

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

Processi di recupero di PHB da specie batteriche



Relatore

prof. Debora Fino

Candidato

Francesco Marinucci

16/07/2018

Sommario

1. Introduzione	1
2. Bioplastiche e loro produzione	7
2.1. Definizione di bioplastica e brevi cenni storici	7
2.2. Caratteristiche dei polidrossialcanoati	8
2.3. Vie metaboliche per la sintesi dei PHA	12
2.4. Cenni sull'ingegneria genetica	17
2.5. Meccanismi di degradazione dei PHA	21
2.6. Allestimento delle colture batteriche	25
3. Processi di recupero della bioplastica	30
3.1. Estrazione con solvente	33
3.1.1. Caratteristiche dei solventi utilizzati	33
3.1.2. Ruolo dell'antisolvente	35
3.2. Tecniche di recupero alternative	36
3.3. Tecniche di purificazione	37
3.4. Presentazione del metodo di recupero oggetto di studio	38
4. Progettazione delle apparecchiature	40
5. Materiali e Metodi	48
5.1. Allestimento degli esperimenti	48
5.2. Preparazione delle colture	49
5.3. Svolgimento delle prove	49
5.4. Determinazione del peso secco della biomassa	51
5.4.1. Materiale occorrente	51
5.4.2. Procedimento	51
5.5. Estrazione del PHB con cloroformio	52
5.5.1. Materiale Occorrente	52
5.5.2. Procedimento	53
6. Risultati	55
6.1. Caratteristiche delle prove	55
6.2. Peso secco dei campioni e quantità iniziale di PHB	56
6.3. Estrazione con cloroformio e peso della plastica recuperata	58
6.4. Resa dell'estrazione	59
6.5. Tasso di recupero del PHB	61
7. Conclusioni	63

Per aspera ad astra

1. Introduzione

I polimeri hanno accompagnato la vita dell'uomo fin dagli albori della civiltà; è cosa nota che i primi abitanti del pianeta Terra si servissero di oggetti e manufatti formati da macromolecole naturali, come per esempio la cellulosa oppure il corno di animale. Con l'avanzare del progresso tecnologico si sono rese disponibili nuove conoscenze, sfruttate per ottenere anche dei polimeri artificiali. In tal senso è significativo il contributo da parte dell'inglese Alexander Parkes, primo a sintetizzare una plastica propriamente detta (Parkesite 1862). In seguito sono stati fatti notevoli passi in avanti grazie alla scoperta della celluloida (Hyatt 1870) e della bakelite (Baekland 1910), tuttavia lo sviluppo massiccio dell'industria delle materie plastiche è avvenuto soltanto a partire dagli anni 50 del secolo scorso, quando le numerose soluzioni sviluppate durante i due conflitti mondiali sono state applicate in campo civile. Oggigiorno sono disponibili molte tipologie differenti di polimeri, i quali trovano impiego nei settori più vari grazie alle loro peculiari caratteristiche ed al loro costo relativamente basso. Fanno tuttavia eccezione i cosiddetti tecnopolimeri per applicazioni specialistiche, per i quali le spese di produzione sono notevoli. Il problema principale che affligge questo settore industriale rimane la necessità di reperire i monomeri dalle sostanze derivanti dall'estrazione e dalla lavorazione del petrolio; è opinione comune, avvalorata da diversi studi a riguardo, che le riserve planetarie di carburanti fossili stiano esaurendo a velocità crescente e questa consapevolezza, già a partire dalla prima grave crisi petrolifera dovuta alla guerra del Kippur (1973), ha portato alla teorizzazione ed, in alcuni casi, allo sviluppo di soluzioni pratiche atte a sostituire gradualmente i derivati del petrolio nella produzione delle materie plastiche. Rilevante è, per esempio, il tentativo di produrre su larga scala polimeri interamente ottenuti da reazioni biologiche, tipiche di alcune specie batteriche in determinate condizioni ambientali. Tra queste sostanze ricordiamo l'acido polilattico (PLA) ed i poliidrossialcanoati (PHA), che potrebbero rappresentare una svolta nell'industria dei polimeri di largo consumo, perché hanno il notevole vantaggio di poter essere biodegradati, in quanto sintetizzati interamente grazie a vie metaboliche tipiche di alcuni microrganismi. Il passaggio a queste nuove tecnologie si sta rendendo necessario non soltanto per risparmiare le riserve di petrolio, ma anche per combattere l'elevatissimo tasso di inquinamento che ormai interessa quasi ogni angolo del pianeta. Parte di questi scarti viene destinata alla termