fonte di energia [24], [39].

I PHA vengono sintetizzati dai batteri a partire da un'ampia varietà di substrati come risorse fossili (lignite, metano, carbone fossile), fonti rinnovabili (cellulosa, amido, saccarosio), prodotti chimici (acido 4-idrossibutirrico, acido propionico), sottoprodotti (glicerolo, melassa, siero di latte) e anidride carbonica [1]. In base alla tipologia e alla concentrazione della fonte di carbonio disponibile, la produzione e la composizione dei PHA prodotti varia: questo dipende dalle caratteristiche biochimiche e fisiologiche del microrganismo, oltre che dalle condizioni ambientali [6], [38].

Grazie alla ricerca e all'ingegneria genetica sono stati scoperti diversi *pathway* metabolici per la biosintesi dei PHA, ognuno adattato alla nicchia ecologica del microrganismo produttore [6]. La Figura 2.7 mostra le otto vie metaboliche note al giorno d'oggi. Si osserva che alcuni precursori per la sintesi dei monomeri dei PHA derivano dalla  $\beta$ -ossidazione o dalla sintesi *de novo* degli acidi grassi oppure dal ciclo di Krebs, partendo dall'acetil coenzima A (acetil-CoA).

In particolare, nella biosintesi degli scl-PHA sono presenti tre enzimi chiave:  $\beta$ -chetotiolasi (*phaA*), acetoacetil-CoA reduttasi (*phaB*) e PHA sintasi (*phaC*) [24], come è stato descritto con maggior dettaglio nel paragrafo 2.2. Questa via metabolica è stata trovata in *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas stutzeri* o *Aeromonas hydrophila* [24].

La PHA sintasi è l'enzima responsabile della polimerizzazione dell'acido idrossialcanoico e determina il tipo di PHA che viene sintetizzato dal microrganismo [29]. Infatti, la PHA sintasi è altamente specifica: in base al ceppo batterico impiegato, il tipo di poliestere prodotto cambia [40].

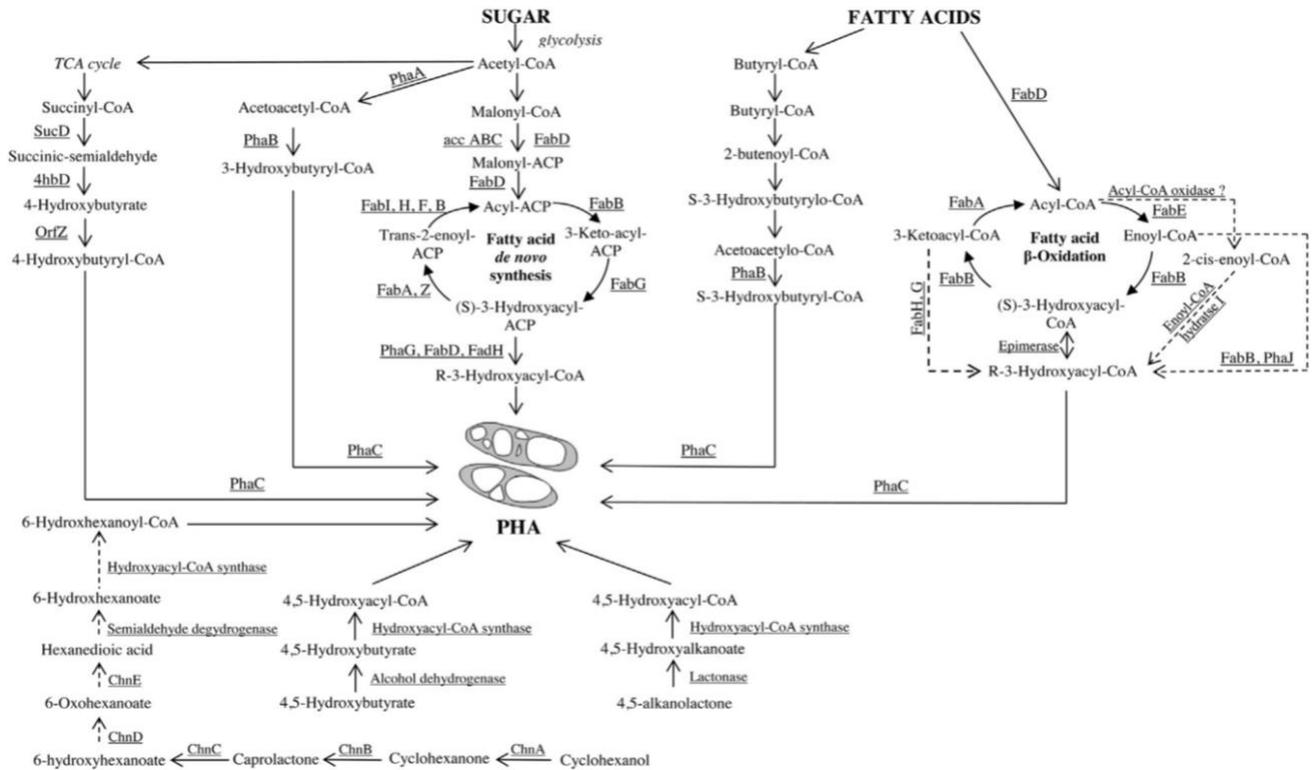


Figura 2.7. Tratta da [24]. Vie metaboliche per la biosintesi dei PHA.

### 2.3.1. Microrganismi produttori di PHA

Negli ultimi anni, centinaia di microrganismi sono stati identificati come produttori di PHA, tra cui Gram-positivi, Gram-negativi e Archaea [24].

Si è osservato che i produttori di poliidrossialcanoati risiedono in diverse nicchie ecologiche che vengono esposte in maniera naturale o accidentale a un alto quantitativo di materia organica e/o si trovano in condizioni di crescita limitanti, come i siti contaminati da idrocarburi, i fanghi attivi di impianti di trattamento, i rifiuti agricoli, lattiero-caseari o quelli provenienti dalle cartiere. Ad esempio, sono stati isolati da siti contaminati dal petrolio diversi ceppi batterici capaci di sintetizzare PHA mentre degradano il petrolio stesso. Essi appartengono ai generi *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Brochothrix*, *Yokenella*, *Acinetobacter*, *Caulobacter*, *Sphingobacterium* e *Burkholderia* [38].

Nel 1970, invece, è stato riportato il primo caso di accumulo di PHB all'interno di un Archaea, *Halobacterium marismortui*, trovato nel Mar Morto. Fu così scoperto che anche gli archeobatteri estremamente alofili sono in grado di produrre PHA in condizioni di carenza di nutrienti e di abbondanza di fonti di carbonio. Altri esempi sono *Halomonas boliviensis* LC1 [38] e *Haloferax mediterranei*, che è il miglior produttore di PHA tra gli archei alofili e anche il più noto (isolato per la prima volta in Spagna da stagni di acqua di mare in evaporazione) [15].

Altri produttori di PHA sono stati identificati negli *Streptomyces*, batteri filamentosi aerobi, Gram-positivi. Essi producono PHB sotto forma di granuli intracellulari con la funzione di riserva di carbonio per la sintesi di antibiotici e la produzione di spore [38].

Tuttavia, tra gli oltre 250 diversi produttori naturali di PHA, solo alcuni batteri sono stati impiegati a livello industriale per la biosintesi del biopolimero. Tra questi vi sono *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* e *Bacillus megaterium*, batteri capaci di produrre PHA impiegando diverse fonti di carbonio tra cui prodotti di scarto e oli vegetali [25].

*C. necator* è tra i ceppi batterici maggiormente studiati per la sua capacità di produrre grandi quantità di PHB a partire da fonti di carbonio semplici, come glucosio, fruttosio e acido acetico. Anche *A. latus* è in grado di utilizzare fonti di carbonio poco costose, come glucosio, saccarosio e melassa, per accumulare PHB con ottime rese (circa 88% del peso secco cellulare) [9], [16]. Invece, *P. oleovorans* è utilizzato per sintetizzare PHA di media lunghezza (mcl-PHA) partendo da diversi alcani, alcanoli o alcanoli [26].

I ceppi batterici che sintetizzano i PHA possono essere classificati in due gruppi in base alle condizioni di coltura necessarie per l'accumulo del biopolimero [9]. Nel primo gruppo sono presenti i batteri che richiedono la limitazione di un nutriente essenziale (ad esempio, ossigeno, azoto, fosforo) e l'eccesso di una fonte di carbonio per la sintesi di PHA; tali batteri non accumulano PHA durante la fase di crescita esponenziale. Alcuni batteri che appartengono a questo primo gruppo sono *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Methylobacterium organophilum* e *Rhodopseudomonas palustris*. *Pseudomonas putida* appartiene agli *Pseudomonas* rosa o fluorescenti ed è un produttore di mcl-PHA (polimerizza solamente 3-idrossialcanoati composti da 6-14 atomi di carbonio) [40]. Invece, *Methylobacterium organophilum* è in grado di sintetizzare PHA a partire dal metanolo; tuttavia, non si ottengono produzioni molto elevate (11% del peso secco cellulare). Rese maggiori sono state ottenute impiegando glucosio (53%) e saccarosio (40%). Infine, *Rhodopseudomonas palustris* è un batterio fotosintetico non sulfureo che utilizza diverse fonti di carbonio e azoto per produrre PHB e il copolimero P(3HB-co-3HV) [9].

Il secondo gruppo di batteri, invece, non necessita di alcuna limitazione di nutrienti per la produzione di PHA e può accumulare biopolimero durante la fase di crescita esponenziale. *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli* ricombinante e un ceppo mutante di *Azotobacter vinelandii* appartengono a questo gruppo [6], [9], [25].

Alcuni altri ceppi importanti che sono stati studiati includono *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Burkholderia sacchari*, *Bacillus cereus* SPV, *Azotobacter chroococcum* G-3 e *Sinorhizobium meliloti* [14], [28].

Tutti gli esempi di ceppi batterici sopra citati sono ceppi wild type e generalmente non presentano elevate rese in PHA. Per questo motivo, sono stati creati ceppi batterici geneticamente ingegnerizzati in grado di raggiungere in tempi brevi un'alta densità cellulare e di produrre PHA in maniera efficiente partendo da fonti rinnovabili e poco costose [25]. Batteri come *Escherichia coli* non sono capaci di sintetizzare o degradare i PHA, però crescono molto velocemente e sopportano alte temperature. Per questa serie di motivi, sono stati sviluppati ceppi ricombinanti di *E. coli* introducendo l'operone *phaCAB* di *Cupriavidus necator* [29].

L'obiettivo è quello di creare un ceppo ricombinante in grado di accumulare un alto contenuto di PHA e di crescere rapidamente. Inoltre, la semplice lisi delle cellule di *E. coli* e la sua capacità di utilizzare diverse fonti di carbonio, tra cui glucosio, saccarosio e lattosio, consentono un risparmio sui costi di produzione e purificazione dei granuli di PHA. Infatti, è possibile utilizzare substrati economici come il siero di latte e la melassa [1]. Grazie alla capacità di crescere e fermentare in un'ampia varietà di fonti di carbonio a basso costo, *E. coli* è considerato tra i migliori produttori commerciali di PHA. Inoltre, dal momento che *E. coli* non è un produttore naturale di PHA, esso non possiede una PHA depolimerasi intracellulare, di conseguenza non andrà a degradare il PHA prodotto [29].

Un ulteriore ceppo ricombinante ottenuto tramite l'ingegneria genetica è quello di *Cupriavidus necator* che porta il gene della PHA sintasi di *Aeromonas caviae*, batterio Gram-negativo in grado di produrre PHA dall'olio di palma [25].

Nel 1992 è stato dimostrato che i PHA possono essere prodotti anche all'interno di organismi eucarioti, per la precisione di piante transgeniche. Infatti, è stato osservato l'accumulo di PHB nel citoplasma delle cellule di *Arabidopsis thaliana*, precedentemente modificata per esprimere i geni dell'acetoacetil-CoA reduttasi e della PHB sintasi ricavati da *Cupriavidus necator* [16], [41]. Tuttavia, l'espressione di elevate quantità di acetoacetil-CoA reduttasi riduce considerevolmente la crescita delle piante transgeniche e la produzione dei semi rispetto al wild-type [16].

I cianobatteri sono un'altra categoria molto interessante di produttori di PHA. Essi sono procarioti fotoautotrofi che utilizzano la luce solare e l'anidride carbonica come fonti di energia e di carbonio e che possiedono naturalmente la PHA sintasi, enzima chiave per la produzione di PHA. Esempi di cianobatteri in grado di accumulare PHA, in particolare PHB, sono *Spirulina platensis* e *Synechocystis* sp. PCC6803 [25]. I PHA furono identificati per la prima volta all'interno dei cianobatteri nel 1966 in colture non pure [29].

Attualmente, i PHA vengono prodotti a livello industriale impiegando ceppi wild type o ingegnerizzati e substrati puri, ma la ricerca si sta concentrando anche sull'utilizzo di biotecnologie a coltura mista. Questo approccio si serve di consorzi microbici misti (MMC) in condizioni non sterili dove viene svolta un'ingegnerizzazione dell'ecosistema anziché del ceppo batterico: infatti, i microrganismi sono selezionati in base alle condizioni operative adoperate nel sistema biologico. In questo modo si ha una riduzione dei costi operativi legata alla non sterilità del sistema e alla possibilità di utilizzare prodotti di scarto come substrati [15]. Si può parlare perciò di economia circolare dal momento che dei composti di scarto vengono trasformati in risorse da utilizzare in altri processi produttivi.

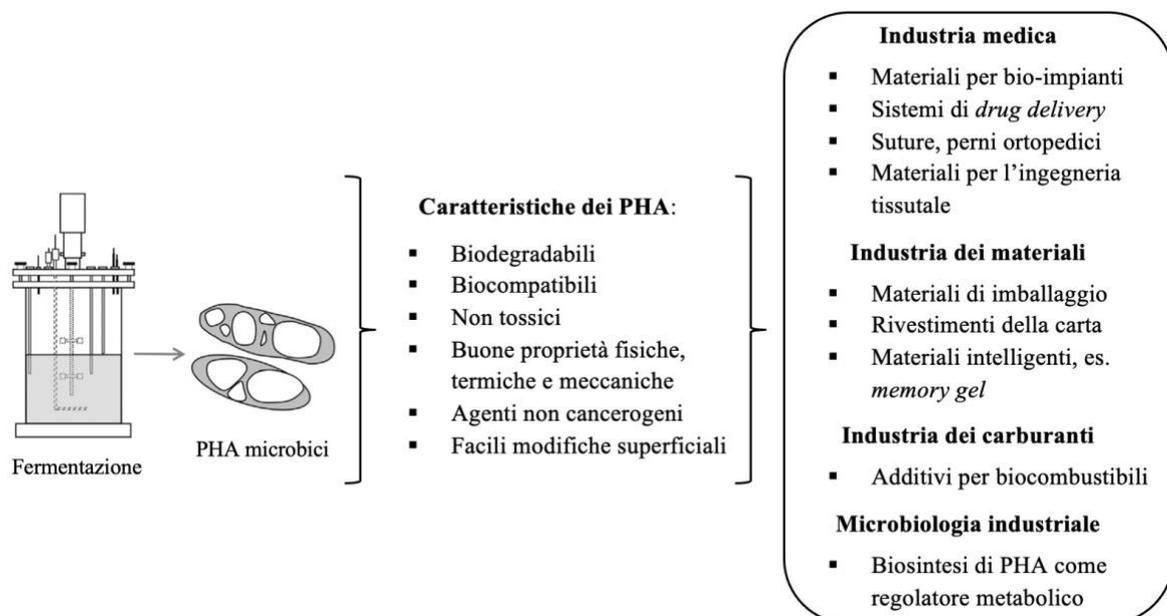
## 2.4. Applicazioni dei PHA

Grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà meccaniche, i PHA stanno guadagnando un'attenzione crescente come sostituti delle plastiche a base petrolchimica. Infatti, essi presentano un ampio range di potenziali applicazioni in diversi campi di ricerca e industriali (Figura 2.8), quali la produzione di materiali da imballaggio e l'utilizzo nei settori agricolo e, in particolare, biomedico e farmaceutico [6], [25].

Inizialmente, questi biopolimeri sono stati utilizzati nella produzione di imballaggi, soprattutto per borse e contenitori (ad esempio, bottiglie di shampoo), ma sono stati impiegati anche come materie prime per produrre vernici al lattice, adesivi a caldo, tessuto non tessuto e come fonti per la sintesi chimica di sostanze enantiomericamente pure, come ad esempio gli acidi idrossialcanoici [9], [24]. Inoltre, possono essere usati come vettori biodegradabili per il rilascio a lungo termine di medicine, ormoni, erbicidi o insetticidi [24], [16].

Negli ultimi anni, i PHA (in particolare il PHB e il copoliestere P(3HB-co-3HV)) sono stati utilizzati nell'industria medica e farmaceutica per la realizzazione di valvole cardiache e altri prodotti cardiovascolari, per il trattamento delle ferite (suture, bendaggi, tamponi), in ambito ortopedico (placche ossee, gabbie spinali) e nei sistemi di *drug delivery* [24]. In quest'ultimo caso i PHA servono per la produzione di compresse e microcapsule all'interno delle quali vengono incorporati i farmaci: quando il rivestimento polimerico inizia a degradarsi dopo l'assunzione, i farmaci vengono rilasciati [6]. Inoltre, il PHB è impiegato nell'ingegneria dei tessuti cartilaginei come *scaffold*, ossia come "impalcatura" articolare tridimensionale [9]. Questo è possibile grazie al fatto che i PHA sono caratterizzati da bassa tossicità, biodegradabilità e alta immunotolleranza [24]. Il PHB risulta essere compatibile con il sangue e i tessuti dei mammiferi; è stato infatti osservato che il PHB è un normale costituente del sangue umano in concentrazioni comprese tra 0,3 e 1,3 mM [12], [23].

I PHA possono essere utilizzati anche come biocarburanti in seguito a metil esterificazione [6]. Infine, i ceppi batterici produttori di PHA vengono impiegati per il bio-risanamento di siti contaminati dal petrolio, in quanto sono in grado di degradare gli inquinanti ambientali, minimizzandone l'impatto sull'ambiente [15].



**Figura 2.8.** Tratta da [24] e modificata. Potenziali applicazioni dei PHA.

In conclusione, i PHA rappresentano una valida alternativa alle plastiche convenzionali per diverse applicazioni, dal momento che sono biodegradabili e derivabili da materie di scarto. Tuttavia, il costo di sintesi di questi biopolimeri è ancora troppo elevato (4-7 \$/kg) e costituisce un ostacolo per l'espansione delle applicazioni dei PHA, che al momento vengono impiegati solamente nei campi in cui le plastiche di origine petrolchimica non sono adatte, come ad esempio in ambito medico [6], [28]. L'alto costo di produzione dipende dall'ancora elevato costo dei processi fermentativi, dal tipo di fonte di carbonio e soprattutto dalle tecnologie di recupero a valle del processo di sintesi [14], [6]. La ricerca quindi si sta concentrando sullo sviluppo di metodi innovativi più convenienti e sull'isolamento di ceppi batterici in grado di utilizzare substrati a basso costo (come siero di latte, melassa, acque reflue) per ricavare alte rese in PHA [9].

## 2.5. Cenni sui parametri fermentativi che influenzano la produzione di PHA

Al fine di migliorare la produzione di PHA e ottenere alte rese bisogna tener conto di quattro principali parametri fermentativi: la strategia di alimentazione, la disponibilità di nutrienti, il pH e la temperatura.

Nel 1958, Macrae e Wilkinson studiarono per la prima volta l'effetto delle condizioni di crescita sul metabolismo dei PHA per un ceppo di *B. megaterium*. Essi osservarono che la quantità di PHA accumulata aumentava all'aumentare del rapporto carbonio/azoto (C/N) [29]. Infatti, il rapporto C/N è una variabile molto importante da considerare durante la produzione di PHA dato che la sintesi di questi biopolimeri avviene generalmente in condizioni di crescita non bilanciate, ossia quando vi è una carenza di macronutrienti e un eccesso di carbonio all'interno del mezzo di coltura. Basse concentrazioni di azoto e fosforo favoriscono l'accumulo di PHA [38].

Parlando sempre di nutrienti, il tipo di substrato impiegato influenza la composizione dei polimeri prodotti. Ad esempio, se nella produzione del copolimero P(3HB-co-3HV) viene usato acetato come fonte di carbonio, si ha un maggior contenuto di idrossibutirrato (HB), se viene impiegato il propionato si ottengono più unità di idrossivalerato (HV) [42], mentre l'impiego del butirrato porta alla produzione di sole unità di HB [38].

Per quanto riguarda la strategia di alimentazione invece, essa diventa molto importante in particolare nella fermentazione *fed-batch*, in quanto è fondamentale mantenere la concentrazione di substrato presente nel mezzo di coltura all'interno di un range ottimale [43]. Infatti, le alte concentrazioni di substrato che vengono fornite in modalità *batch* sono da evitare in quanto possono causare inibizione riducendo la produzione di PHA [15].

La fermentazione *fed-batch* è il metodo maggiormente impiegato per ottenere alte densità cellulari che contengono elevate quantità di PHA [9]. Nel caso di ceppi batterici che necessitano una carenza di nutrienti e abbondanza di carbonio per la biosintesi di polimeri, è preferibile una coltivazione in due fasi: nella prima fase si ottiene la concentrazione desiderata di biomassa senza alcuna limitazione di nutrienti, nella seconda fase, invece, si mantiene la concentrazione di un nutriente essenziale in condizioni limitanti in modo da permettere la sintesi intracellulare di PHA. Questo metodo può essere applicato a *C. necator* portando l'azoto

o il fosforo a completo esaurimento [16]; per altri batteri invece è stato dimostrato che si hanno migliori produttività quando si ha la doppia limitazione di azoto e fosforo [15]. Per quanto riguarda i batteri che producono PHA senza una limitazione di nutrienti, è importante definire una strategia di alimentazione basata su una fonte di azoto complessa (peptone, estratto di lievito), in modo da garantire elevate rese di PHA [16].

È possibile effettuare anche fermentazioni con alimentazione di substrato in continuo. Questo metodo consente di ottenere ottimi risultati dato che si raggiunge una produttività duratura e si può evitare l'esaurimento di substrato che accade invece con la tecnica *fed-batch*.

Il pH è un altro fattore importante non solo per la produttività del PHA, ma anche per la sua composizione monomerica. Ad esempio, è stato osservato che aumentando il pH da 8,5 a 9,5 all'interno di reattori *batch* contenenti colture miste, il PHA prodotto presenta un maggior contenuto di monomeri di idrossivalerato (HV). Inoltre, condizioni operative a pH neutro (pH 7) portano a un accumulo maggiore di PHA rispetto a condizioni basiche (pH 9) o acide (pH 6) [38].

Infine, la temperatura di lavoro deve essere mantenuta a valori ottimali per la crescita del ceppo batterico impiegato per la produzione di PHA in modo da ottenere elevate rese. Studi effettuati su *P. aeruginosa* 47T2 hanno dimostrato che l'accumulo e la resa di PHA aumentano con la temperatura, fino a raggiungere un massimo a 37 °C, per poi diminuire a temperature più elevate [44].

Durante le prove sperimentali effettuate in questa tesi si è tenuto conto delle considerazioni appena esposte.



### 3. Cenni su *Cupriavidus necator* DSM 545

Il presente capitolo ha lo scopo di descrivere il ceppo batterico utilizzato durante la tesi: *Cupriavidus necator* DSM 545. Nel paragrafo 3.1 viene descritto il ceppo sottolineando le sue caratteristiche metaboliche e il motivo per cui è stato scelto, mentre il paragrafo 3.2 descrive l'influenza dell'acido acetico sul metabolismo del batterio presentando due esempi di prove di fermentazione trovati in letteratura.

#### 3.1. Caratteristiche metaboliche

*Cupriavidus necator* è un batterio Gram-negativo chemiolitoautotrofo facoltativo che si trova nel suolo e nell'acqua dolce, precedentemente noto come *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* o *Wautersia eutropha* [45], [46]. È stato isolato per la prima volta vicino a Gottingen, in Germania, ed è considerato uno dei microrganismi modello per la produzione industriale di PHA [47]. Infatti, è in grado di accumulare PHB fino al 90% del suo peso secco cellulare, sotto forma di inclusioni citoplasmatiche quando cresce in condizioni di non equilibrio, ossia di limitazione di alcuni nutrienti [48]. Oltre al PHB, *C. necator* è in grado di accumulare anche il copolimero P(3HB-co-3HV), se vengono aggiunti al terreno di fermentazione valerato, propionato oppure un altro substrato che può generare propionil-CoA [46]. In particolare, *C. necator* è stata la prima specie a essere stata utilizzata per la produzione di P(3HB-co-3HV) da Imperial Chemical Industries con il nome commerciale Biopol™ [24].

*C. necator* è un microrganismo metabolicamente versatile in grado di crescere su un'ampia varietà di substrati. Cresce in maniera eterotrofa utilizzando come fonte di carbonio ed energia carboidrati (fruttosio e N-acetilglucosamina), alcoli (ad esempio il glicerolo), acidi grassi volatili, come gli acidi acetico, butirrico e propionico (Figura 3.1), e anche oli vegetali (olio di palma, olio d'oliva e olio di mais [9]). Invece, in assenza di substrati organici cresce autotroficamente impiegando anidride carbonica, idrogeno molecolare e ossigeno. Inoltre, in condizioni anossiche, può utilizzare nitrati e nitriti come accettori di elettroni alternativi [49], [50].

La sintesi del PHB in *C. necator* avviene come è stato descritto in precedenza nel Capitolo 2 ed è mostrata nel dettaglio nella Figura 3.2, dove è illustrato anche il *pathway* metabolico di degradazione del biopolimero che avviene tramite l'azione degli enzimi PHA depolimerasi, D(-)-3-idrossibutirrato deidrogenasi, dipendente dal NADPH, e acetoacetyl-CoA sintetasi. Studi su *C. necator* hanno mostrato che esso degrada il PHB con un tasso di degradazione che è circa dieci volte più lento del tasso della sua produzione [29].

In questo ceppo batterico i geni necessari per la sintesi di PHA sono organizzati in un singolo operone come *phbCAB*, che codifica, rispettivamente per gli enzimi PHA sintasi,  $\beta$ -chetotiolasi, e acetoacetyl-CoA reduttasi [26]. Inoltre, in *C. necator* la sintesi di PHA non è legata alla crescita, infatti avviene principalmente nella fase stazionaria [51] e, come è già stato

detto, in presenza di una limitazione di nutrienti essenziali e/o di un eccesso della fonte di carbonio.

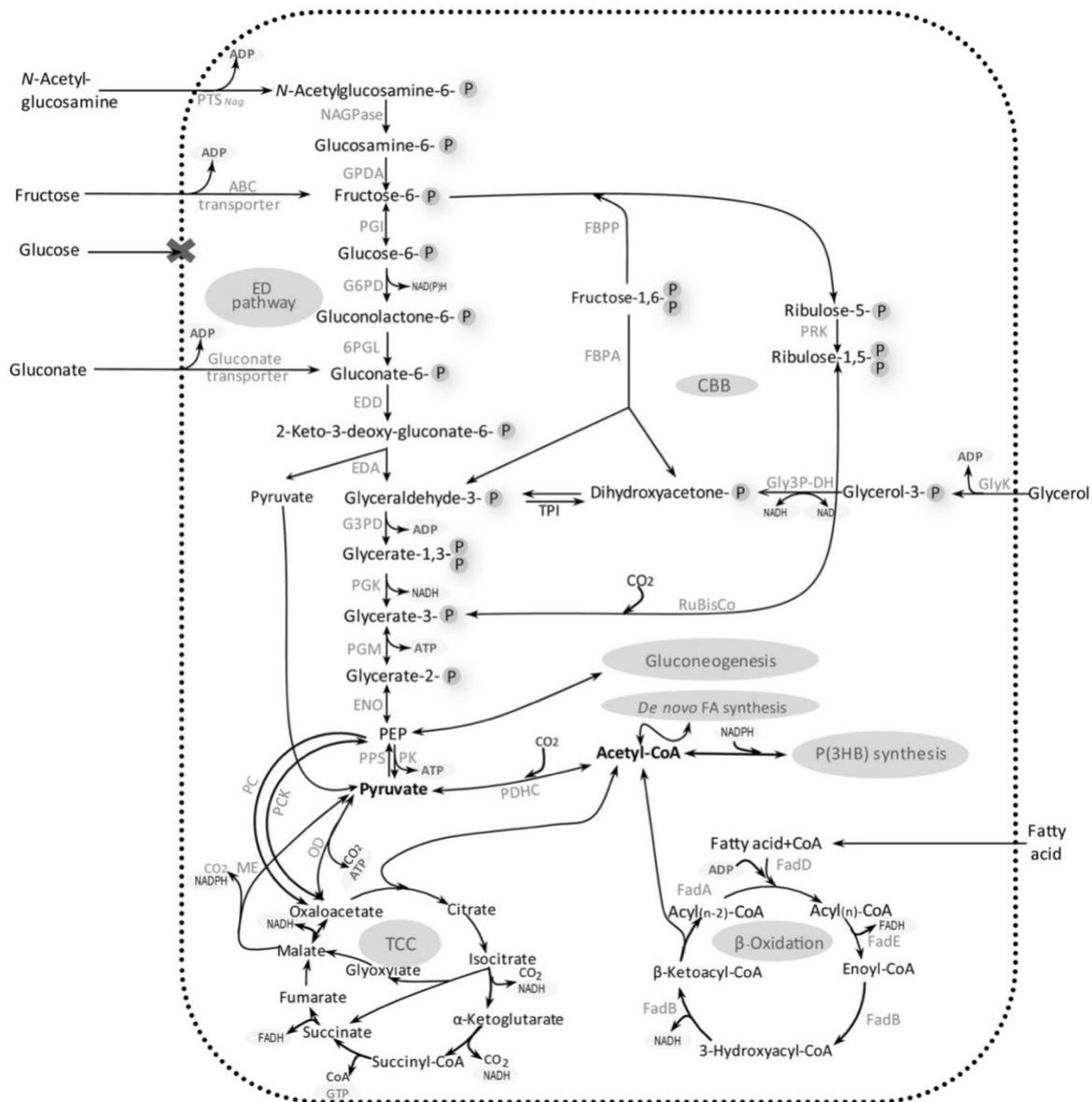
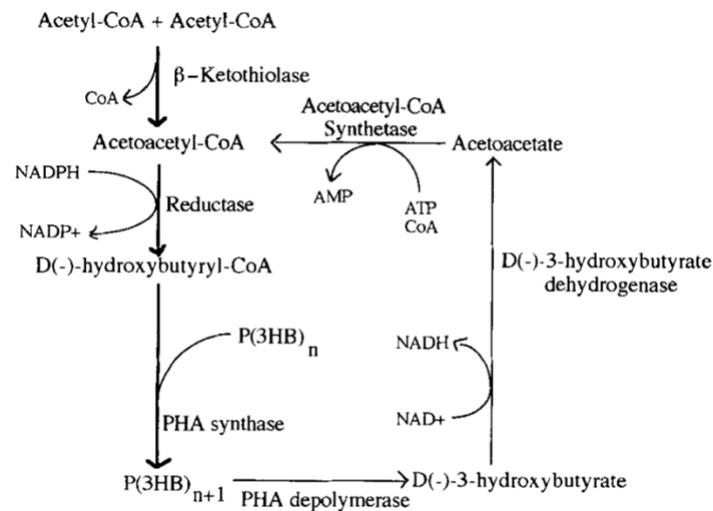


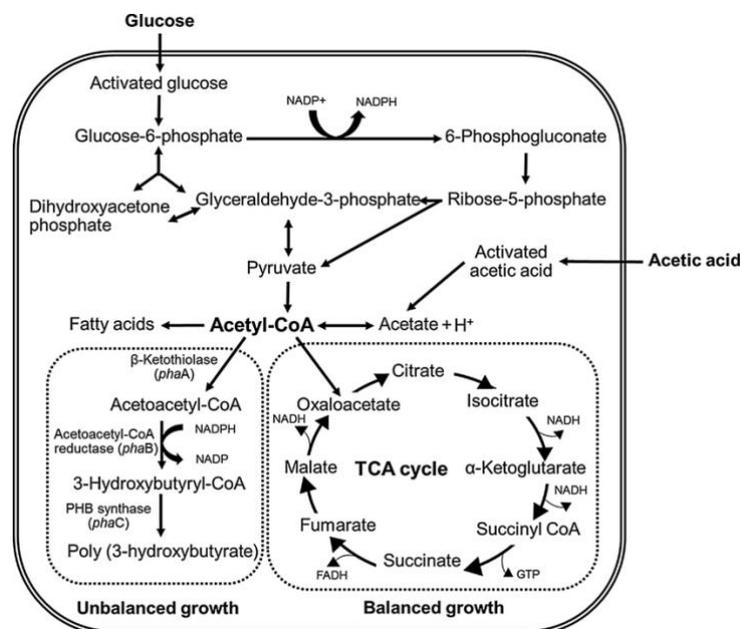
Figura 3.1. Tratta da [50]. Schema del metabolismo eterotrofo in *C. necator* DSM 529.

Nella Figura 3.1 si osserva anche che il ceppo wild type *C. necator* DSM 529 (noto anche come *Ralstonia eutropha* H16) non è in grado di utilizzare il glucosio come fonte di carbonio per la produzione di PHB, in quanto è privo di alcuni importatori, ossia di proteine di membrana per il passaggio di glucosio. Per questo motivo, nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato un ceppo mutato, *Cupriavidus necator* DSM 545, che è in grado di crescere su substrati a base di glucosio e fruttosio, dal momento che i retentati zuccherini impiegati nelle prove di fermentazione sono composti da questi due zuccheri.

Infatti, *C. necator* DSM 545 esprime in maniera costitutiva il gene dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, ciò significa che è sempre svolta la trasformazione di glucosio-6-fosfato in 6-fosfogluconato che produce NADPH, cofattore di uno degli enzimi che sintetizzano il PHB (acetoacetyl-CoA reductasi) (Figura 3.3). In questo modo il ceppo mutato è in grado di utilizzare il glucosio come fonte di carbonio.



**Figura 3.2.** Tratta da [26]. Via metabolica per la sintesi e la degradazione del PHB in *C. necator*.



**Figura 3.3.** Tratta da [34]. Via metabolica per la produzione di PHB da glucosio e acido acetico.

In base a quanto esposto, al momento, risulta che la fermentazione batterica di *C. necator* sia la scelta più conveniente e che consente l'utilizzo di un'ampia varietà di substrati.

### 3.2. Influenza dell'acido acetico sulla produzione di PHB

Le prove di fermentazione con induzione con acetato di sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) che sono state eseguite in questa tesi si basano principalmente sugli esperimenti svolti da Wang e Yu in [52] e da Marudkla et al. in [34].

L'acetato di sodio è il sale di sodio dell'acido acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e quando è sciolto in acqua si dissocia come mostrato nella Formula 3.1:



Successivamente, lo ione acetato  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  dà reazione di idrolisi basica formando acido acetico e ioni ossidrili (Formula 3.2):



Come detto in precedenza, l'acido acetico può essere utilizzato come substrato di crescita da *C. necator* per la sintesi di PHB. In particolare, possono essere impiegati rifiuti organici industriali e municipali per produrre PHA in processi a due fasi: nella prima fase, i rifiuti organici vengono degradati in acidi organici, tra cui l'acido acetico, in condizioni anaerobiche, mentre nella seconda fase (in un secondo reattore) gli acidi vengono utilizzati per produrre PHA da microrganismi produttori di biopolimeri, come ad esempio *C. necator* [52]. Il processo, quindi, si introduce in un contesto di economia circolare e consente di risparmiare sulla fonte di carbonio, andando a ridurre il costo di produzione dei PHA. Inoltre, l'eventuale utilizzo di anidride carbonica di scarto nella prima fase contribuirebbe all'abbattimento dell'emissione e alla valorizzazione di questa fonte gassosa di carbonio.

Wang e Yu hanno studiato l'influenza dell'acetato sulla crescita di *C. necator* e sulla sua produzione di PHB. Hanno aggiunto al terreno di coltura (costituito da estratto di lievito, peptone e solfato d'ammonio) acetato di sodio in diverse concentrazioni e in diversi momenti durante la fermentazione, quindi in questo caso l'acetato è la principale fonte di carbonio. Alla fine degli esperimenti hanno osservato che quando l'acetato viene aggiunto all'inizio della prova, il batterio riesce a crescere utilizzando gradualmente questo substrato quando è presente in concentrazioni  $< 3$  g/L, a valori maggiori invece inizia l'effetto inibitorio dell'acetato e a concentrazioni  $\geq 6$  g/L non si osserva più alcuna crescita.

Quando, invece, l'acetato viene aggiunto durante la fase di crescita stazionaria, *C. necator* è in grado di crescere e accumulare PHB sopportando anche concentrazioni di acetato di 15 g/L [52]: in questo caso l'acetato viene utilizzato in maniera efficiente dal batterio raggiungendo maggiori contenuti sia di biomassa sia di PHB rispetto al caso precedente. Questo potrebbe essere dovuto proprio al fatto che l'acetato è stato aggiunto durante la fase stazionaria di crescita, ossia quando nel terreno di coltura è già presente un'elevata concentrazione di cellule rispetto all'inizio della prova quando la concentrazione di cellule invece è quasi nulla. L'alta concentrazione cellulare potrebbe quindi aver favorito la tolleranza a elevate concentrazioni di acetato [52].

Infine, quando l'acetato viene aggiunto durante la fase di crescita esponenziale, non si sono notate differenze rilevanti in fatto di concentrazione di biomassa rispetto alle prove in cui

l'acetato è stato aggiunto durante la fase stazionaria, mentre la produzione di PHB era inferiore nelle cellule in fase esponenziale.

In conclusione, Wang e Yu hanno osservato che l'acetato presenta un forte effetto inibitorio su *C. necator*, ma questo può essere minimizzato mantenendo un'elevata concentrazione cellulare e una concentrazione di acetato  $< 3$  g/L se si vuole utilizzare questo substrato come fonte di carbonio per la produzione di PHB.

Marudkla et al., invece, hanno studiato la crescita di *C. necator* DSM 545 e la sua produzione di PHB in un mezzo di coltura contenente glucosio come fonte di carbonio principale a cui sono state aggiunte concentrazioni diverse di acido acetico (da 0,5 g/L a 2 g/L) fin dall'inizio della prova di fermentazione. In tutte le prove eseguite, la crescita batterica presentava un andamento caratterizzato da una lenta crescita iniziale (fase lag), seguita da un rapido aumento della concentrazione di biomassa (fase esponenziale) e infine da una fase stazionaria: si è osservato che la durata della fase lag aumentava all'aumentare della concentrazione di acido acetico. La produzione di PHB presentava un andamento simile a quello della biomassa e si è notato che iniziava ad accumularsi principalmente dopo che la fonte di azoto (solfato d'ammonio) iniziava a esaurirsi [34].

A fronte di ciò, i ricercatori hanno osservato che la crescita di *C. necator* DSM 545 risultava inibita a concentrazioni di acido acetico  $> 0,5$  g/L, mentre al di sotto di tale concentrazione l'acido acetico si comportava come promotore della crescita [34].

Le prove sperimentali descritte in seguito (Capitolo 5) sono state eseguite tenendo conto dei risultati appena esposti.



## 4. Materiali

In questo quarto capitolo sono presentati il ceppo batterico, le soluzioni, i terreni di crescita e di fermentazione e la strumentazione utilizzati per condurre le prove sperimentali.

### 4.1. Ceppo batterico

Il ceppo batterico che è stato usato in questo lavoro di tesi è *Cupriavidus necator* DSM 545, il quale esprime in maniera costitutiva il gene dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, rispetto al ceppo di riferimento wild type *Cupriavidus necator* DSM 529.

Per la conservazione dello stock batterico ( $OD_{600} = 2,5$ ) è stata adoperata una soluzione all'87% di glicerolo ( $C_3H_8O_3$ ) Sigma-Aldrich®.

### 4.2. Terreni di coltura

Per la crescita di *C. necator* DSM 545 sono necessari tre differenti terreni di coltura, la cui composizione è stata ricavata da letteratura [43] ed è illustrata di seguito.

Per la precoltura I è stato utilizzato il terreno di LB (*Liquid Broth*) che contiene i composti indicati nella Tabella 4.1.

**Tabella 4.1.** Composizione del terreno di LB.

	g/L
NaCl	10
Tryptone	10
Estratto di lievito	5

Per il terreno di LB sono stati impiegati cloruro di sodio ( $NaCl$ ,  $\geq 99,5\%$ ) Sigma-Aldrich®, digestato enzimatico di triptone da caseina Sigma-Aldrich® ed estratto di lievito Sigma-Aldrich®. Dopo la sua preparazione, il terreno di LB è stato sterilizzato in autoclave a  $121\text{ }^\circ\text{C}$  e 1 bar per 20 min.

Il terreno della precoltura II invece è costituito dai composti indicati nella Tabella 4.2. Il glucosio utilizzato è D-(+)-glucosio ( $C_6H_{12}O_6$ , in polvere) Sigma-Aldrich® oppure il retentato zuccherino demineralizzato. Inoltre, sono stati utilizzati solfato d'ammonio ( $(NH_4)_2SO_4$ ,  $\geq 99,0\%$ ) Sigma-Aldrich®, diidrogenofosfato di potassio ( $KH_2PO_4$ ,  $\geq 98,0\%$ ) Sigma-Aldrich®, fosfato di sodio dibasico ( $Na_2HPO_4$ ,  $\geq 99,0\%$ ) Sigma-Aldrich® e solfato di magnesio eptaidrato ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) Sigma-Aldrich®.

**Tabella 4.2.** Composizione del terreno della precoltura II.

Glucosio	10	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,74	g/L
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,2	g/L
Trace element	10	mL/L

Infine, per la fermentazione è stato utilizzato un terreno contenente i composti indicati nella Tabella 4.3. In questo caso, la fonte di carbonio è costituita da una miscela al 50% di glucosio e al 50% di fruttosio (impiegando soluzioni con concentrazione 100 g/L preparate da D-(+)-glucosio Sigma-Aldrich® e da D-(-)-fruttosio (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) Sigma-Aldrich® disciolti in acqua deionizzata Merck®) oppure dal retentato zuccherino demineralizzato e isomerizzato.

**Tabella 4.3.** Composizione del terreno di fermentazione.

Fonte di C	12	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,74	g/L
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,2	g/L
Trace element	10	mL/L

La soluzione di trace element presente nel terreno della precoltura II e in quello di fermentazione presenta la composizione mostrata nella Tabella 4.4.

**Tabella 4.4.** Composizione della soluzione di trace element.

FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	10	g/L
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2,25	g/L
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	1	g/L
MnSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0,5	g/L
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	2	g/L
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> •10H <sub>2</sub> O	0,23	g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1	g/L
HCl 35%	10	mL/L

Per preparare i trace element sono stati impiegati: solfato di ferro(II) eptaidrato ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ) Sigma-Aldrich®, solfato di zinco eptaidrato ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich®, solfato di rame(II) pentaidrato ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98,0\%$ ) Sigma-Aldrich®, solfato di manganese pentaidrato ( $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich®, cloruro di calcio diidrato ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ) Sigma-Aldrich®, tetraborato di sodio decaidrato ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich®, eptamolibdato di ammonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) Sigma-Aldrich® e acido cloridrico (HCl, 37%) Sigma-Aldrich®. Inoltre, è stato utilizzato idrossido di sodio (NaOH, pellet anidro) Sigma-Aldrich® con una concentrazione 5 M per portare il pH finale della soluzione di trace element a un valore di 6,8. Infine, la soluzione è stata sterilizzata usando filtri in polieterosolfone (PES) da 0,2  $\mu\text{m}$ .

Il solfato d'ammonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , il diidrogenofosfato di potassio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e il fosfato di sodio dibasico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  presenti nei terreni della precoltura II e di fermentazione sono stati disciolti con acqua deionizzata Merck® all'interno della stessa soluzione, che è quella con cui si portano a volume i terreni di coltura. Tale soluzione, il solfato di magnesio eptaidrato ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e la soluzione di D-(+)-glucosio sono stati sterilizzati separatamente in autoclave a 121 °C e 1 bar per 20 min; la soluzione di D-(-)-fruttosio invece è stata sterilizzata con filtri sterili in PES da 0,2  $\mu\text{m}$ .

Durante le prove di fermentazione in bioreattore, per regolare il pH dei terreni di coltura sono stati impiegati acido cloridrico al 10% (HCl, 37%) Sigma-Aldrich®, acido fosforico 0,5 M ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%) Sigma-Aldrich® e idrossido di sodio 3 M oppure 5 M (NaOH, pellet anidro) Sigma-Aldrich®. Invece, per il controllo della schiuma è stato utilizzato l'antischiuma 204 (emulsione acquosa per sistemi batterici e mammiferi, 100%) Sigma-Aldrich® diluito allo 0,01% con acqua deionizzata Merck®.

#### 4.2.1. Fonti di carbonio

Nelle prove eseguite sono stati impiegati come fonti di carbonio D-(+)-glucosio ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) Sigma-Aldrich®, D-(-)-fruttosio ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) Sigma-Aldrich® e due tipologie di retentati industriali zuccherini provenienti da un'azienda produttrice di amidi e prodotti amidacei (Sedamyl S.p.A.): un retentato solo demineralizzato costituito principalmente da destrosio (96,97%) e caratterizzato da una concentrazione di 250 g/L e un retentato demineralizzato e isomerizzato composto al 46,39% da destrosio e al 48,21% da fruttosio e con una concentrazione di 340 g/L.

Il D-(+)-glucosio Sigma-Aldrich® e il D-(-)-fruttosio Sigma-Aldrich® sono stati sciolti separatamente in acqua deionizzata Merck® per preparare delle soluzioni con concentrazione 100 g/L (concentrate 10x).

Inoltre, è stato utilizzato acetato di sodio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) Sigma-Aldrich® per preparare una soluzione 200 g/L in acqua deionizzata Merck® da impiegare nelle prove di induzione della crescita di *C. necator* DSM 545.

### 4.3. Estrazione di PHB

Per l'estrazione di PHB sono stati utilizzati acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96%) Sigma-Aldrich® e un bagno a olio silconico ([-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O-]<sub>n</sub>) Sigma-Aldrich®. Inoltre, i campioni ottenuti dal processo di estrazione sono stati diluiti con acqua deionizzata Merck® e filtrati con filtri non sterili in PES da 0,2 µm.

### 4.4. Strumentazione

Durante le prove sperimentali è stata impiegata la seguente strumentazione:

- Spettrofotometro UV-Vis/NIR V-730 JASCO per la misura della densità ottica a 600 nm delle colture batteriche;
- pHmetro da banco XS pH50 per misurare il pH dei terreni di fermentazione delle prove eseguite in beuta;
- Incubatore ES-20/60 Savatec con agitazione orbitale;
- Mini centrifuga da banco Fisherbrand™ per la centrifugazione dei campioni inseriti all'interno di Eppendorf™;
- Autoclave da banco 760 Savatec per la sterilizzazione delle soluzioni, dei terreni di crescita e delle beute;
- Autoclave verticale Raypa per sterilizzare il bioreattore;
- HPLC Prominence Shimadzu per l'analisi cromatografica dei campioni prelevati durante le prove;
- Bioreattore Biostat® A Sartorius da 1 L.

## 5. Metodi

Nel presente capitolo vengono presentate le procedure impiegate durante la fase sperimentale. Nel paragrafo 5.1 vengono descritti i procedimenti utilizzati per le prove di fermentazione in beuta: vengono illustrati la preparazione dell'inoculo, le prove eseguite e l'induzione con acetato di sodio. Nel paragrafo 5.2 è presentato il processo fermentativo svolto in bioreattore ponendo l'attenzione sulla preparazione dell'inoculo, sui parametri adottati, sulla strategia di alimentazione del substrato e sull'induzione con acetato di sodio. Vengono poi esposte la preparazione della biomassa e del surnatante (paragrafo 5.3), l'estrazione del PHB (paragrafo 5.4) e le analisi tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (paragrafo 5.5). Infine, nel paragrafo 5.6 viene presentata la modellazione matematica che è stata elaborata per lo studio della crescita batterica.

### 5.1. Fermentazione in beuta

Le prove di fermentazione in beuta sono state effettuate in triplicato sperimentale con l'obiettivo di osservare l'andamento della crescita di *C. necator* DSM 545 e della sua produzione di PHB quando vengono forniti diversi substrati all'interno del mezzo di coltura (glucosio, fruttosio, retentati zuccherini, acetato di sodio). Si tratta di passaggi preliminari, necessari a svolgere le successive prove di fermentazione in bioreattore.

#### 5.1.1. Preparazione dell'inoculo

Lo stock batterico è conservato utilizzando una concentrazione di glicerolo al 30% in un volume di 1 mL. I batteri cresciuti in LB vengono conservati in glicerolo solo dopo aver raggiunto la fase di crescita esponenziale. Per lo stoccaggio a -20 °C si utilizzano criovial da 2 mL [43].

Per la precoltura I ( $OD_{600} = 0,1$ ), 200  $\mu$ L di stock batterico ( $OD_{600} = 2,5$ ) sono stati aggiunti a 5 mL di terreno di LB (Tabella 4.1) utilizzando una falcon da 50 mL e incubati a 30 °C per 24 h a 200 rpm. Successivamente, 1 mL di precoltura I è stato aggiunto a 50 mL di terreno della precoltura II (Tabella 4.2) all'interno di una beuta da 250 mL; la coltura è stata lasciata crescere in incubatore a 30 °C e 200 rpm per 24 h. Dopodiché, la precoltura II è stata utilizzata per inoculare 200 mL di terreno per la fermentazione (Tabella 4.3) in beute da 1 L [43]. Il volume  $V_i$  (in mL) di batteri prelevato dalla precoltura II è stato calcolato in modo da partire da un valore di  $OD_{600}$  ( $C_f$ ) pari a 0,1 con la Formula 5.1:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \quad (5.1)$$

dove  $C_i$  è la densità ottica a 600 nm di un campione della precoltura 2 (misurata tramite spettrofotometro) e  $V_f$  è il volume di lavoro pari a 200 mL.

Anche per la fermentazione sono state utilizzate le stesse condizioni di incubazione delle precedenti colture: temperatura di 30 °C e 200 rpm [43], per un tempo di totale di 44-48 h durante le quali, periodicamente, sono stati prelevati dei campioni da circa 7 mL.

I campioni raccolti durante l'intera fermentazione in beuta sono stati analizzati misurandone il pH e la densità ottica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) per determinare in maniera approssimativa la crescita cellulare. In un secondo momento, i campioni sono stati sottoposti alla determinazione della concentrazione della biomassa e del surnatante<sup>1</sup> e alla procedura di estrazione del PHB<sup>2</sup>.

### 5.1.2. Prove effettuate

Inizialmente, sono state svolte tre prove utilizzando le soluzioni preparate separatamente con il D-glucosio Sigma-Aldrich® e il D-fruttosio Sigma-Aldrich®, entrambe utilizzate ad una concentrazione iniziale di 100 g/L.

Queste prove di fermentazione sono state effettuate per osservare la crescita di *C. necator* DSM 545 e la sua produzione di PHB all'interno di terreni in cui la fonte di carbonio è composta al 100% da glucosio, al 100% da fruttosio oppure al 50% da glucosio e 50% da fruttosio. Inoltre, i risultati ottenuti da questi esperimenti sono serviti per confrontare il comportamento del batterio quando gli vengono alimentati i retentati zuccherini e quando la sua crescita viene indotta con l'acetato di sodio.

Tutte le prove sono state eseguite in triplicato sperimentale impiegando la soluzione di D-glucosio 100 g/L nel terreno della precoltura II, dove la concentrazione di glucosio desiderata è di 10 g/L (come indicato in Tabella 4.2), su un volume di lavoro di 50 mL.

La differenza tra i tre esperimenti svolti risiede nella fonte di carbonio utilizzata nel terreno di fermentazione. Infatti, nella prima prova è stata utilizzata la soluzione di D-glucosio 100 g/L con una concentrazione finale di 12 g/L (come visto nella Tabella 4.3) su 200 mL totali di terreno; nella seconda prova la soluzione di D-fruttosio 100 g/L è stata aggiunta all'interno delle beute per avere la concentrazione finale di 12 g/L; infine, nella terza prova si è scelto di aggiungere sia la soluzione di D-glucosio 100 g/L che quella di D-fruttosio 100 g/L, in pari quantitativo, in modo da avere all'interno del terreno di fermentazione una concentrazione finale di 12 g/L di fonte di carbonio (6 g/L di glucosio e 6 g/L di fruttosio).

Successivamente, è stata eseguita una prova in duplicato sperimentale utilizzando i retentati zuccherini. Nel terreno della precoltura II è stato impiegato il retentato demineralizzato 250 g/L (contenente principalmente destrosio) per avere la concentrazione finale di 10 g/L su 50 mL di volume totale, mentre nel terreno di fermentazione è stato aggiunto il retentato isomerizzato 340 g/L, in modo da ottenere la concentrazione desiderata di 12 g/L in 200 mL di volume.

---

<sup>1</sup> Si veda paragrafo 5.3.

<sup>2</sup> Si veda paragrafo 5.4.

### 5.1.3. Induzione con acetato di sodio

Sono state effettuate delle prove di fermentazione in beuta inducendo la crescita di *C. necator* DSM 545 con acetato di sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ) con l'obiettivo di osservare la variazione della produzione di PHB, come già osservato da una prima analisi in letteratura [34], [52].

Per trovare la concentrazione ottimale di acetato di sodio, che non andasse a inibire la crescita batterica, come noto in letteratura, sono state effettuate delle prove preliminari in duplicato con diverse concentrazioni di acetato di sodio (1, 2, 3 e 5 g/L, ricavate da letteratura [52]). L'acetato è stato aggiunto al terreno di fermentazione contenente la miscela al 50% di D-glucosio Sigma-Aldrich® 100 g/L e 50% di D-fruttosio Sigma-Aldrich® 100 g/L, dove la concentrazione finale di fonte di carbonio è 12 g/L. L'induzione è stata effettuata in due tempi diversi: la prima durante la fermentazione dopo 15 ore di crescita, ossia quando il batterio si trova nella fase esponenziale; la seconda all'inizio della fermentazione (tempo zero,  $t = 0$  h) per osservare eventuali differenze dell'azione dell'acetato sul batterio in tempi diversi di crescita.

Per quel che riguarda l'induzione al tempo zero, l'acetato di sodio è stato aggiunto direttamente al terreno di fermentazione in concentrazioni di 1, 2 e 3 g/L. La concentrazione di 5 g/L non è stata più considerata, in quanto si era già precedentemente osservata una forte inibizione della crescita già a 15 ore, quando il batterio in fase esponenziale è metabolicamente più predisposto ad utilizzarlo come substrato (Capitolo 6). Anche in questa prova è stata utilizzata come fonte di carbonio nel terreno di fermentazione la miscela al 50% D-glucosio e 50% D-fruttosio.

Infine, è stata realizzata una prova in duplicato utilizzando entrambi i retentati zuccherini Sedamyl: il primo, solo demineralizzato, contenente circa 100% destrosio e altri microelementi, il secondo, demineralizzato e isomerizzato, con una composizione di circa 50% destrosio e 50% fruttosio. Nella precoltura II è stato impiegato il retentato demineralizzato 250 g/L per ottenere la concentrazione di 10 g/L in 50 mL di mezzo di coltura, mentre nel terreno di fermentazione è stato aggiunto il retentato demineralizzato e isomerizzato 340 g/L in 200 mL di volume totale per avere la concentrazione desiderata di 12 g/L. L'acetato è stato aggiunto al tempo zero alla concentrazione determinata in base alle prove precedenti.

## 5.2. Fermentazione in bioreattore

Le prove di fermentazione in bioreattore sono state eseguite utilizzando un reattore da 1 L (Biostat® A, Sartorius) con un volume di lavoro  $V_L = 0,6$  L.

### 5.2.1. Preparazione dell'inoculo

Per la preparazione dell'inoculo ( $OD_{600} = 0,1$ ), 200  $\mu$ L di stock batterico ( $OD_{600} = 2,5$ ) sono stati aggiunti a 5 mL di terreno di LB (Tabella 4.1) all'interno di una falcon da 50 mL che è stata successivamente incubata per 24 h a 30 °C e 200 rpm. Dalla coltura così ottenuta (precoltura I) è stato prelevato 1 mL che è stato utilizzato per inoculare 50 mL di terreno della

precoltura II (Tabella 4.2) all'interno di una beuta da 250 mL; la coltura è stata poi posta nell'incubatore a 30 °C e 200 rpm per 24 h [43]. A questo punto, 600 mL ( $V_f$ ) di terreno per la fermentazione (Tabella 4.3) sono stati inoculati con un volume  $V_i$  di precoltura II all'interno del reattore da 1 L, precedentemente sterilizzato in autoclave a 121 °C e 1 bar per 20 min. Il volume  $V_i$  è stato calcolato con la Formula 5.1 in modo tale da iniziare la prova con  $OD_{600} = 0,1$  ( $C_f$ ).

### 5.2.2. Parametri del reattore e strategia di alimentazione

Tutte le prove in reattore sono state effettuate impiegando i retentati zuccherini Sedamyl. Nel terreno della precoltura II è stato inserito il retentato demineralizzato 250 g/L per avere la concentrazione finale di 10 g/L su 50 mL di volume, mentre per la fermentazione è stato utilizzato il retentato demineralizzato e isomerizzato 340 g/L in modo che la concentrazione finale fosse di 12 g/L su 0,6 L di volume di lavoro.

Durante le prove sono stati impostati i seguenti parametri:

- Temperatura a 30 °C, garantita grazie alla presenza di una camicia esterna;
- Pressione di 1 atm;
- Agitatore a 250 rpm (è stato utilizzato un agitatore Rushton);
- pH a 6.8, mantenuto costante utilizzando HCl al 10% oppure H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M come acidi e NaOH 3 M come base;
- Portata di aria compressa di 250 cm<sup>3</sup>/min;
- Utilizzo dell'antischiuma 204 allo 0,01%;
- Volume di lavoro  $V_L = 0,6$  L.

I valori impiegati di portata dell'aria compressa e di volume di lavoro definiscono un rapporto tra la portata d'aria e il volume di lavoro ( $vvm$ ) di 25 h<sup>-1</sup>, calcolato con la Formula 5.2:

$$vvm = \frac{\text{Portata di aria} \left( \frac{L}{\text{min}} \right)}{\text{Volume di lavoro (L)}} = \frac{\left( 250 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}} \right) \cdot \left( 0,001 \frac{L}{\text{cm}^3} \right)}{0,6 L} = 0,417 \text{ min}^{-1} = 25 \text{ h}^{-1} \quad (5.2)$$

Innanzitutto, è stata eseguita una prova in *batch* che è stata portata avanti per 44 ore. Durante la prova sono stati prelevati periodicamente dei campioni di 7-10 mL che sono stati analizzati per monitorare la velocità di consumo dei substrati durante la fase esponenziale e quella stazionaria. Tale procedura è stata svolta con il fine di determinare le tempistiche di alimentazione per la successiva prova di fermentazione in *fed-batch*. I campioni sono stati analizzati anche per determinare la concentrazione della biomassa e del surnatante e per estrarre il PHB.

La prova in *fed-batch* è stata realizzata per una durata totale di 44 ore eseguendo un'alimentazione esponenziale, ossia durante la fase di crescita esponenziale il substrato è stato aggiunto in base al suo consumo [43]. Questo è stato effettuato utilizzando la funzione

“*harvest-feed*” del bioreattore Sartorius Biostat® A, che consente di prelevare 10 mL di terreno all’interno dell’apposita provetta, aggiungere manualmente il substrato e reinserire automaticamente il terreno all’interno del reattore. Il cosiddetto *feeding* è stato effettuato due volte: dopo 15 e 20 ore dall’inizio della fermentazione, ossia quando il batterio si trova ancora nella fase esponenziale di crescita. Come soluzione di alimentazione è stato utilizzato il retentato zuccherino demineralizzato e isomerizzato (340 g/L). La quantità di retentato ( $V_{feed}$ ) necessaria a mantenere la concentrazione di substrato costante è data dalla quantità di substrato consumato ( $C_{substrato} \cdot V_L$ ) (g di substrato) divisa per la concentrazione della soluzione di alimentazione  $C_{feed}$  (g/L) ed è stata calcolata con la Formula 5.3:

$$V_{feed} = \frac{C_{substrato} \cdot V_L}{C_{feed}} \quad (5.3)$$

dove  $C_{feed}$  è pari a 340 g/L,  $V_L$  è il volume di lavoro (0,6 L) e  $C_{substrato}$  è stato ricavato dalle analisi tramite HPLC dei campioni prelevati durante la prova di fermentazione in *batch* (Capitolo 6).

### 5.2.3. Induzione con acetato di sodio

In seguito alla prova eseguita in *fed-batch* utilizzando il retentato demineralizzato e isomerizzato, sono state effettuate due prove di fermentazione in *fed-batch* con lo stesso substrato e con acetato di sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ) 2 g/L. Tali prove hanno avuto una durata di fermentazione di 44 ore.

Nella prima prova, l’induzione è stata effettuata al tempo zero, aggiungendo l’acetato di sodio 100 g/L direttamente nel terreno di fermentazione ( $V_L = 0,6$  L) in modo da avere una concentrazione finale di 2 g/L all’interno del mezzo di coltura.

In una seconda prova, invece, l’acetato di sodio è stato aggiunto dopo 15 ore dall’inizio della fermentazione, quindi durante la fase esponenziale di crescita del batterio. Anche in questo caso, l’acetato di sodio 100 g/L è stato aggiunto con il fine di ottenere la concentrazione desiderata di 2 g/L.

In entrambe le prove sono stati effettuati due *feeding* utilizzando il retentato demineralizzato e isomerizzato (340 g/L): il primo dopo 15 ore e il secondo dopo 20 ore, eseguendo, quindi, un’alimentazione esponenziale. Il volume di substrato da alimentare è stato calcolato con la Formula 5.3, in base al consumo dei substrati ottenuto mediante analisi in HPLC del surnatante dei campioni prelevati dalla prova in *batch*.

Inoltre, durante le prove sono stati prelevati periodicamente dei campioni da 7-10 mL che sono stati sottoposti alle suddette analisi.

### 5.3. Preparazione della biomassa e del surnatante

La biomassa e il surnatante sono stati ottenuti tramite metodo gravimetrico. Da ogni campione preso durante le prove di fermentazione è stato prelevato 1 mL alla volta che è stato inserito in Eppendorf™, precedentemente essiccate in stufa a 80 °C per 15-20 ore e tarate. I campioni sono stati successivamente centrifugati a 10000 rpm per 5 min per separare la biomassa dal surnatante; questo passaggio è stato ripetuto il numero sufficiente di volte al fine di ottenere un pellet ben visibile, utilizzando dai 3 ai 7 mL di campione. Il surnatante è stato recuperato e filtrato con filtri in PES da 0,2 µm all'interno delle vials per l'HPLC per analizzare la concentrazione di glucosio, fruttosio e acetato di sodio. La biomassa, invece, è stata risospesa con 1 mL di acqua deionizzata e centrifugata nuovamente per 5 min a 10000 rpm in modo da rimuovere eventuali residui di terreno di coltura. Quindi, la biomassa è stata essiccata in stufa a 80 °C per 15-20 ore in modo da rimuovere l'acqua residua e ottenere un pellet secco. Dopodiché, si è ricavato il peso secco come differenza tra il peso delle Eppendorf™ contenenti la biomassa essiccata e la loro tara: questa è un'indicazione della crescita del batterio.

Tale procedura è stata effettuata in quanto l'analisi spettrofotometrica non fornisce una misura precisa della crescita batterica, in particolare quando il batterio inizia a produrre PHB. Infatti, la misura della densità ottica è falsata dalla presenza del biopolimero, che è in grado di assorbire la radiazione luminosa a 600 nm, valore utilizzato per le misure in questo lavoro di tesi.

La concentrazione di biomassa presente nei risultati (Capitolo 6) è stata ottenuta calcolando la differenza tra il peso delle Eppendorf™ contenenti il pellet essiccato e la loro tara e dividendola per il volume di campione prelevato.

### 5.4. Estrazione del PHB

Per estrarre il PHB dalla biomassa essiccata si è cercato di prelevare almeno 5 mg di pellet secco da ogni Eppendorf™ partendo dai campioni prelevati dopo 12 ore di crescita. Il tempo zero non è stato considerato in quanto il PHB viene prodotto a partire dalla fase di crescita esponenziale, quindi all'inizio della fermentazione il quantitativo di biopolimero è nullo o presente in quantità non rilevanti.

La biomassa essiccata è stata pesata e degradata in provette in Pyrex® da 15 mL insieme a 1 mL di acido solforico al 96% per estrarre il biopolimero. Quindi, le provette sono state immerse in un bagno a olio siliconico a 90 °C per 50 min sotto agitazione magnetica [34]. La soluzione risultante è stata diluita 1:1000 con acqua deionizzata e successivamente filtrata con filtri non sterili in PES da 0,2 µm all'interno delle vials; infine, è stata analizzata tramite HPLC per monitorare la concentrazione di PHB prodotto.

La produzione di PHB è stata studiata calcolando la percentuale di PHB (PHB %) come il rapporto tra i grammi di PHB estratto e i grammi di biomassa secca pesata (DW):

$$PHB \% = \frac{g\ PHB}{g\ DW} \cdot 100 \quad (5.4)$$

### 5.5. Analisi tramite HPLC

Per analizzare i surnatanti e la produzione di PHB accumulato nella biomassa dei campioni ottenuti dai processi di estrazione è stata utilizzata la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). È stata usata una colonna cromatografica Resex18, alla temperatura di 50 °C e alla pressione di 55-60 bar, con una fase mobile costituita da una fase acquosa con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM. La fase mobile è stata impiegata a una portata di 0,7 mL/min.

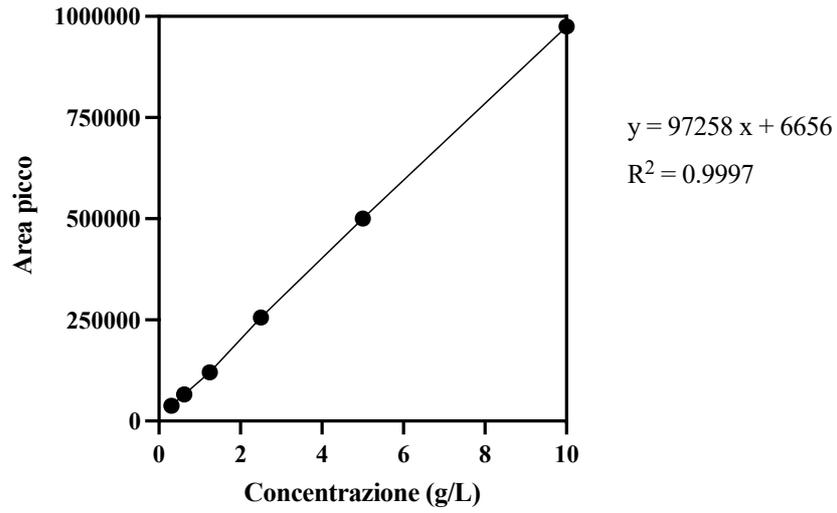
Attraverso i cromatogrammi ottenuti a 210 nm utilizzando la lampada PDA, sono stati individuati i picchi di assorbimento dei composti d'interesse: ogni picco corrisponde a un determinato composto e l'area sottostante il picco è proporzionale alla sua concentrazione. Quindi, per ogni campione analizzato sono state ricavate le aree dei picchi corrispondenti al composto di interesse e tramite la rispettiva retta di taratura si è ottenuta la concentrazione di quel determinato composto. In questo modo è stato possibile osservare la variazione delle concentrazioni dei substrati (glucosio, fruttosio e acetato di sodio) e del PHB prodotto (Capitolo 6).

Nel seguito sono mostrate le tabelle con i valori delle concentrazioni e delle relative aree dei picchi impiegate per costruire le rette di taratura dei composti di interesse: glucosio (Tabella 5.1 e Figura 5.1), fruttosio (Tabella 5.2 e Figura 5.2), acetato di sodio (Tabella 5.3 e Figura 5.3) e PHB (Tabella 5.4 e Figura 5.4). Inoltre, sono indicate le equazioni delle rette, con i relativi coefficienti di determinazione ( $R^2$ ).

Noti i tempi di ritenzione di tutti i componenti di interesse, è stato impostato un tempo di analisi di 15 min per i surnatanti: infatti, i tempi di ritenzione di glucosio, fruttosio e acetato di sodio sono rispettivamente intorno a 8.5 min, 9.2 min e 13.5 min, per il metodo utilizzato e per la colonna cromatografica Resex18. Per quanto riguarda il PHB, invece, il tempo di analisi impostato è di 30 min, in quanto il PHB presenta un tempo di ritenzione di circa 23,2 min.

**Tabella 5.1.** Valori impiegati per la retta di taratura del glucosio.

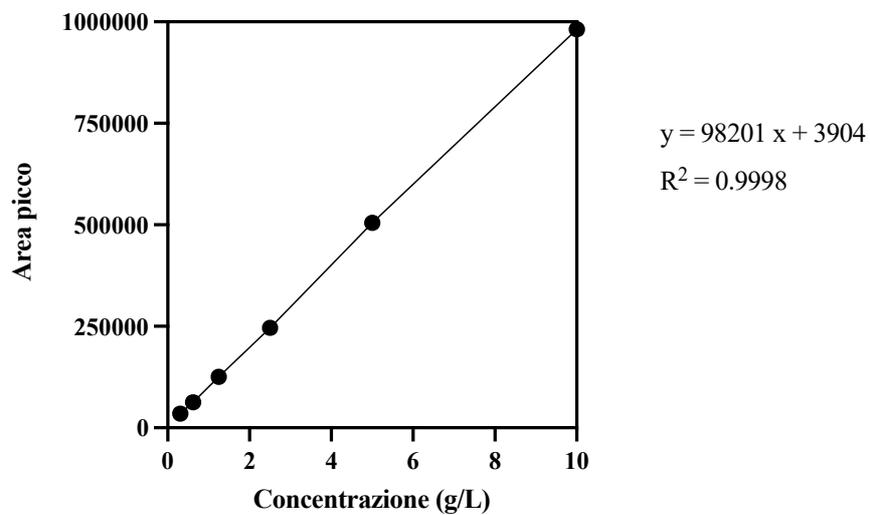
Concentrazione (g/l)	Area picco
10	974943
5	500654
2,5	255984
1,25	120189
0,625	65547
0,3125	37376



**Figura 5.1.** Retta di taratura del glucosio.

**Tabella 5.2.** Valori impiegati per la retta di taratura del fruttosio.

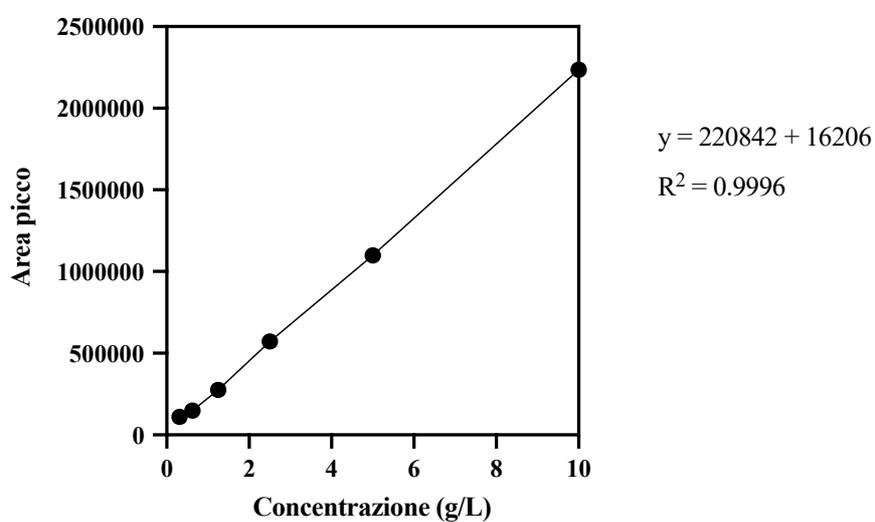
Concentrazione (g/l)	Area picco
10	981832
5	505004
2,5	246652
1,25	125447
0,625	63120
0,3125	34692



**Figura 5.2.** Retta di taratura del fruttosio.

**Tabella 5.3.** Valori impiegati per la retta di taratura dell'acetato di sodio.

Concentrazione (g/l)	Area picco
10	2235394
5	1099512
2,5	572866
1,25	276376
0,625	149954
0,3125	110972



**Figura 5.3.** Retta di taratura dell'acetato di sodio.

**Tabella 5.4.** Valori impiegati per la retta di taratura del PHB.

Concentrazione (g/l)	Area picco
0,001	87340
0,0005	42776
0,00025	19490
0,000125	7699

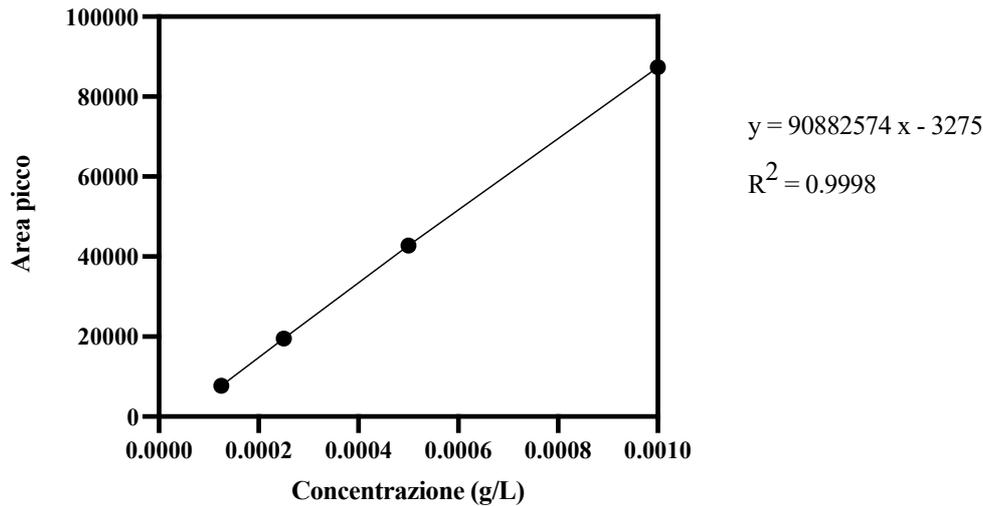


Figura 5.4. Retta di taratura del PHB.

### 5.6. Modellazione matematica per la crescita batterica

In questo paragrafo viene presentato il modello matematico impiegato per studiare la crescita batterica durante le prove di fermentazione. Una modellazione matematica risulta molto utile per capire e prevedere l'andamento di un processo fermentativo e anche per determinare i parametri cinetici necessari allo studio delle diverse prove effettuate.

La crescita batterica può essere descritta con l'equazione logistica [34]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad (5.5)$$

dove  $(dX/dt)$  è il tasso di crescita batterica,  $\mu_{max}$  è il tasso di crescita specifico massimo,  $X$  è la concentrazione di biomassa e  $X_m$  è la concentrazione massima di biomassa.

Integrando la Formula 5.5, si ottiene:

$$X = \frac{X_m X_0}{(X_m - X_0) \exp(-\mu_{max} \cdot t) + X_0} \quad (5.6)$$

dove  $X_0$  è la concentrazione iniziale di biomassa, ossia la concentrazione al tempo zero.

Per la rappresentazione della curva di crescita è stato utilizzato il software GraphPad Prism che consente di effettuare il *fitting* dei dati sperimentali fornendo il valore dei parametri cinetici  $\mu_{max}$  e  $X_m$  e del coefficiente di determinazione  $R^2$ , che quantifica la bontà del modello.

Si è deciso di concentrarsi sulla curva di crescita per osservare le differenze nel comportamento del batterio in terreni di coltura contenenti substrati diversi.

## 6. Risultati

Nel presente capitolo vengono illustrati e discussi i risultati ottenuti nelle prove di fermentazione. Nel paragrafo 6.1 sono mostrati i dati ricavati dalle prove di fermentazione in beuta, mentre nel paragrafo 6.2 sono presentati i risultati delle prove di fermentazione in bioreattore. Entrambi i paragrafi pongono l'attenzione sulle prove effettuate con D-glucosio Sigma-Aldrich®, D-fruttosio Sigma-Aldrich® (abbreviati per semplicità a glucosio e fruttosio) e i retentati zuccherini Sedamyl e sulle prove in cui è stata eseguita l'induzione con acetato di sodio. Inoltre, vengono mostrati i parametri ottenuti dalla modellazione matematica della curva di crescita batterica.

### 6.1. Risultati fermentazione in beute

#### 6.1.1. Prove in glucosio e fruttosio

Innanzitutto, sono riportati i risultati ottenuti dalle prove di fermentazione preliminari, eseguite in triplicato sperimentale, impiegando come fonti di carbonio solo glucosio, solo fruttosio e la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio. Queste prove sono state eseguite per osservare la crescita di *C. necator* DSM 545 sui diversi substrati e sono state portate avanti per 48 h.

I grafici mostrano, in funzione del tempo, il pH del mezzo di coltura e le concentrazioni in g/L delle fonti di carbonio (glucosio e/o fruttosio), del PHB estratto e della biomassa. Per quanto riguarda la biomassa, è mostrata anche la curva di crescita ottenuta dal modello matematico impiegando la Formula 5.4.

Nella prova con terreno di fermentazione contenente solo glucosio si è ottenuto l'andamento mostrato nella Figura 6.1.

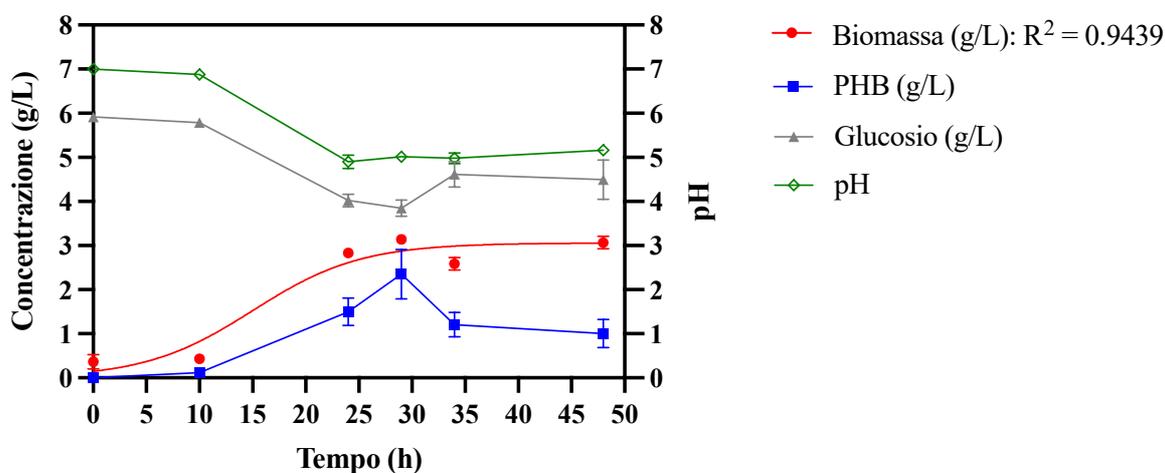


Figura 6.1. Prova di fermentazione in beuta con 100% glucosio come fonte di carbonio.

È possibile osservare il tipico andamento della crescita microbica caratterizzato dalla fase di latenza, in cui la concentrazione di biomassa è molto bassa, dalla successiva fase esponenziale, caratterizzata da un aumento evidente della biomassa (concentrazione massima di 3,1 g/L) e infine dalla fase stazionaria, in cui la concentrazione della biomassa rimane circa costante. La crescita microbica dipende dalla presenza dei substrati. Infatti, in questo caso si nota che il glucosio viene consumato principalmente nelle prime 24 h, intervallo di tempo in cui si osserva la crescita maggiore, dal momento che il batterio arriva al termine della fase esponenziale. Dopo 24 h di crescita, il substrato e la biomassa rimangono circa costanti a concentrazioni di 4,5 g/L e 3 g/L, rispettivamente. Per quanto riguarda il PHB, si nota una bassa concentrazione, infatti il massimo è di circa 2,4 g/L ottenuto dopo 29 h dall'inizio della prova, ossia quando il batterio si trova nella fase stazionaria. Infine, si osserva un'acidificazione del terreno: dopo 24 h di fermentazione, il pH passa da 7 a 5 a causa della crescita batterica, infatti il consumo del substrato provoca il rilascio di ioni  $H^+$ .

Con il terreno di fermentazione contenente 100% fruttosio, invece, sono stati ottenuti i profili mostrati in Figura 6.2: si osserva subito che la differenza principale con la prova precedente riguarda il consumo del substrato, infatti il fruttosio viene consumato del tutto dopo 48 h. Inoltre, il batterio è cresciuto maggiormente raggiungendo la concentrazione massima di biomassa di circa 4,2 g/L alla fine della prova di fermentazione. Questo ha portato a una maggiore concentrazione di PHB che ha raggiunto il massimo valore dopo 34 h dall'inizio della prova con una concentrazione di circa 4,2 g/L, che corrisponde a quasi il doppio della concentrazione ottenuta impiegando solo glucosio come substrato. Infine, il pH presenta un andamento identico a quello della prova precedente, infatti il terreno di coltura passa da pH 7 a pH 5 a causa della crescita batterica.

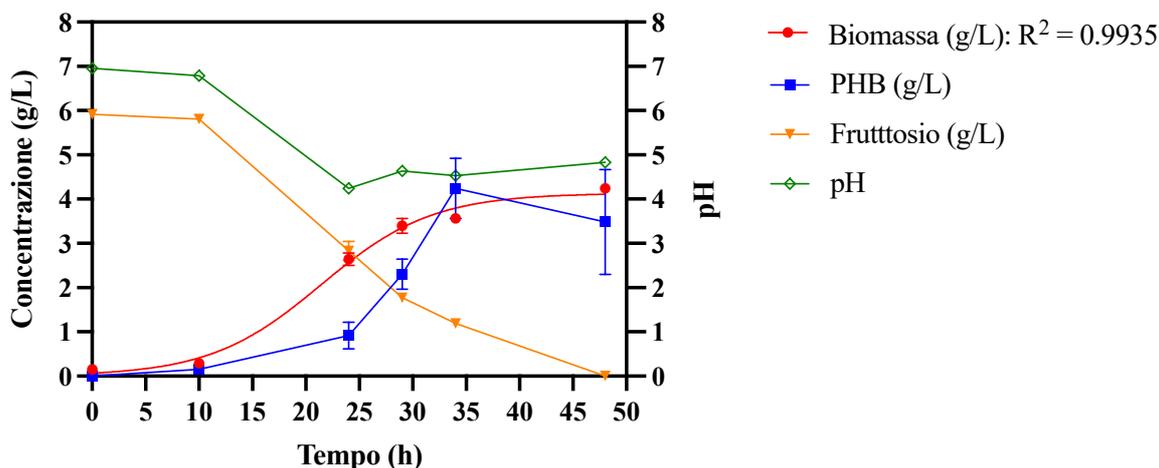
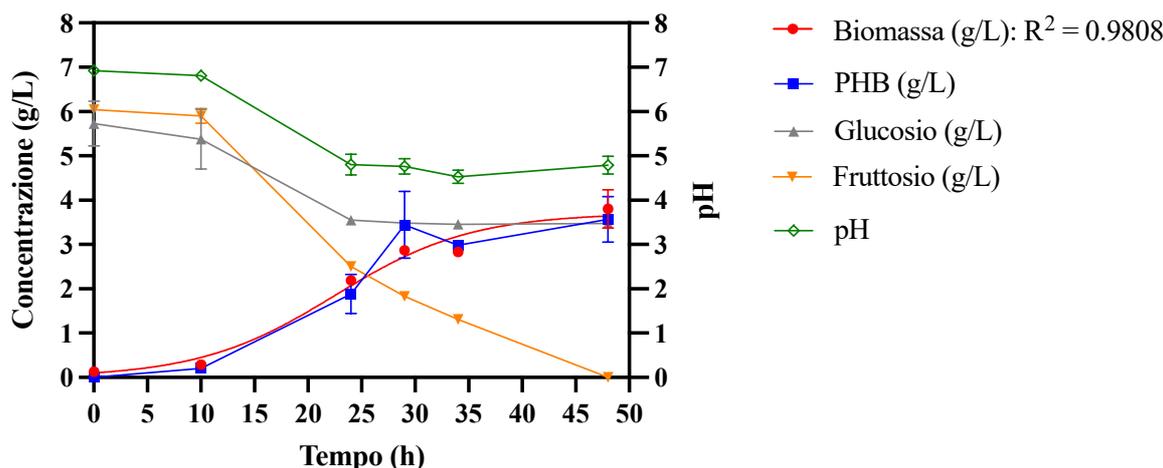


Figura 6.2. Prova di fermentazione in beuta con 100% fruttosio come fonte di carbonio.

Nella Figura 6.3, invece, è mostrato l'andamento nel tempo delle concentrazioni di PHB, biomassa, glucosio e fruttosio e del pH nella prova di fermentazione eseguita impiegando come substrato la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio.



**Figura 6.3.** Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio.

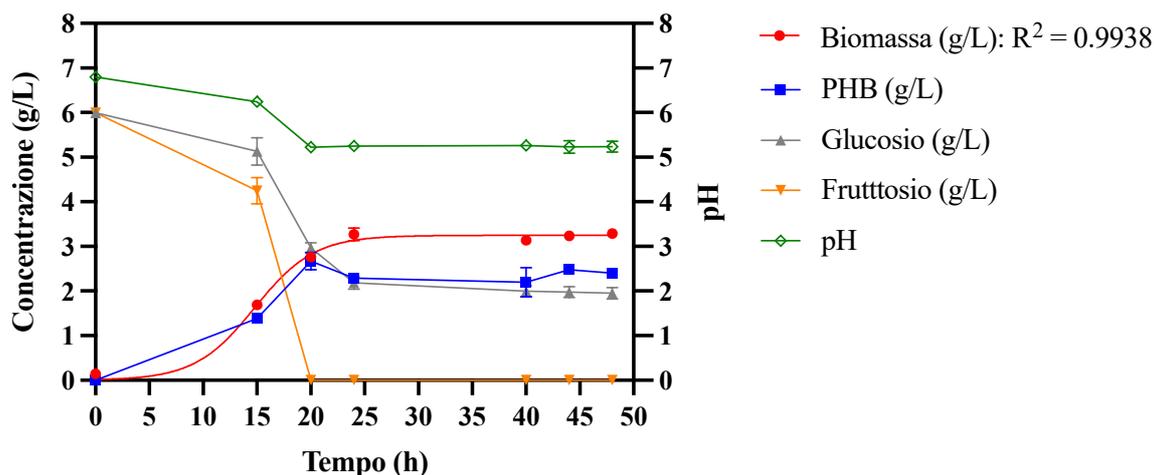
In questo caso è stato possibile fare le seguenti considerazioni:

- Il fruttosio viene consumato più velocemente del glucosio e alla fine della prova, dopo 48 h, risulta terminato, esattamente come nella prova in cui è stato impiegato solamente fruttosio;
- Il glucosio presenta un andamento simile a quello della prova con 100% glucosio: il consumo maggiore lo si ha nelle prime 24 h di crescita, poi la sua concentrazione rimane costante a circa 3,5 g/L fino alla fine della prova;
- La biomassa presenta un andamento molto simile alla prova con solo fruttosio raggiungendo una concentrazione massima di 3,8 g/L alla fine della prova;
- La concentrazione di PHB aumenta nel tempo fino a raggiungere la concentrazione massima di circa 3,5 g/L dopo 29 h, quindi durante la fase stazionaria;
- Il pH diminuisce passando da 7 a 5: si osserva nuovamente un'acidificazione del terreno dovuta alla crescita batterica.

Da queste prime tre prove si osserva principalmente come *C. necator* DSM 545 cresca meglio in terreni contenenti fruttosio come fonte di carbonio, infatti, nelle prove in cui è stato impiegato tale substrato è possibile osservare che è stato consumato molto più velocemente rispetto al glucosio, portando anche a una crescita batterica e una produzione di PHB maggiori. Un'altra osservazione che si può fare è che il modello matematico adottato per la crescita batterica approssima molto bene i dati sperimentali, infatti si sono ottenuti  $R^2 \geq 0,9439$ .

#### 6.1.2. Prove con retentati zuccherini

Di seguito sono mostrati i risultati ottenuti dalle prove di fermentazione in beuta effettuate utilizzando i retentati zuccherini come fonti di carbonio. Nella Figura 6.4 è presentato l'andamento nel tempo del pH e delle concentrazioni della biomassa, del PHB prodotto e dei substrati (glucosio e fruttosio) consumati. Anche in questo caso è mostrata la curva di crescita ricavata dalla modellazione matematica.



**Figura 6.4.** Prova di fermentazione in beuta con retentati zuccherini come fonte di carbonio.

Si osserva subito che la concentrazione di biomassa presenta il tipico andamento della crescita microbica raggiungendo un massimo di circa 3,3 g/L dopo 24 h dall'inizio della prova, quindi alla fine della fase esponenziale di crescita; tale valore di concentrazione viene mantenuto all'incirca costante fino alla fine della prova (48 h). Inoltre, si nota un'ottima approssimazione dei dati da parte del modello matematico ( $R^2 = 0,9938$ ). Per quanto riguarda il consumo dei substrati si osserva un andamento molto simile a quello ottenuto nella prova in cui è stata impiegata la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio. Infatti, il glucosio viene consumato maggiormente nelle prime 24 h, successivamente la sua concentrazione rimane costante a circa 2 g/L fino alla fine della prova, invece il fruttosio viene consumato del tutto già dopo 20 h dall'inizio della fermentazione. Si nota, inoltre, che dopo 20 h di crescita, si ha la massima concentrazione di PHB (circa 2,7 g/L), che rimane circa costante nelle ore successive della prova. Per quanto riguarda il pH si nota nuovamente un'acidificazione da pH 7 a pH 5,2.

Questi risultati dimostrano che *C. necator* DSM 545 è in grado di impiegare i retentati zuccherini come fonte di carbonio, tuttavia si sono ottenute concentrazioni di biomassa e PHB inferiori rispetto alle prove eseguite con la miscela di 50% glucosio e 50% fruttosio, anche se i retentati presentano una composizione molto simile.

### 6.1.3. Confronto tra le prove preliminari: produzione di PHB e parametri di fermentazione

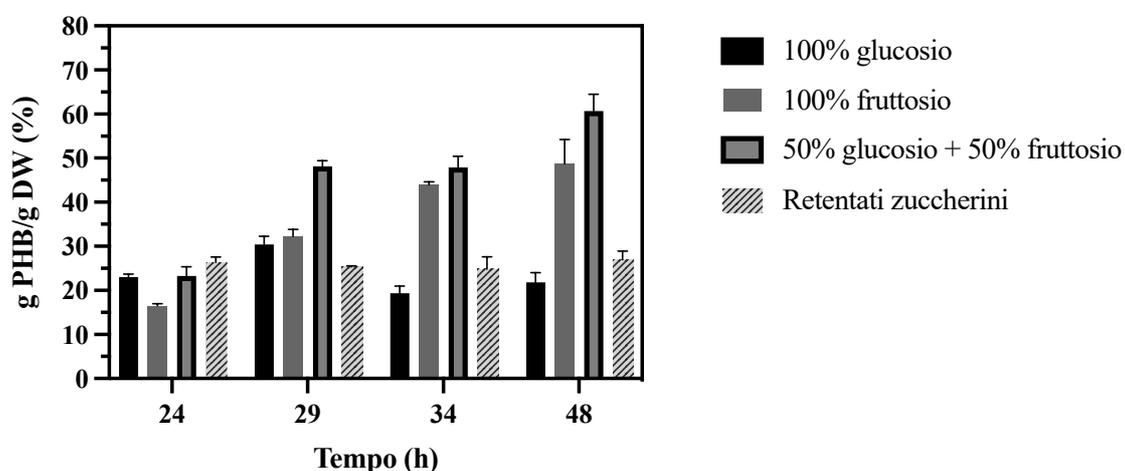
Nella Tabella 6.1 vengono riassunti i valori massimi delle concentrazioni di biomassa e PHB, raggiunti durante le prove preliminari eseguite in beuta.

Nella Figura 6.5, invece, è possibile osservare un confronto tra le produzioni di PHB percentuale (g PHB/g DW) ottenute nelle prove preliminari. Sono stati considerati i campioni prelevati a partire dalle 24 h di fermentazione dal momento che la concentrazione di PHB diventa significativa dopo questo intervallo di tempo. Si ricorda, infatti, che *C. necator* produce PHB principalmente nella fase stazionaria di crescita.

Nella Figura 6.5 si osserva che le produzioni di PHB maggiori sono state ottenute con il terreno di fermentazione contenente la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio, in cui la concentrazione più elevata è di 3,5 g/L dopo 29 h (Tabella 6.1); in particolare, la produzione massima di PHB (60,7%) è stata raggiunta dopo 48 h di fermentazione. Risultati simili sono osservabili anche con il fruttosio, in cui si ha una produzione massima del 48,6% alla fine della prova di fermentazione. In quest'ultimo caso, invece, la concentrazione massima di PHB è di 4,2 g/L dopo 34 h. Si nota, quindi, che contenuto percentuale di PHB e concentrazione (in g/L) non sono correlati, infatti la concentrazione di PHB viene ricavata dall'analisi tramite HPLC dei campioni contenenti il biopolimero estratto con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mentre il contenuto percentuale è stato calcolato dividendo i grammi di PHB per i grammi di biomassa secca pesata (Formula 5.4) e quindi rappresenta l'effettivo contenuto di PHB all'interno delle cellule del batterio.

**Tabella 6.1.** Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove preliminari in beuta.

Substrato	Biomassa max (g/L)	PHB max (g/L)
100% glucosio	3,1	2,4
100% fruttosio	4,2	4,2
50% glucosio + 50% fruttosio	3,8	3,5
Retentati zuccherini	3,3	2,7



**Figura 6.5.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta.

Considerando i retentati zuccherini, invece, non si osservano produzioni di PHB molto elevate, come è già stato detto in precedenza, infatti la produzione percentuale si aggira nell'intorno del 25%, raggiungendo un massimo del 26,9% dopo 48 h di fermentazione. Un andamento molto simile lo si osserva anche nelle prove in cui è stato impiegato solo glucosio come substrato che raggiunge la produzione massima dopo 29 h con il 30,4%. Di conseguenza,

si conferma la preferenza da parte di *C. necator* DSM 545 nei confronti del fruttosio come fonte di carbonio per la crescita e la produzione di PHB.

Infine, nella Tabella 6.2 sono presenti i parametri ( $\mu_{max}$ ,  $X_m$  ed  $R^2$ ) ottenuti dalla modellazione matematica della curva di crescita batterica.

**Tabella 6.2.** Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione preliminari in beuta.

Substrato	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$X_m$ (g/L)	$R^2$
100% glucosio	0,1972	3,059	0,9439
100% fruttosio	0,1925	4,134	0,9935
50% glucosio + 50% fruttosio	0,1578	3,709	0,9808
Retentati zuccherini	0,3611	3,248	0,9938

Il tasso di crescita specifico massimo ( $\mu_{max}$ ) rappresenta la pendenza del tratto di curva che definisce la fase esponenziale di crescita. Analizzando i valori ottenuti, si osserva che in questo caso non esiste una correlazione tra  $\mu_{max}$  e  $X_m$ . Infatti, si hanno valori di  $\mu_{max}$  molto simili per le prove con 100% glucosio e 100% fruttosio, anche se la concentrazione massima ( $X_m$ ) è maggiore per la coltura con solo fruttosio, come già visto in precedenza. Al contrario, durante le prove eseguite impiegando la soluzione 50% glucosio e 50% fruttosio e i retentati zuccherini sono state ottenute  $\mu_{max}$  molto diverse, pari a 0,1578 h<sup>-1</sup> e 0,3611 h<sup>-1</sup>, rispettivamente, nonostante la  $X_m$  relativa alla prova con i retentati zuccherini sia inferiore rispetto a quella ottenuta con la miscela di glucosio e fruttosio. Questo potrebbe semplicemente essere dovuto al fatto che nella prova in cui sono stati utilizzati i retentati, si osserva, dopo 15 h, una concentrazione di biomassa di quasi 2 g/L, valore molto più alto rispetto a quanto ottenuto nelle altre prove allo stesso orario. Tale valore andrebbe quindi ad aumentare la pendenza della fase esponenziale. Nonostante ciò, la crescita poi non aumenta notevolmente tendendo a una  $X_m$  di 3,248 g/L.

Considerando invece solo le concentrazioni massime ( $X_m$ ), queste riportano dei valori che sono in accordo con i dati sperimentali: la concentrazione massima maggiore stimata dal modello corrisponde con la prova in cui è stato impiegato 100% fruttosio (4,134 g/L).

Sulla base dei risultati ottenuti, si è deciso di eseguire le prove di induzione con acetato di sodio, confrontando la soluzione al 50% glucosio e 50% fruttosio e i retentati zuccherini, dal momento che presentano composizioni molto simili.

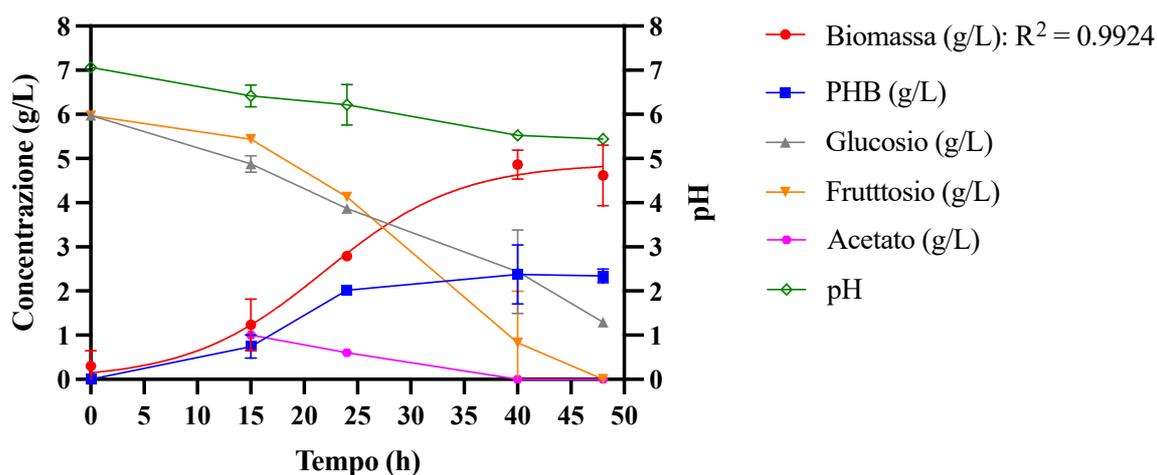
#### 6.1.4. Prove di induzione con acetato di sodio

In questo paragrafo vengono presentati i risultati ottenuti nelle prove di fermentazione in cui è stata effettuata l'induzione con acetato di sodio. Sono stati impiegati come fonti di carbonio principali la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio e i retentati zuccherini; l'induzione è stata eseguita dopo 15 h dall'inizio della prova oppure all'inizio della stessa (tempo zero) e tutte le prove sono state portate avanti per 48 h. Inoltre, vengono fatti dei confronti tra le diverse prove in termini di produzione percentuale di PHB e dei parametri ottenuti dalla modellazione matematica della crescita batterica.

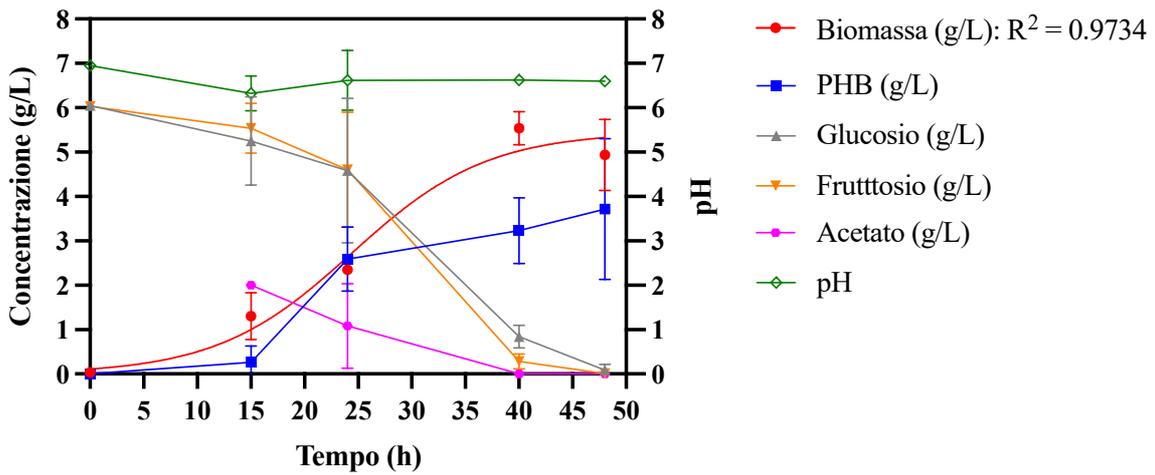
Per quanto riguarda l'utilizzo della soluzione al 50% glucosio e 50% fruttosio, sono riportati di seguito gli andamenti nel tempo del pH e delle concentrazioni della biomassa, del PHB e dei substrati (glucosio, fruttosio e acetato) avendo effettuato l'induzione con acetato dopo 15 h dall'inizio della fermentazione: sono state utilizzate le concentrazioni di 1 g/L (Figura 6.6), 2 g/L (Figura 6.7), 3 g/L (Figura 6.8) e 5 g/L (Figura 6.9). Nei grafici è presente anche la curva di crescita ottenuta dal *fitting* dei dati sperimentali utilizzando il modello matematico.

Si è deciso di aggiungere l'acetato dopo 15 ore dall'inizio della fermentazione in quanto, dopo questo intervallo di tempo, il batterio si trova nella fase esponenziale di crescita, quindi è metabolicamente più attivo.

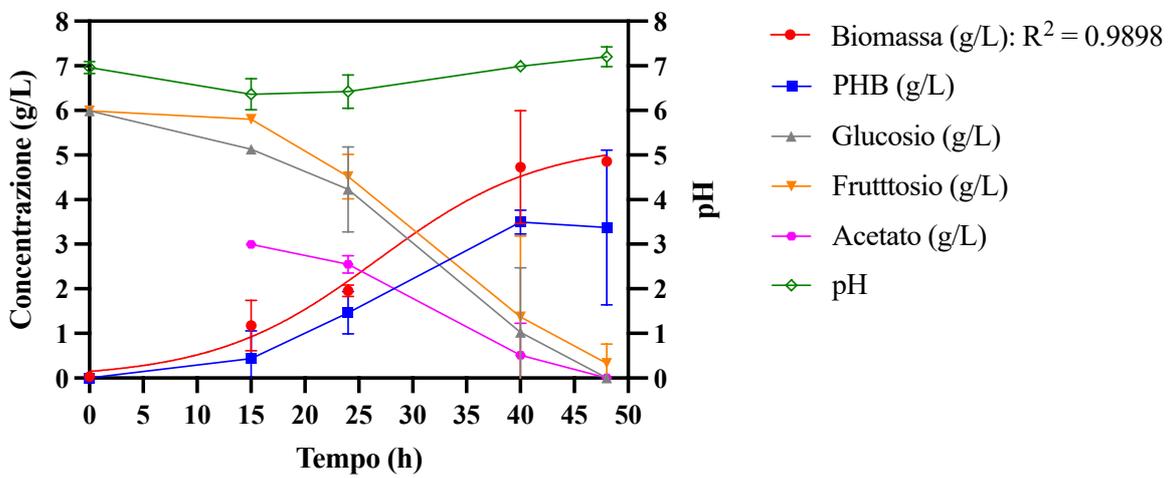
Dai grafici si può subito osservare che l'acetato viene consumato del tutto dopo 40 h di fermentazione quando è presente in concentrazioni iniziali di 1 g/L e 2 g/L e dopo 48 h nel caso in cui la concentrazione iniziale è di 3 g/L. Nella prova in cui, invece, l'acetato è presente con una concentrazione iniziale di 5 g/L, questo substrato non viene quasi consumato, dato che la concentrazione finale a 48 h è di circa 4,3 g/L.



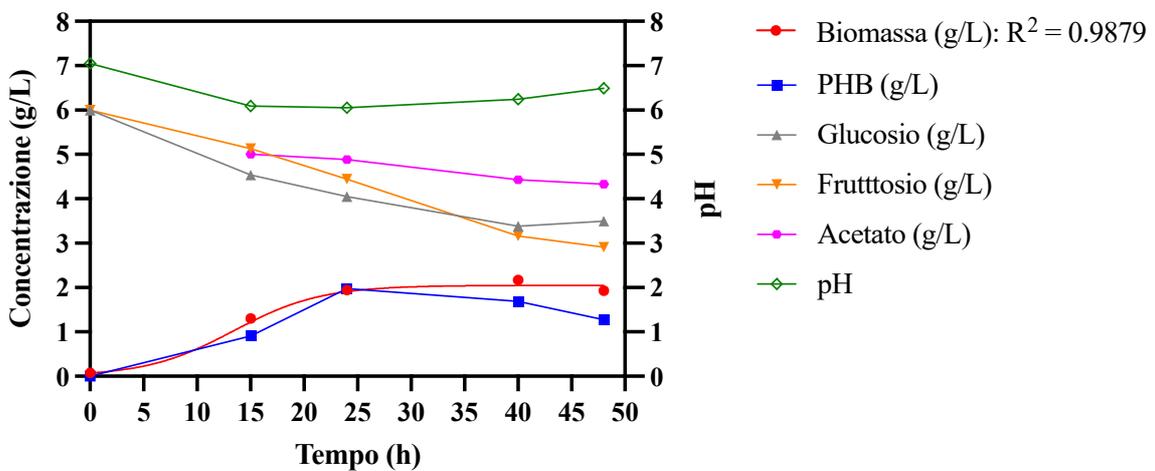
**Figura 6.6.** Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 1 g/L dopo 15 h.



**Figura 6.7.** Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 2 g/L dopo 15 h.



**Figura 6.8.** Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 3 g/L dopo 15 h.



**Figura 6.9.** Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 5 g/L dopo 15 h.

In tutte e quattro le prove si osserva che il glucosio e il fruttosio vengono consumati allo stesso modo, a differenza di quanto osservato nella prova preliminare senza acetato (in cui è stata utilizzata la miscela di glucosio e fruttosio come fonte di carbonio). Infatti, senza la presenza dell'acetato, la concentrazione di glucosio tendeva a una concentrazione di circa 3,5 g/L dopo 48 h di fermentazione. In questo caso, invece, il glucosio, come anche il fruttosio, viene consumato del tutto, o quasi, nelle colture con concentrazioni iniziali di acetato pari a 1, 2 e 3 g/L. Solo nella prova con 5 g/L di acetato, glucosio e fruttosio tendono a concentrazioni finali di circa 3 g/L. In generale, quindi, si osserva che la presenza dell'acetato sembrerebbe aumentare la velocità di consumo del glucosio da parte di *C. necator*.

Per quanto riguarda l'andamento della biomassa, la crescita maggiore è osservabile nella prova in cui è stato aggiunto acetato 2 g/L, infatti si ha una concentrazione massima di 5,5 g/L dopo 40 h di fermentazione. Nella stessa prova è stata raggiunta anche la concentrazione maggiore di PHB, pari a 3,7 g/L dopo 48 h. Nella coltura contenente 3 g/L di acetato si sono raggiunte concentrazioni abbastanza elevate di biomassa (4,8 g/L dopo 48 h) e di PHB (3,5 g/L dopo 40 h). Anche nel caso di induzione con acetato 1 g/L, il batterio ha raggiunto una concentrazione massima di biomassa di circa 4,8 g/L, dopo 40 h, tuttavia si notano concentrazioni di PHB molto inferiori, con un massimo di 2,4 g/L dopo 40 h. Infine, nella prova con acetato 5 g/L si osserva una chiara inibizione della crescita del batterio, che raggiunge la concentrazione massima di circa 2,2 g/L dopo 40 h, con una concentrazione di PHB massima di 2 g/L dopo 24 h.

Un'ulteriore osservazione riguarda il pH: esso rimane circa costante a pH 7 grazie alla presenza di acetato, che dissociandosi in acqua e dando reazione di idrolisi basica genera ossidrili ( $\text{OH}^-$ ), che fanno aumentare il pH. Questo fenomeno si osserva meno nella prova con acetato 1 g/L, probabilmente perché la concentrazione è troppo bassa per generare dei cambiamenti di pH nel terreno di fermentazione.

Nelle prove di fermentazione in cui l'acetato è stato aggiunto al tempo zero ( $t = 0$  h) sono state utilizzate le concentrazioni iniziali di 1 g/L (Figura 6.10), 2 g/L (Figura 6.11) e 3 g/L (Figura 6.12). La concentrazione iniziale di 5 g/L di acetato non è stata presa in considerazione, dal momento che con l'induzione dopo 15 h è stata osservata l'inibizione della crescita batterica. Queste prove sono state eseguite per osservare eventuali cambiamenti nel metabolismo di *C. necator* DSM 545.

Con l'induzione al tempo zero si osservano innanzitutto delle concentrazioni di biomassa molto più elevate rispetto all'induzione dopo 15 h di fermentazione. Infatti, sono state raggiunte concentrazioni massime di 5,1 g/L dopo 40 h nella prova con 1 g/L di acetato, di 6 g/L con l'aggiunta di acetato 2 g/L e, infine, di 4,9 g/L utilizzando acetato 3 g/L. Tuttavia, la produzione di PHB rimane circa uguale alle prove precedenti: la concentrazione massima più alta è stata raggiunta nella prova di induzione con acetato 1 g/L ed è pari a 3,4 g/L dopo 40 h di fermentazione. Nelle altre due prove, invece, sono state raggiunte concentrazioni massime inferiori: nella prova con concentrazione iniziale di acetato di 2 g/L la produzione massima di PHB è di 3 g/L dopo 40 h, mentre con 3 g/L di acetato si osserva una concentrazione massima di 2,6 g/L dopo 48 h.

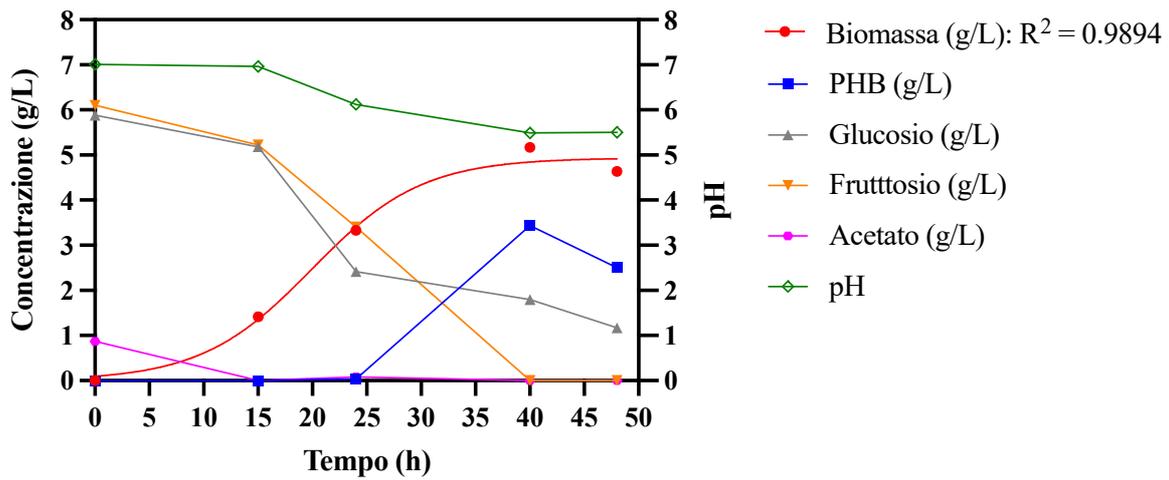


Figura 6.10. Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 1 g/L al tempo zero.

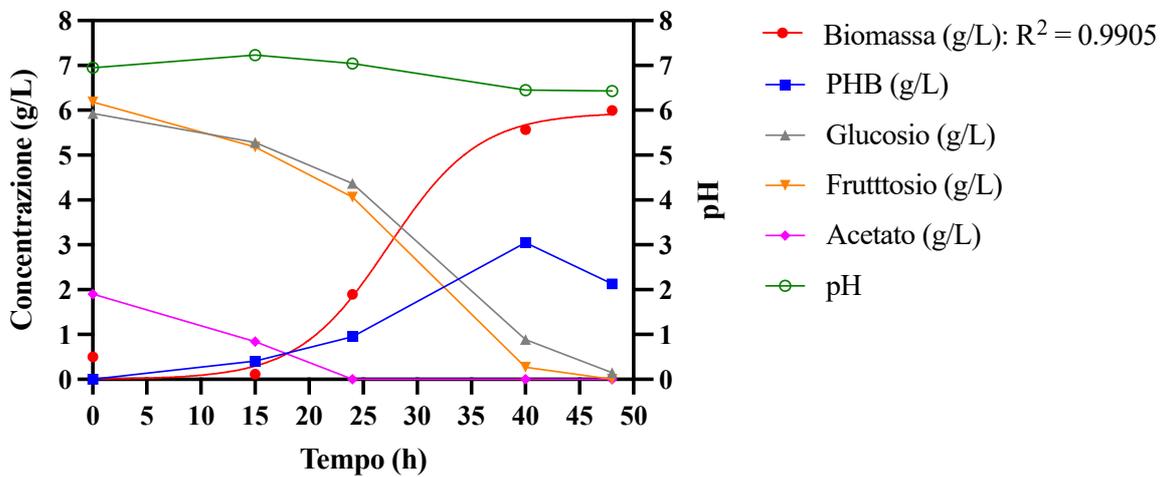


Figura 6.11. Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 2 g/L al tempo zero.

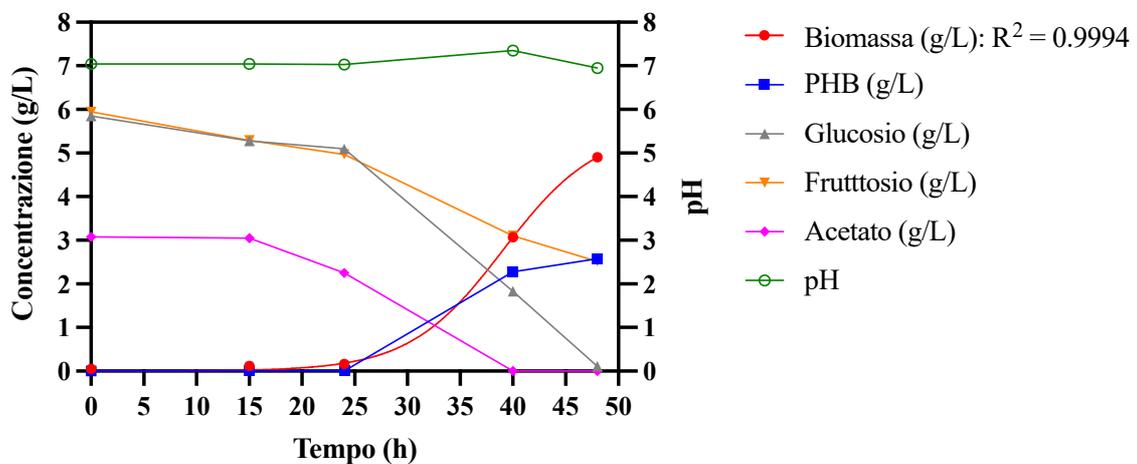


Figura 6.12. Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 3 g/L al tempo zero.

Quindi, sembrerebbe che aggiungendo l'acetato all'inizio della prova, questo venga utilizzato principalmente per la crescita cellulare e provochi un'inibizione nella produzione di PHB. Infatti, si notano non solo concentrazioni di PHB inferiori, ma anche dei ritardi nella produzione, come si può osservare nelle prove in cui è stato fornito acetato con concentrazioni di 1 e 3 g/L: fino a 24 h la concentrazione di PHB è nulla e aumenta solo successivamente. Per quanto riguarda gli altri due substrati (glucosio e fruttosio), si osserva che nelle prove con acetato 1 e 2 g/L il batterio preferisce il fruttosio che viene consumato del tutto. Invece, aumentando la concentrazione di acetato a 3 g/L, la preferenza si sposta sul glucosio che in questo caso viene esaurito completamente dopo 48 h di fermentazione, mentre il fruttosio presenta una concentrazione finale di circa 2,5 g/L. Inoltre, per il pH si osserva l'andamento visto in precedenza. Grazie alla presenza dell'acetato, il terreno di fermentazione presenta un pH 7 che rimane circa costante durante tutta la durata della prova. Solo nella prova con acetato 1 g/L si osserva un'acidificazione del terreno da pH 7 a pH 5,5.

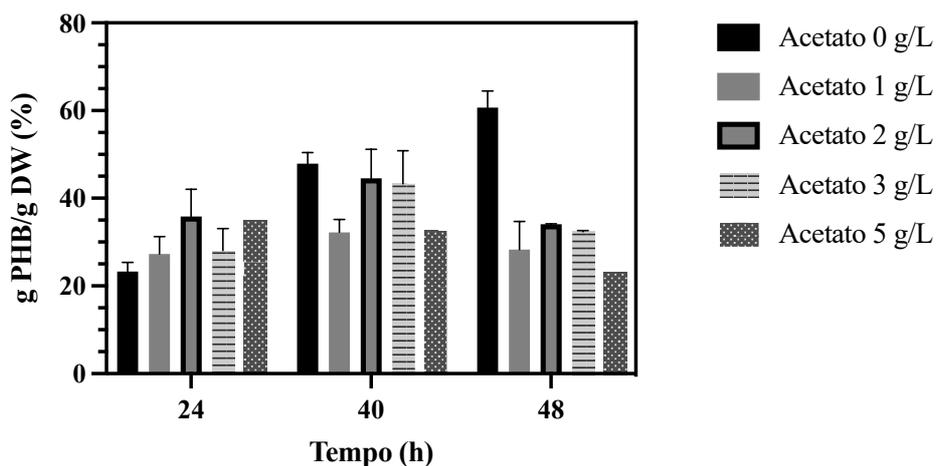
La Tabella 6.3 riassume le concentrazioni massime di biomassa e di PHB ottenute nelle prove appena citate, confrontandole con i valori raggiunti nella prova senza acetato.

**Tabella 6.3.** Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove in beuta con induzione di acetato al tempo zero e dopo 15 h, impiegando la soluzione 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio principale.

Concentrazione acetato	Biomassa max (g/L)		PHB max (g/L)	
	Induzione 0 h	Induzione 15 h	Induzione 0 h	Induzione 15 h
0 g/L	3,8		3,5	
1 g/L	5,1	4,8	3,4	2,4
2 g/L	6,0	5,5	3,0	3,7
3 g/L	4,9	4,8	3,6	3,5
5 g/L	\	2,2	\	2,0

Nella Figura 6.13 sono mostrate le produzioni di PHB % ottenute nelle prove di induzione effettuate dopo 15 h dall'inizio della fermentazione con le diverse concentrazioni di acetato (1, 2, 3 e 5 g/L) e impiegando la miscela 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte principale di carbonio. Nella figura è indicata anche la produzione di PHB della prova eseguita senza acetato, come controllo.

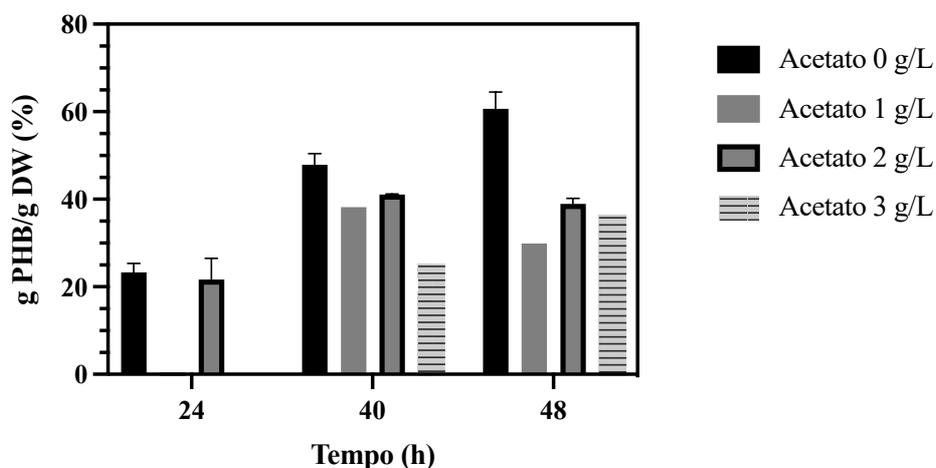
Dal grafico si osserva che la produzione massima (60,7%) è stata ottenuta nella prova senza acetato dopo 48 h di fermentazione. Da ciò si deduce che, anche se la concentrazione di biomassa può risultare maggiore fornendo acetato, la produzione di PHB invece non aumenta. Nelle colture in cui è stato aggiunto acetato, le produzioni maggiori sono state ottenute con acetato 2 g/L e 3 g/L dopo 40 h, con percentuali di 44,5% e 43,3%, rispettivamente. Infatti, impiegando acetato 1 g/L è stata raggiunta la produzione massima del 32,2% dopo 40 h, mentre con acetato 5 g/L il contenuto massimo di PHB è del 35% dopo 24 h di fermentazione.



**Figura 6.13.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta con induzione di acetato dopo 15 h utilizzando come fonte di carbonio la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio.

Nella Figura 6.14, invece, sono mostrate le produzioni percentuali di PHB nelle prove di induzione al tempo zero con acetato 1, 2 e 3 g/L. Come nella figura precedente, sono inseriti anche i risultati ottenuti nella prova senza acetato impiegando la miscela 50% glucosio e 50% fruttosio.

Anche in questo caso, la produzione maggiore di PHB è quella raggiunta nel terreno di fermentazione privo di acetato, seguita dalla prova indotta con acetato 2 g/L che riporta una produzione massima del 41% dopo 40 h. Inoltre, tramite gli istogrammi si osserva meglio quanto detto in precedenza per le colture in cui è stato aggiunto acetato con concentrazioni di 1 e 3 g/L: la produzione di PHB è nulla a 24 h dall'inizio della prova, ma aumenta nelle ore successive raggiungendo un massimo del 38,2% dopo 40 h per la coltura con acetato 1 g/L e del 36,3% dopo 48 h nel caso dell'aggiunta di acetato 3 g/L.

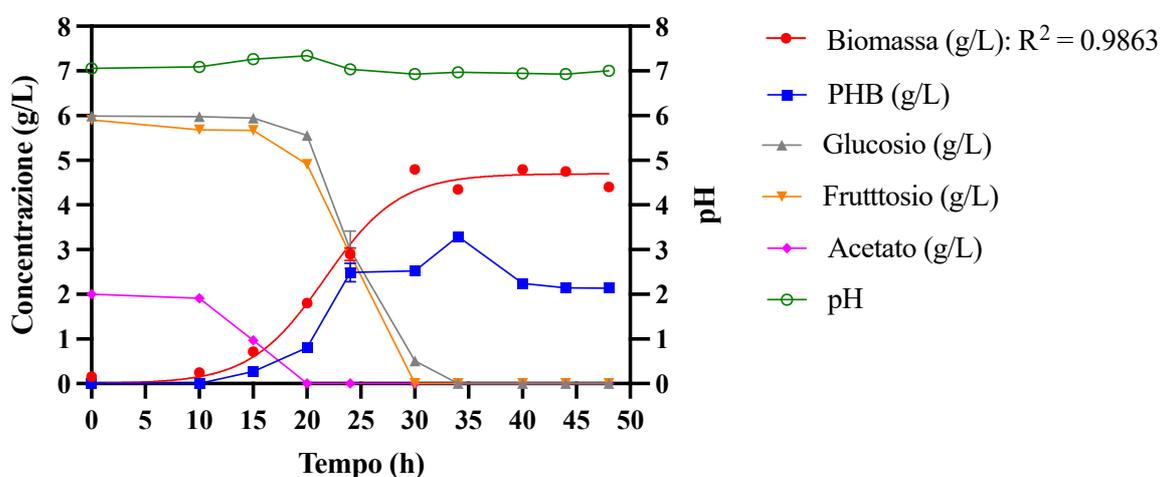


**Figura 6.14.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta con induzione di acetato al tempo zero utilizzando come fonte di carbonio la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio.

Infine, si è deciso di completare lo studio sull'influenza dell'acetato effettuando una prova di induzione al tempo zero con acetato 2 g/L, impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio. È stata scelta la concentrazione di 2 g/L in seguito ai risultati ottenuti nelle prove precedenti, infatti con questa concentrazione di acetato sono state ricavate concentrazioni maggiori di biomassa e produzioni di PHB più elevate. Invece, si è scelto di effettuare l'induzione al tempo zero dal momento che nelle prove precedenti è stata osservata una crescita batterica maggiore aggiungendo fin da subito l'acetato nel terreno di fermentazione, raggiungendo produzioni di PHB molto simili a quelle ottenute nelle prove di induzione effettuate dopo 15 h dall'inizio della fermentazione.

La Figura 6.15 mostra gli andamenti nel tempo delle concentrazioni (biomassa, PHB, glucosio, fruttosio e acetato), del pH e della curva di crescita ottenuta tramite la modellazione matematica. È possibile osservare dei profili simili a quelli ottenuti nelle prove precedenti.

Innanzitutto, si nota che l'acetato viene completamente consumato dopo 20 h di fermentazione. La biomassa raggiunge un massimo di 4,8 g/L dopo 30 h dall'inizio della prova, mentre la concentrazione massima di PHB risulta di 3,3 g/L dopo 34 h, dopodiché la concentrazione del biopolimero inizia a diminuire. Il glucosio e il fruttosio vengono consumati alla stessa velocità fino al loro completo esaurimento, che risulta essere dopo 30 h per il fruttosio e dopo 34 h per il glucosio. Il pH, invece, rimane costante a un valore di circa 7 per tutta la durata della prova.

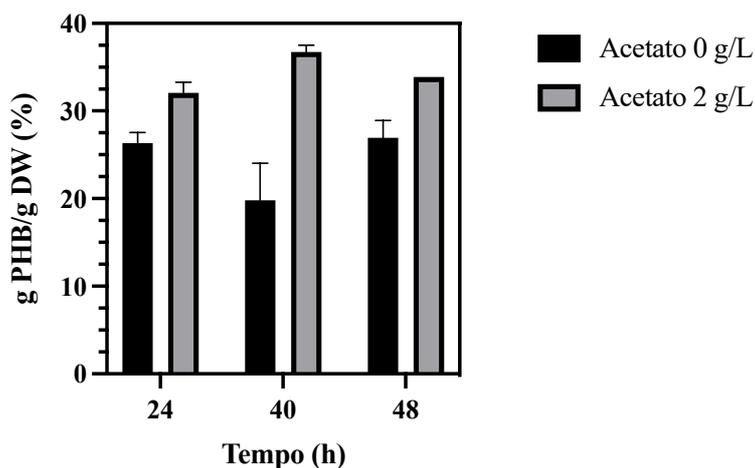


**Figura 6.15.** Prova di fermentazione in beuta con retentati zuccherini e induzione con acetato 2 g/L al tempo zero.

La Tabella 6.4 mostra le concentrazioni massime di biomassa e PHB ottenute effettuando l'induzione con acetato 2 g/L al tempo zero e impiegando i retentati zuccherini come principale fonte di carbonio. Tali valori sono paragonati con quelli ottenuti nella prova in cui è stata utilizzata la stessa fonte di carbonio, ma senza l'aggiunta di acetato nel terreno di fermentazione. La Figura 6.16, invece, confronta le produzioni di PHB % ottenute nelle due prove appena citate.

**Tabella 6.4.** Concentrazioni massime di biomassa e PHB nella prova in beuta con induzione di acetato 2 g/L al tempo zero impiegando i retentati zuccherini.

Concentrazione acetato	Biomassa max (g/L)	PHB max (g/L)
0 g/L (controllo)	3,3	2,7
2 g/L	4,8	3,3



**Figura 6.16.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta senza acetato e con induzione di acetato 2 g/L al tempo zero utilizzando come fonte di carbonio i retentati zuccherini.

Dalla Tabella 6.4 è possibile osservare che, fornendo acetato al terreno di fermentazione contenente i retentati zuccherini, le concentrazioni massime di biomassa e PHB aumentano. Inoltre, nella Figura 6.16, si nota che anche la produzione percentuale di PHB subisce un incremento: in particolare, si nota un massimo del 36,7% dopo 40 h dall'inizio della prova, valore non molto diverso dal 41% ottenuto nella prova di induzione al tempo zero impiegando acetato 2 g/L e la soluzione al 50% glucosio e 50% fruttosio. Quindi, sembrerebbe che utilizzando i retentati zuccherini, *C. necator* abbia usato il substrato aggiuntivo (acetato di sodio) non solo per aumentare la concentrazione di biomassa, ma anche per produrre una maggiore quantità di PHB.

Infine, la Tabella 6.5 riassume i parametri ricavati dalla modellazione matematica della crescita batterica nelle prove in cui è stata eseguita l'induzione con acetato; sono stati inseriti all'interno della tabella anche i valori delle prove eseguite con la soluzione 50% glucosio e 50% fruttosio e con i retentati zuccherini, senza l'aggiunta di acetato, per avere un termine di paragone (controllo). Dai valori di  $R^2$  si evince che il *fitting* dei dati sperimentali è molto affidabile ( $R^2 \geq 0,9734$ ). Si nota che sia i valori di  $\mu_{max}$  che quelli di  $X_m$  sono influenzati dalla concentrazione iniziale di acetato presente nel terreno di fermentazione. Infatti, per concentrazioni iniziali di acetato  $< 3$  g/L,  $X_m$  e  $\mu_{max}$  tendono ad aumentare in maniera proporzionale con la concentrazione di acetato: questo è dovuto all'aggiunta di una fonte di carbonio aggiuntiva oltre al glucosio e al fruttosio. Invece, con una concentrazione di acetato

pari a 3 g/L, la concentrazione massima e  $\mu_{max}$  iniziano a diminuire probabilmente a causa di un effetto inibitorio da parte dell'acetato, come è stato visto in letteratura [52].

Si osserva un'unica eccezione relativa alla  $\mu_{max}$  della prova in cui è stato impiegato acetato 5 g/L, infatti il suo valore è maggiore rispetto a tutti gli altri della prova con 50% glucosio e 50% fruttosio. Come spiegato in precedenza, questo potrebbe essere dovuto a un valore relativamente elevato della concentrazione di biomassa all'inizio della fase esponenziale. Nonostante  $\mu_{max}$  sia maggiore, la  $X_m$  invece è decisamente più bassa: ciò indica un'evidente inibizione della crescita batterica causata dall'elevata concentrazione di acetato.

**Tabella 6.5.** Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in beuta con induzione di acetato in diverse concentrazioni.

Induzione	Substrato	Concentrazione acetato (g/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$X_m$ (g/L)	R <sup>2</sup>
15 h	50% glucosio + 50% fruttosio	0 (controllo)	0,1578	3,709	0,9808
		1	0,1580	4,894	0,9924
		2	0,1585	5,453	0,9734
		3	0,1326	5,299	0,9898
		5	0,2455	2,050	0,9879
0 h	50% glucosio + 50% fruttosio	0 (controllo)	0,1578	3,709	0,9808
		1	0,1969	4,938	0,9894
		2	0,2386	5,950	0,9905
		3	0,2246	5,562	0,9994
	Retentati zuccherini	0 (controllo)	0,1943	3,252	0,9569
		2	0,2942	4,695	0,9875

## 6.2. Risultati fermentazione in bioreattore

Nel presente paragrafo vengono mostrati e discussi i risultati ottenuti durante le prove di fermentazione eseguite in bioreattore, al fine di migliorare la crescita di *C. necator* DSM 545 e la sua produzione di PHB. Innanzitutto, sono presentati i profili ricavati dalle prove in modalità *batch* con la soluzione 50% glucosio e 50% fruttosio e con i retentati zuccherini e successivamente quelli ricavati dalle prove *fed-batch*, eseguite con i retentati ed effettuando in seguito l'induzione con acetato di sodio in due tempi diversi: al tempo zero (inizio fermentazione) e dopo 15 ore di fermentazione. Inoltre, vengono mostrati i valori di produzione di PHB percentuale e le curve di crescita ricavate dal modello matematico con i relativi parametri.

Durante le prove di fermentazione, il pH è stato mantenuto costante al valore di 6.8, per questo motivo non viene mostrato il suo andamento nel tempo. Inoltre, si è deciso di non impostare un valore soglia della pressione parziale di ossigeno al fine di studiare il metabolismo di *C. necator* in presenza solamente di un eccesso di fonte di carbonio.

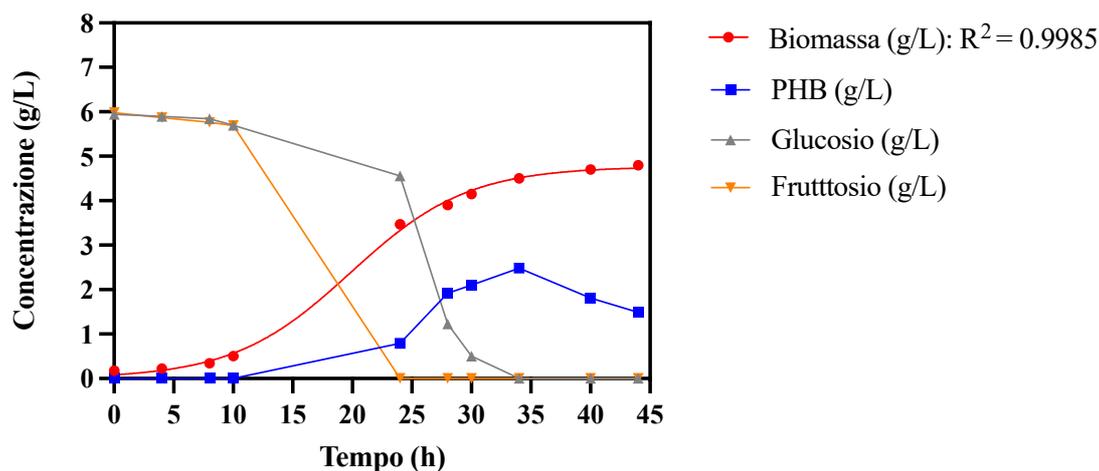
Le prove sono state eseguite una sola volta, senza essere state replicate, per una durata totale di 44 h.

### 6.2.1. Prove di fermentazione *batch*

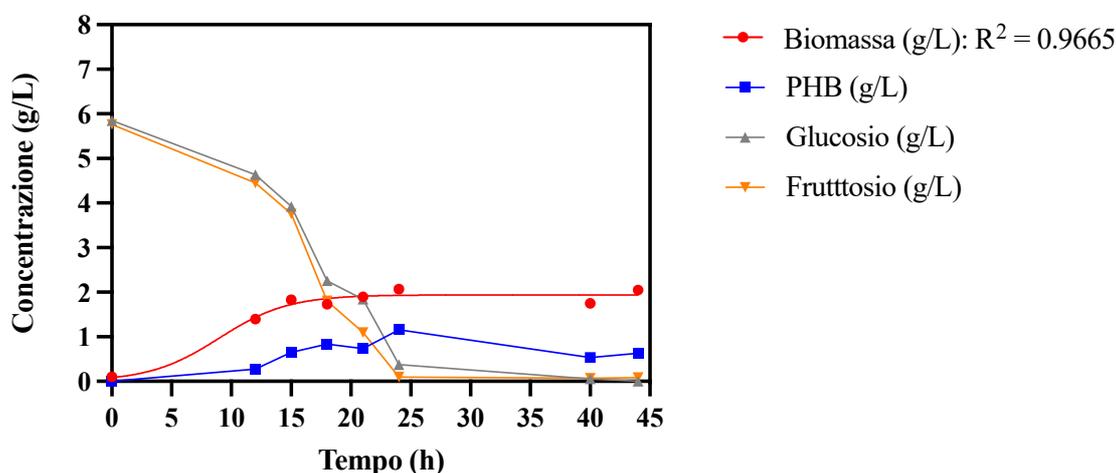
Eseguendo una prima prova in modalità *batch* utilizzando la miscela 50% glucosio e 50% fruttosio, si ottiene l'andamento mostrato nella Figura 6.17: sono rappresentate le concentrazioni di biomassa, PHB, glucosio e fruttosio nel tempo. Questa prova è stata effettuata per osservare il comportamento del batterio all'interno del bioreattore ed effettuare un successivo confronto con l'impiego dei retentati zuccherini in termini di produzione di PHB. Dal grafico si osserva, innanzitutto, che entrambi i substrati vengono consumati del tutto: il fruttosio dopo 24 h, mentre il glucosio dopo 34 h. Questo porta a una buona crescita batterica, che raggiunge la massima concentrazione di biomassa (circa 4,8 g/L) alla fine della prova, ossia dopo 44 h di fermentazione. La concentrazione di PHB invece raggiunge il valore massimo di 2,5 g/L dopo 34 h. Infine, si nota che il *fitting* dei dati sperimentali relativi alla biomassa è molto affidabile, avendo ottenuto un  $R^2$  pari a 0,9983.

Invece, i profili ottenuti impiegando i retentati zuccherini sono mostrati nella Figura 6.18. La prova è stata portata avanti per 44 h e si osserva una crescita molto inferiore rispetto alla prova precedente: questo andamento rispecchia quanto già osservato nelle fermentazioni eseguite in beuta. La concentrazione massima di biomassa è di circa 2,1 g/L dopo 24 h dall'inizio della prova, tempo in cui sia il glucosio che il fruttosio contenuti nel retentato risultano del tutto consumati. Anche la concentrazione di PHB risulta molto limitata, con un valore massimo di 1,2 g/L dopo 24 h. Per quanto riguarda la curva di crescita, il modello approssima molto bene i dati sperimentali ( $R^2 = 0,9665$ ).

La tabella 6.6 riassume i valori delle concentrazioni massime di biomassa e PHB ottenute in queste prime due prove in bioreattore.



**Figura 6.17.** Prova di fermentazione in modalità *batch* con 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio.



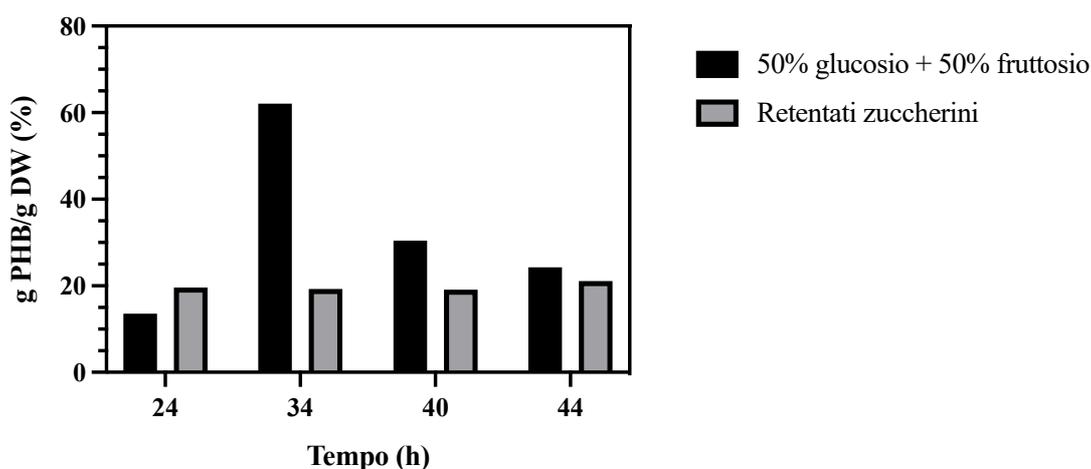
**Figura 6.18.** Prova di fermentazione in modalità *batch* con retentati zuccherini come fonte di carbonio.

**Tabella 6.6.** Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove di fermentazione in modalità *batch*.

	Biomassa max (g/L)	PHB max (g/L)
50% Glucosio + 50% Fruttosio	4,8	2,5
Retentati zuccherini	2,1	1,2

Dai valori presenti nella Tabella 6.6 si nota che le concentrazioni raggiunte nel bioreattore sono abbastanza basse. A parte la biomassa nella prova con 50% glucosio e 50% fruttosio, tutti gli altri valori sono inferiori a quelli ottenuti nelle prove di fermentazione in beuta. Inoltre, nella prova in cui è stata utilizzata la miscela 50% glucosio e 50% fruttosio si osservano concentrazioni che sono più del doppio di quelle ottenute con l'uso dei retentati zuccherini.

Nella Figura 6.19 è mostrato un confronto tra le produzioni percentuali di PHB (g PHB/g DW) ottenute nelle due prove in modalità *batch*. Nonostante non siano state raggiunte concentrazioni maggiori rispetto a quelle nelle prove in beuta, si osserva che nella prova in cui è stata impiegata la soluzione al 50% glucosio e 50% fruttosio la produzione è molto elevata e di gran lunga maggiore rispetto ai valori ottenuti con l'impiego dei retentati zuccherini. In particolare, dopo 34 h di fermentazione, si osserva una produzione del 62,1%, valore maggiore rispetto alla prova in beuta (60,7%). Solo a 24 h, la produzione di PHB nel terreno contenente i retentati zuccherini risulta maggiore, ma pari solo al 19,6%, valore che aumenta al 21,1% dopo 44 h di fermentazione.



**Figura 6.19.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in modalità *batch*.

La Tabella 6.7 presenta i parametri del modello matematico per le curve di crescita. La  $X_m$  conferma quanto detto, infatti la concentrazione maggiore (4,761 g/L) viene raggiunta nella prova dove è stata utilizzata la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio. I valori di  $\mu_{max}$ , invece, riportano un tasso di crescita specifico massimo maggiore per il terreno in cui sono stati aggiunti i retentati zuccherini (0,3457 h<sup>-1</sup>), questo significa che il batterio è cresciuto più velocemente durante la fase esponenziale, tuttavia poi si è fermato a una concentrazione massima di 1,939 g/L.

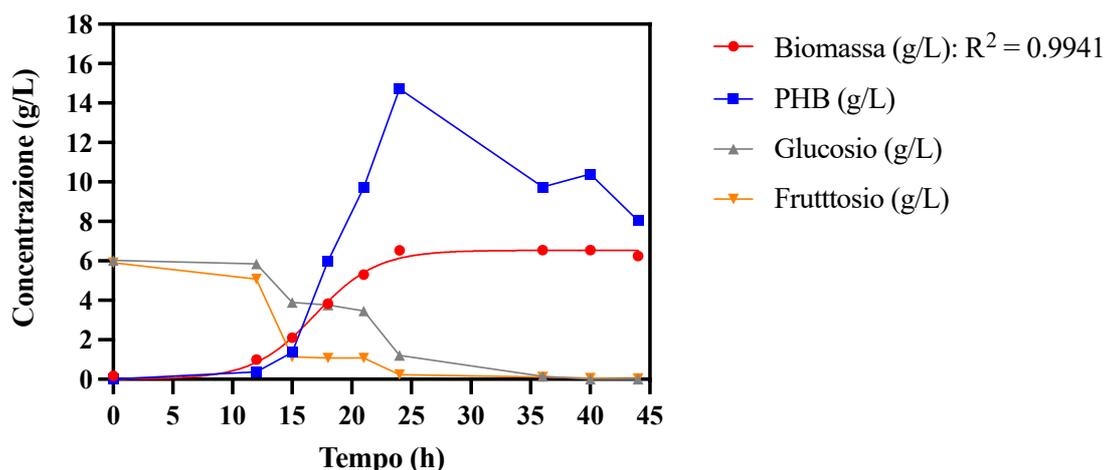
**Tabella 6.7.** Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in modalità *batch*.

Substrato	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$X_m$ (g/L)	R <sup>2</sup>
50% glucosio + 50% fruttosio	0,2035	4,761	0,9985
Retentati zuccherini	0,3457	1,939	0,9665

### 6.2.2. Prova di fermentazione *fed-batch*

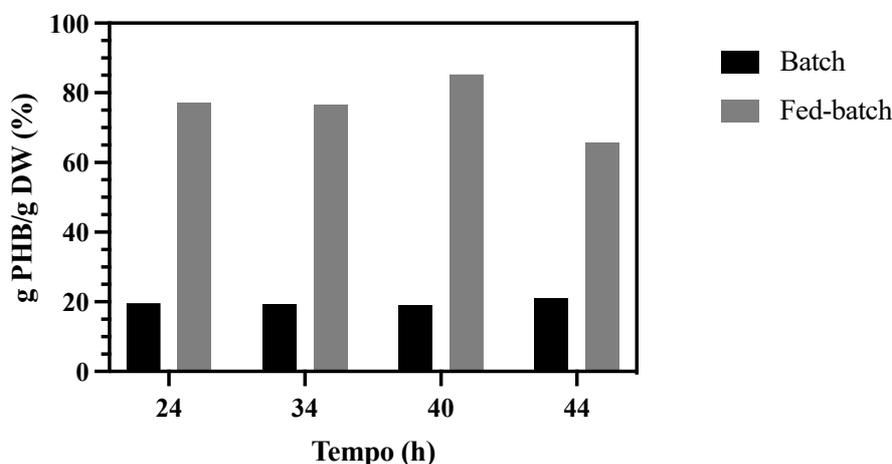
In base ai risultati ottenuti nella prova *batch* con i retentati zuccherini e agli studi trovati in letteratura [43], si è deciso di eseguire le prove di fermentazione in modalità *fed-batch* effettuando un'alimentazione esponenziale: il substrato è stato fornito durante la fase esponenziale in maniera proporzionale al suo consumo. Per fare ciò, dalla prova in modalità *batch* è stato calcolato quanto substrato è stato consumato nelle prime 15 h e nell'intervallo di tempo che va dalle 15 alle 20 h di fermentazione, tramite una semplice sottrazione tra le concentrazioni di glucosio oppure di fruttosio, dal momento che vengono consumati alla stessa velocità. Da questo semplice calcolo è risultato che vengono consumati 2 g/L di glucosio (e anche di fruttosio) in entrambi gli intervalli di tempo considerati. Quindi, dal momento che i retentati zuccherini contengono circa 50% glucosio e circa 50% fruttosio, bisogna considerare una concentrazione di substrato di 4 g/L ( $C_{substrato}$ ). Con la Formula 5.3 è stato calcolato il volume di retentato zuccherino ( $V_{feed}$ ) da alimentare nel terreno di fermentazione durante i *feeding*.

Quindi, sono stati ottenuti i profili delle concentrazioni (biomassa, PHB, glucosio e fruttosio) mostrati nella Figura 6.20. Si nota subito un elevato aumento nella concentrazione del PHB e anche della biomassa, che raggiungono concentrazioni massime di 14,7 g/L e 6,5 g/L rispettivamente, dopo 24 h di fermentazione. Osservando, invece, l'andamento dei substrati si osserva che grazie ai due *feeding* effettuati, le concentrazioni di glucosio e fruttosio rimangono costanti nell'intervallo di tempo dalle 15 alle 20 h, anche se a valori inferiori ai 6 g/L iniziali. Successivamente, vengono consumati del tutto dopo 24 h nel caso del fruttosio e dopo 36 h nel caso del glucosio. Si nota quindi che l'aggiunta di substrato ha evidentemente migliorato la crescita del batterio e la sua produzione di PHB, come ci si aspettava, dal momento che viene fornita ulteriore fonte di carbonio al batterio.



**Figura 6.20.** Prova di fermentazione in modalità *fed-batch* con retentati zuccherini come fonte di carbonio.

Nella Figura 6.21 è possibile osservare in maniera più evidente le differenze nella produzione percentuale di PHB tra la prova di fermentazione in modalità *batch* e quella in *fed-batch*. In quest'ultimo caso si sono ottenute produzioni elevatissime che raggiungono circa il 77% dopo 24 e 34 h di prova e l'85,3% dopo 40 h.



**Figura 6.21.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in modalità *batch* e *fed-batch* impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio.

Nella Tabella 6.8 sono indicati i parametri ottenuti dalla modellazione matematica della curva di crescita nella prova in *fed-batch*. Questi valori vengono confrontati con quelli della prova *batch*. Si nota che sia  $\mu_{max}$  che  $X_m$  sono maggiori nella prova in modalità *fed-batch*, quindi non solo si ottengono concentrazioni maggiori, ma anche la velocità di crescita nella fase esponenziale è aumentata. Inoltre, il modello approssima molto bene i dati sperimentali, infatti  $R^2 = 0,9941$ .

**Tabella 6.8.** Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in modalità *batch* e *fed-batch* impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio.

Modalità di fermentazione	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$X_m$ (g/L)	$R^2$
<i>Batch</i>	0,3457	1,939	0,9665
<i>Fed-batch</i>	0,3838	6,535	0,9941

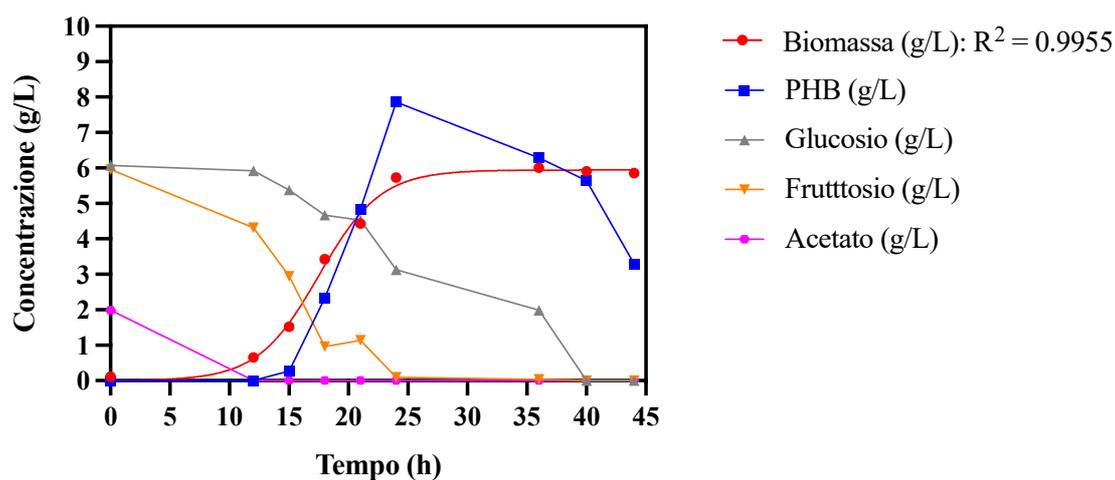
### 6.2.3. Prove *fed-batch* di induzione con acetato di sodio

In quest'ultimo paragrafo vengono mostrati i dati ottenuti nelle prove di fermentazione in modalità *fed-batch* in cui è stata eseguita l'induzione con acetato di sodio al tempo zero e dopo 15 h di fermentazione, impiegando i retentati zuccherini come fonte principale di carbonio. È stata utilizzata una concentrazione iniziale di acetato di 2 g/L, in base ai risultati ottenuti nelle prove precedenti in beuta. Inoltre, sono stati eseguiti due *feeding*: il primo dopo 15 h di

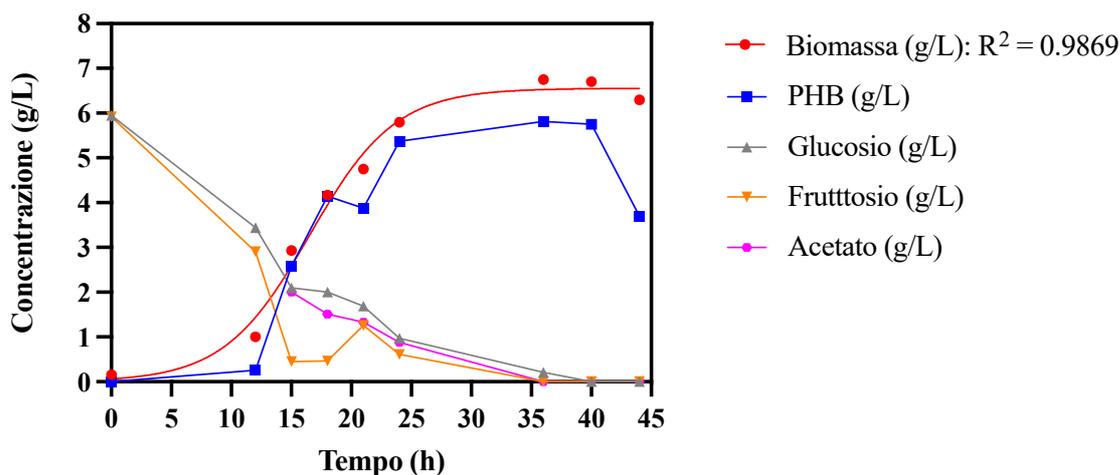
fermentazione e il secondo dopo 20 h, impiegando sempre una concentrazione di 4 g/L di retentati sulla base dei consumi osservati nella prova in *batch*.

Le Figure 6.22 e 6.23 mostrano rispettivamente i profili ottenuti eseguendo l'induzione al tempo zero e dopo 15 h di fermentazione. Nel primo grafico si osserva che la crescita batterica presenta un andamento molto simile a quello ottenuto nella prova senza acetato, infatti viene raggiunta una concentrazione massima di biomassa di 6 g/L dopo 24 h, tempo in cui si ottiene anche la massima concentrazione di PHB (7,9 g/L), valore tuttavia inferiore rispetto alla fermentazione in cui non è stato aggiunto acetato. Sarebbe quindi presente un effetto inibitorio della produzione di PHB, come era già stato osservato nella fermentazione in beuta. Grazie ai due *feeding* effettuati dopo 15 e 20 h dall'inizio della prova, si osserva che il glucosio non viene consumato del tutto fino alle 40 h di fermentazione. Questo andamento, tuttavia, non è visibile nel profilo della concentrazione di fruttosio, che viene esaurito dopo 24 h. L'acetato invece viene consumato del tutto nelle prime 12 ore della prova: si evidenzia quindi una preferenza nei confronti di questo substrato nelle prime ore di fermentazione.

Invece, alimentando l'acetato dopo 15 h (Figura 6.23), si nota una maggiore crescita batterica che raggiunge la concentrazione massima di biomassa (6,7 g/L) dopo 36 h. Dopo lo stesso intervallo di tempo viene ottenuta anche la massima concentrazione di PHB, pari a 5,8 g/L. Data l'assenza di acetato nelle prime 15 h, il glucosio e il fruttosio vengono consumati molto più velocemente rispetto al caso precedente. In seguito all'aggiunta dell'acetato e ai due *feeding*, tutti e tre i substrati rimangono all'interno del terreno fino alle 36 h di fermentazione, quando vengono completamente consumati. In questo caso, l'ipotesi è quella di una possibile inibizione della produzione di PHB dovuta all'aggiunta durante la fase esponenziale di acetato 2 g/L. Tuttavia, tale aggiunta sembrerebbe non avere avuto lo stesso effetto sulla crescita del batterio.



**Figura 6.22.** Prova di fermentazione in modalità *fed-batch* con retentati zuccherini e induzione con acetato 2 g/L al tempo zero.



**Figura 6.23.** Prova di fermentazione in modalità *fed-batch* con retentati zuccherini e induzione con acetato 2 g/L dopo 15 h.

Nella Tabella 6.9 vengono riassunti i valori massimi delle concentrazioni di biomassa e PHB ottenuti nelle prove di fermentazione in modalità *fed-batch* con e senza l'induzione con acetato di sodio 2 g/L.

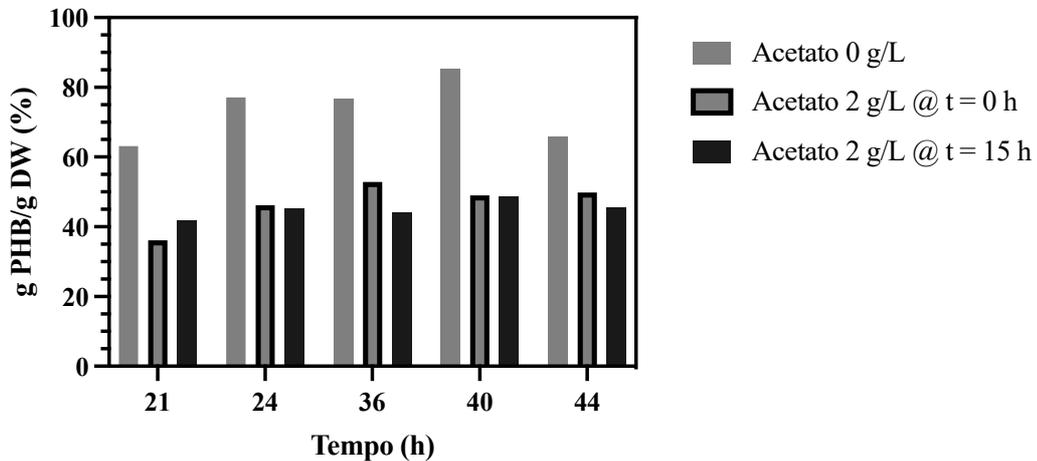
**Tabella 6.9.** Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove di fermentazione in modalità *fed-batch* impiegando i retentati zuccherini.

	Biomassa max (g/L)	PHB max (g/L)
Acetato 0 g/L	6,5	14,7
Acetato 2 g/L a 0 h	6	7,9
Acetato 2 g/L a 15 h	6,7	5,8

Infine, nella Figura 6.24 sono confrontate le produzioni di PHB % nelle prove eseguite in modalità *fed-batch* con l'induzione di acetato 2 g/L. Sono stati inseriti anche i valori della prova senza acetato per avere un termine di riferimento. Si osserva che l'acetato presenta un forte effetto inibitorio della produzione di PHB, infatti rispetto alla prova senza acetato, si sono ottenute produzioni inferiori; il massimo per l'induzione effettuata al tempo zero è di 52,8% dopo 36 h di prova, mentre aggiungendo l'acetato dopo 15 h si ottiene una produzione massima del 48,7% dopo 40 h.

La Tabella 6.10, invece, contiene i parametri stimati dal modello matematico per la curva di crescita. Si nota che il *fitting* è molto affidabile dal momento che si hanno  $R^2 > 0,9955$  (non considerando il valore della prova senza acetato). Per quanto riguarda i valori di  $\mu_{max}$  e  $X_m$  non esiste una correlazione evidente con la concentrazione di acetato o la tempistica dell'induzione. Infatti, si osserva che il tasso di crescita massimo è maggiore per la prova di induzione effettuata al tempo zero ( $0,3878 \text{ h}^{-1}$ ), quindi rispetto alla prova senza acetato, si

osserva un aumento nella velocità di crescita esponenziale. Tuttavia, la  $X_m$  risulta essere la più bassa tra i tre casi indicati (5,945 g/L), come si è già visto in precedenza. Invece, effettuando l'induzione dopo 15 h, si ottengono una  $\mu_{max}$  relativamente bassa (0,2805 h<sup>-1</sup>) rispetto alle altre due prove, ma una  $X_m$  maggiore (6,554 g/L).



**Figura 6.24.** Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in modalità *fed-batch* con induzione di acetato impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio principale.

**Tabella 6.10.** Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in modalità *fed-batch* con induzione di acetato.

	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$X_m$ (g/L)	R <sup>2</sup>
Acetato 0 g/L	0,3838	6,535	0,9941
Acetato 2 g/L @ 0 h	0,3878	5,945	0,9955
Acetato 2 g/L @ 15 h	0,2805	6,554	0,9869



## 7. Conclusioni

Le prove sperimentali descritte in questo lavoro di tesi forniscono dei risultati promettenti in termini di produzione di PHB da parte di *C. necator* DSM 545 impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio principale. In particolare, si è visto che le massime produzioni sono state ottenute nella prova di fermentazione in *fed-batch*, durante la quale il batterio è stato sottoposto solamente a una condizione di eccesso di carbonio, senza limitazione controllata di nutrienti essenziali. Si noti che le prove svolte in bioreattore non sono state replicate: la replicazione di tali esperimenti sarebbe sicuramente utile per definire ulteriori conclusioni e analisi. Considerando anche le prove preliminari effettuate in beuta, si è osservato come il batterio sia fondamentalmente in grado di crescere su una fonte di carbonio di scarto a base di glucosio e fruttosio, raggiungendo contenuti in peso di PHB molto elevati (85,3%).

Le prove di fermentazione di induzione con acetato di sodio eseguite con l'impiego dei retentati zuccherini, invece, confermano quanto trovato in letteratura, seppur gli esperimenti presi come riferimento siano stati svolti utilizzando solamente acetato come fonte di carbonio oppure un terreno contenente glucosio come substrato principale. L'acetato ha un effetto principalmente inibitorio nei confronti della biosintesi di PHB, anche se sembrerebbe favorire la crescita batterica quando presente in concentrazioni  $\leq 3$  g/L, portando a concentrazioni di biomassa maggiori rispetto a quelle ottenute in terreni privi di acetato. Si evidenzia quindi la possibilità di impiegare questo substrato come fonte di carbonio per la crescita di *C. necator*. Nonostante la sintesi di PHB sia inferiore rispetto alle prove eseguite solo con i substrati zuccherini, si sono comunque ottenute delle produzioni percentuali nell'intorno del 50% nelle prove eseguite in bioreattore, il che significa che circa il 50% del peso della biomassa secca è costituito da PHB. Si tratta di un risultato molto interessante in quanto consentirebbe l'impiego dell'acetato da parte di *C. necator* in processi per il trattamento di rifiuti organici e la conseguente produzione di PHA [52].

Durante lo svolgimento di questo progetto sono state svolte molte prove di fermentazione, tuttavia, per questioni di tempo, non si è riusciti a migliorare ulteriormente la fermentazione in *fed-batch*, modalità più adatta per ottenere elevate concentrazioni di biomassa e alte produzioni di PHB. Di conseguenza, al momento i possibili sviluppi futuri sono diversi: innanzitutto, si può studiare una strategia di alimentazione migliore, fornendo anche una maggiore concentrazione di substrato, dal momento che si è notato che sia il glucosio che il fruttosio vengono consumati rapidamente. Questo potrebbe aver influenzato la velocità di crescita della biomassa e la produzione finale di PHB. Un ulteriore sviluppo potrebbe essere quello di sottoporre il batterio anche alla modulazione di un nutriente essenziale, come ad esempio l'azoto oppure l'ossigeno. Infatti, il rapporto carbonio/azoto rappresenta una variabile molto importante per favorire la produzione di PHA e varia a seconda della fonte di carbonio impiegata [38]. Per quanto riguarda l'ossigeno, invece, si può definire la sua concentrazione disciolta all'interno del terreno di fermentazione, in modo da mantenerla all'interno del range desiderato durante tutto il processo.

Un altro metodo leggermente più complesso che si può impiegare per ottenere produzioni di PHB maggiori consiste nell'uso di due reattori in serie, in cui nel primo si va a favorire la crescita di biomassa in condizioni di nutrienti equilibrate, mentre nel secondo si crea un ambiente ostile al batterio limitando la concentrazione di alcuni nutrienti essenziali per innescare la produzione di PHB [33]. Infatti, si ricorda che *C. necator* produce la maggior parte del PHB durante la fase stazionaria di crescita.

In conclusione, si può dire che l'obiettivo della tesi è stato raggiunto, dal momento che il metabolismo di *C. necator* DSM 545 per la produzione di PHB è stato studiato in diverse modalità di fermentazione aerobica e con diversi substrati, in particolare con i retentati zuccherini. Si tratta di un punto di partenza nello studio dell'impiego e della valorizzazione di un interessante substrato di scarto come fonte di carbonio per la produzione di PHA. Il presente progetto si inserisce infatti in un contesto di economia circolare e di sostenibilità che punta alla riduzione dei costi di produzione dei PHA, obiettivo principale della ricerca per aumentare l'utilizzo di questi biopolimeri e man mano sostituirli alle plastiche di origine petrolchimica.

Gli sviluppi da compiere nella fermentazione batterica basata sull'impiego di prodotti di scarto sono ancora molti, ma porterebbero a una potenziale riduzione dell'impatto ambientale e dei costi economici.

## Lista degli acronimi

<b>DW</b>	Biomassa secca
<b>HB</b>	Idrossibutirrato
<b>HPLC</b>	Cromatografia liquida ad alta prestazione
<b>HV</b>	Idrossivalerato
<b>LB</b>	<i>Liquid Broth</i>
<b>Lcl-PHA</b>	Poliidrossialcanoati a lunga catena
<b>LDPE</b>	Polietilene a bassa densità
<b>Mcl-PHA</b>	Poliidrossialcanoati a media catena
<b>MMC</b>	Consorzi microbici misti
<b>PBS</b>	Polibutilene succinato
<b>PCL</b>	Policaprolattone
<b>PES</b>	Polieterosolfone
<b>PHA</b>	Poliidrossialcanoati
<b>PHB</b>	Poliidrossibutirrato
<b>PHV</b>	Poliidrossivalerato
<b>PLA</b>	Acido polilattico
<b>P(3HB)</b>	Poli-3-idrossibutirrato
<b>P(3HB-co-3HV)</b>	Poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato
<b>PP</b>	Polipropilene
<b>Scl-PHA</b>	Poliidrossialcanoati a corta catena

## Elenco dei simboli

$C_i$	Concentrazione iniziale (g/L)
$C_f$	Concentrazione finale (g/L)
$C_{feed}$	Concentrazione del <i>feeding</i> (g/L)
$C_{substrato}$	Concentrazione del substrato per il <i>feeding</i> (g/L)
$OD_{600}$	Densità ottica a 600 nm (-)
$V_f$	Volume finale (mL)
$V_{feed}$	Volume <i>feeding</i> (mL)
$V_i$	Volume iniziale (mL)
$V_L$	Volume di lavoro (L)
$vvm$	Rapporto tra portata d'aria e volume di lavoro ( $h^{-1}$ )
$X$	Concentrazione della biomassa (g/L)
$X_0$	Concentrazione iniziale della biomassa (g/L)
$X_m$	Concentrazione massima della biomassa (g/L)
$\mu_{max}$	Tasso di crescita specifico massimo ( $h^{-1}$ )

## Elenco delle figure

<b>Figura 2.1.</b> Tratta da [26]. Struttura generale dei poliidrossialcanoati. ....	5
<b>Figura 2.2.</b> Tratta da [6]. Struttura dei PHA in base alla classificazione strutturale. ....	6
<b>Figura 2.3.</b> Tratta da [14]. Morfologia dei granuli di PHA all'interno di una cellula batterica osservata tramite microscopia a trasmissione elettronica. ....	7
<b>Figura 2.4.</b> Tratta da [29]. Rappresentazione della struttura dei granuli di PHA con proteine e monostrato di fosfolipidi sulla superficie (disegno non in scala). ....	7
<b>Figura 2.5.</b> Struttura molecolare del PHB.....	9
<b>Figura 2.6.</b> Tratta da [1]. Via metabolica del PHB. ....	10
<b>Figura 2.7.</b> Tratta da [24]. Vie metaboliche per la biosintesi dei PHA. ....	12
<b>Figura 2.8.</b> Tratta da [24] e modificata. Potenziali applicazioni dei PHA.....	15
<b>Figura 3.1.</b> Tratta da [50]. Schema del metabolismo eterotrofo in <i>C. necator</i> DSM 529. ....	20
<b>Figura 3.2.</b> Tratta da [26]. Via metabolica per la sintesi e la degradazione del PHB in <i>C. necator</i> . ....	21
<b>Figura 3.3.</b> Tratta da [34]. Via metabolica per la produzione di PHB da glucosio e acido acetico. ....	21
<b>Figura 5.1.</b> Retta di taratura del glucosio.....	36
<b>Figura 5.2.</b> Retta di taratura del fruttosio.....	36
<b>Figura 5.3.</b> Retta di taratura dell'acetato di sodio.....	37
<b>Figura 5.4.</b> Retta di taratura del PHB.....	38
<b>Figura 6.1.</b> Prova di fermentazione in beuta con 100% glucosio come fonte di carbonio. ....	39
<b>Figura 6.2.</b> Prova di fermentazione in beuta con 100% fruttosio come fonte di carbonio. ....	40
<b>Figura 6.3.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio.....	41
<b>Figura 6.4.</b> Prova di fermentazione in beuta con retentati zuccherini come fonte di carbonio.	42
<b>Figura 6.5.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta.....	43
<b>Figura 6.6.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 1 g/L dopo 15 h.....	45
<b>Figura 6.7.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 2 g/L dopo 15 h.....	46
<b>Figura 6.8.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 3 g/L dopo 15 h.....	46

<b>Figura 6.9.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 5 g/L dopo 15 h.....	46
<b>Figura 6.10.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 1 g/L al tempo zero. ....	48
<b>Figura 6.11.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 2 g/L al tempo zero. ....	48
<b>Figura 6.12.</b> Prova di fermentazione in beuta con 50% glucosio e 50% fruttosio e induzione con acetato 3 g/L al tempo zero. ....	48
<b>Figura 6.13.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta con induzione di acetato dopo 15 h utilizzando come fonte di carbonio la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio. ....	50
<b>Figura 6.14.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta con induzione di acetato al tempo zero utilizzando come fonte di carbonio la miscela al 50% glucosio e 50% fruttosio. ....	50
<b>Figura 6.15.</b> Prova di fermentazione in beuta con retentati zuccherini e induzione con acetato 2 g/L al tempo zero. ....	51
<b>Figura 6.16.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in beuta senza acetato e con induzione di acetato 2 g/L al tempo zero utilizzando come fonte di carbonio i retentati zuccherini. ....	52
<b>Figura 6.17.</b> Prova di fermentazione in modalità <i>batch</i> con 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio. ....	55
<b>Figura 6.18.</b> Prova di fermentazione in modalità <i>batch</i> con retentati zuccherini come fonte di carbonio.....	55
<b>Figura 6.19.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in modalità <i>batch</i> .....	56
<b>Figura 6.20.</b> Prova di fermentazione in modalità <i>fed-batch</i> con retentati zuccherini come fonte di carbonio. ....	57
<b>Figura 6.21.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in modalità <i>batch</i> e <i>fed-batch</i> impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio. ....	58
<b>Figura 6.22.</b> Prova di fermentazione in modalità <i>fed-batch</i> con retentati zuccherini e induzione con acetato 2 g/L al tempo zero. ....	59
<b>Figura 6.23.</b> Prova di fermentazione in modalità <i>fed-batch</i> con retentati zuccherini e induzione con acetato 2 g/L dopo 15 h. ....	60
<b>Figura 6.24.</b> Confronto tra le produzioni percentuali di PHB nelle prove di fermentazione in modalità <i>fed-batch</i> con induzione di acetato impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio principale.....	61

## Elenco delle tabelle

<b>Tabella 2.1.</b> Nomi di alcuni PHA in base alla struttura generale in Figura 2.1 [26].	6
<b>Tabella 2.2.</b> Confronto delle proprietà di scl-PHA e mcl-PHA con il polipropilene [9], [30].	8
<b>Tabella 4.1.</b> Composizione del terreno di LB.	25
<b>Tabella 4.2.</b> Composizione del terreno della precoltura II.	26
<b>Tabella 4.3.</b> Composizione del terreno di fermentazione.	26
<b>Tabella 4.4.</b> Composizione della soluzione di tracce element.	26
<b>Tabella 5.1.</b> Valori impiegati per la retta di taratura del glucosio.	35
<b>Tabella 5.2.</b> Valori impiegati per la retta di taratura del fruttosio.	36
<b>Tabella 5.3.</b> Valori impiegati per la retta di taratura dell'acetato di sodio.	37
<b>Tabella 5.4.</b> Valori impiegati per la retta di taratura del PHB.	37
<b>Tabella 6.1.</b> Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove preliminari in beuta.	43
<b>Tabella 6.2.</b> Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione preliminari in beuta.	44
<b>Tabella 6.3.</b> Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove in beuta con induzione di acetato al tempo zero e dopo 15 h, impiegando la soluzione 50% glucosio e 50% fruttosio come fonte di carbonio principale.	49
<b>Tabella 6.4.</b> Concentrazioni massime di biomassa e PHB nella prova in beuta con induzione di acetato 2 g/L al tempo zero impiegando i retentati zuccherini.	52
<b>Tabella 6.5.</b> Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in beuta con induzione di acetato in diverse concentrazioni.	53
<b>Tabella 6.6.</b> Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove di fermentazione in modalità <i>batch</i> .	55
<b>Tabella 6.7.</b> Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in modalità <i>batch</i> .	56
<b>Tabella 6.8.</b> Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in modalità <i>batch</i> e <i>fed-batch</i> impiegando i retentati zuccherini come fonte di carbonio.	58
<b>Tabella 6.9.</b> Concentrazioni massime di biomassa e PHB nelle prove di fermentazione in modalità <i>fed-batch</i> impiegando i retentati zuccherini.	60
<b>Tabella 6.10.</b> Parametri stimati dal modello matematico per le prove di fermentazione in modalità <i>fed-batch</i> con induzione di acetato.	61



## Bibliografia

- [1] C. S. K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, and V. C. Kalia, "Polyhydroxyalkanoates: An overview," *Bioresour. Technol.*, vol. 87, no. 2, pp. 137–146, 2003, doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2.
- [2] M. W. Ryberg, M. Z. Hauschild, F. Wang, S. Averous-Monnery, and A. Laurent, "Global environmental losses of plastics across their value chains," *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 151, no. March, p. 104459, 2019, doi: 10.1016/j.resconrec.2019.104459.
- [3] G. Z. Yin and X. M. Yang, "Biodegradable polymers: a cure for the planet, but a long way to go," *J. Polym. Res.*, vol. 27, no. 2, 2020, doi: 10.1007/s10965-020-2004-1.
- [4] R. Geyer, J. R. Jambeck, and K. L. Law, "Production, use, and fate of all plastics ever made," *Sci. Adv.*, vol. 3, no. 7, pp. 25–29, 2017, doi: 10.1126/sciadv.1700782.
- [5] D. K. A. Barnes, F. Galgani, R. C. Thompson, and M. Barlaz, "Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 364, no. 1526, pp. 1985–1998, 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0205.
- [6] Z. A. Raza, S. Abid, and I. M. Banat, "Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 126, no. October 2017, pp. 45–56, 2018, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001.
- [7] J. R. Jambeck *et al.*, "Plastic waste inputs from land into the ocean," *Science*, vol. 347, no. 6223, pp. 768–771, Feb. 2015, doi: 10.1126/science.1260352.
- [8] R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. V. Saal, and S. H. Swan, "Plastics, the environment and human health: Current consensus and future trends," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 364, no. 1526, pp. 2153–2166, 2009, doi: 10.1098/rstb.2009.0053.
- [9] E. Akaraonye, T. Keshavarz, and I. Roy, "Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 6, pp. 732–743, 2010, doi: 10.1002/jctb.2392.
- [10] M. Kolybaba, L. G. Tabil, S. Panigrahi, W. J. Crerar, T. Powell, and B. Wang, "Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future," in *ASABE/CSBE North Central Intersectional Meeting*, 2003, vol. 0300, no. 03, pp. 1–15, doi: 10.13031/2013.41300.
- [11] G. Kale, T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, S. E. Selke, and S. P. Singh, "Compostability of bioplastic packaging materials: An overview," *Macromol. Biosci.*, vol. 7, no. 3, pp. 255–277, 2007, doi: 10.1002/mabi.200600168.
- [12] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, and V. Alvarez, "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging," *Express Polym. Lett.*, vol. 8, no. 11, pp. 791–808, 2014, doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.
- [13] K. Sudesh and T. Iwata, "Sustainability of biobased and biodegradable plastics," *Clean - Soil, Air, Water*, vol. 36, no. 5–6, pp. 433–442, 2008, doi: 10.1002/clen.200700183.

- [14] B. Kunasundari and K. Sudesh, "Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates," *Express Polym. Lett.*, vol. 5, no. 7, pp. 620–634, 2011, doi: 10.3144/expresspolymlett.2011.60.
- [15] C. Kourmentza *et al.*, "Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production," *Bioengineering*, vol. 4, no. 2, pp. 1–43, 2017, doi: 10.3390/bioengineering4020055.
- [16] S. Khanna and A. K. Srivastava, "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 607–619, 2005, doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.053.
- [17] J. Wang, Z. B. Yue, G. P. Sheng, and H. Q. Yu, "Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation," *Biochem. Eng. J.*, vol. 49, no. 3, pp. 422–428, 2010, doi: 10.1016/j.bej.2010.02.005.
- [18] J. M. B. T. Cavalheiro *et al.*, "Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol," *Bioresour. Technol.*, vol. 111, pp. 391–397, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.176.
- [19] Beom Soo Kim, Seung Chul Lee, Sang Yup Lee, Ho Nam Chang, Yong Keun Chang, and Seong Ihl Woo, "Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 43, no. 9, pp. 892–898, 1994.
- [20] F. Karbasi, M. Ardjmand, H. Younesi, and S. Yaghmaei, "Investigation of Optimum Fermentation Condition for PHA Production by Four Species : *Cupriavidus necator* , *Azotobacter beijinckii*," vol. 20, no. 12, pp. 1713–1724, 2012, doi: 10.5829/idosi.wasj.2012.20.12.1414.
- [21] C. Marangoni, A. Furigo, and G. M. F. De Aragão, "Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding," *Process Biochem.*, vol. 38, no. 2, pp. 137–141, 2002, doi: 10.1016/S0032-9592(01)00313-2.
- [22] D. Y. Kim, H. W. Kim, M. G. Chung, and Y. H. Rhee, "Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates.," *J. Microbiol.*, vol. 45, no. 2, pp. 87–97, Apr. 2007, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483792>.
- [23] M. Zinn, B. Witholt, and T. Egli, "Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 53, no. 1, pp. 5–21, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00218-6.
- [24] J. Możejko-Ciesielska and R. Kiewisz, "Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?," *Microbiol. Res.*, vol. 192, no. 2016, pp. 271–282, 2016, doi: 10.1016/j.micres.2016.07.010.

- [25] J. Chee, S. Yoga, N. Lau, S. Ling, and R. M. M. Abed, "Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate ( PHA ): Converting Renewable Resources into Bioplastics," in *Méndez-Vilas, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2, Formatex, Badajoz, 2010, pp. 1395–1404.
- [26] S. Y. Lee, "Bacterial polyhydroxyalkanoates," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–14, Jan. 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P.
- [27] S. Bresan, A. Sznajder, W. Hauf, K. Forchhammer, D. Pfeiffer, and D. Jendrossek, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. March, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1038/srep26612.
- [28] R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, and I. Radecka, "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 6, pp. 1437–1449, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x.
- [29] K. Sudesh, H. Abe, and Y. Doi, "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 25, no. 10, pp. 1503–1555, 2000, doi: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [30] M. Zinn and R. Hany, "Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 7, no. 5, pp. 408–411, 2005, doi: 10.1002/adem.200500053.
- [31] A. N. Boyandin *et al.*, "Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 83, pp. 77–84, 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2013.04.014.
- [32] L. Garcia-Gonzalez and H. De Wever, "Acetic acid as an indirect sink of CO<sub>2</sub> for the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA): Comparison with PHA production processes directly using CO<sub>2</sub> as feedstock," *Appl. Sci.*, vol. 8, no. 9, 2018, doi: 10.3390/app8091416.
- [33] A. Atlić *et al.*, "Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 91, no. 2, pp. 295–304, 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3260-0.
- [34] J. Marudkla, W. C. Lee, S. Wannawilai, Y. Chisti, and S. Sirisansaneeyakul, "Model of acetic acid-affected growth and poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* DSM 545," *J. Biotechnol.*, vol. 268, no. January, pp. 12–20, 2018, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.004.
- [35] B. S. Kim, "Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 10, pp. 774–777, 2000, doi: 10.1016/S0141-0229(00)00299-4.
- [36] N. Berezina, "Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545," *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 192–195, 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2012.05.002.

- [37] F. Bosco and F. Chiampo, "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 109, no. 4, pp. 418–421, 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.012.
- [38] B. Singh Saharan, A. Grewal, and P. Kumar, "Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments," *Chinese J. Biol.*, vol. 2014, pp. 1–18, 2014, doi: 10.1155/2014/802984.
- [39] M. Koller *et al.*, "Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials †," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 561–565, Mar. 2005, doi: 10.1021/bm049478b.
- [40] M. Koller, A. Salerno, M. Dias, A. Reiterer, and G. Brauneegg, "Modern biotechnological polymer synthesis: A review," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 48, no. 3, pp. 255–269, 2010.
- [41] Y. Poirier, D. Dennis, K. Klomparens, C. Nawrath, and C. Somerville, "Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 103, no. 2–4, pp. 237–246, 1992, doi: 10.1016/0378-1097(92)90315-F.
- [42] P. C. Lemos, C. Viana, E. N. Salgueiro, A. M. Ramos, J. P. S. G. Crespo, and M. A. M. Reis, "Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 22, no. 8, pp. 662–671, 1998, doi: 10.1016/S0141-0229(97)00243-3.
- [43] M. S. I. Mozumder, H. De Wever, E. I. P. Volcke, and L. Garcia-Gonzalez, "A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production," *Process Biochem.*, vol. 49, no. 3, pp. 365–373, 2014, doi: 10.1016/j.procbio.2013.12.004.
- [44] E. Haba, J. Vidal-Mas, M. Bassas, M. J. Espuny, J. Llorens, and A. Manresa, "Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition," *Biochem. Eng. J.*, vol. 35, no. 2, pp. 99–106, 2007, doi: 10.1016/j.bej.2006.11.021.
- [45] M. S. Islam Mozumder, L. Garcia-Gonzalez, H. De Wever, and E. I. P. Volcke, "Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from CO<sub>2</sub>: Model development and process optimization," *Biochem. Eng. J.*, vol. 98, pp. 107–116, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2015.02.031.
- [46] S. Obruca, O. Snajdar, Z. Svoboda, and I. Marova, "Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, no. 12, pp. 2417–2428, 2013, doi: 10.1007/s11274-013-1410-5.
- [47] F. Huschner *et al.*, "Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts," *Process Biochem.*, vol. 50, no. 2, pp. 165–172, 2015, doi: 10.1016/j.procbio.2014.12.004.

- [48] J. Hänisch, M. Wältermann, H. Robenek, and A. Steinbüchel, “The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc2155, and provides an anchor to target other proteins,” *Microbiology*, vol. 152, no. 11, pp. 3271–3280, 2006, doi: 10.1099/mic.0.28969-0.
- [49] R. Cramm, “Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16,” *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 38–52, 2008, doi: 10.1159/000142893.
- [50] E. Volodina, M. Raberg, and A. Steinbüchel, “Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 36, no. 6, pp. 978–991, 2016, doi: 10.3109/07388551.2015.1079698.
- [51] J. M. B. T. Cavalheiro, M. C. M. D. De Almeida, M. M. R. Da Fonseca, and C. C. C. R. De Carvalho, “Adaptation of *Cupriavidus necator* to conditions favoring polyhydroxyalkanoate production,” *J. Biotechnol.*, vol. 164, no. 2, pp. 309–317, 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.01.009.
- [52] J. Wang and J. Yu, “Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions,” *Process Biochemistry*, vol. 36, no. 3, pp. 201–207, 2000, doi: 10.1016/S0032-9592(00)00169-2.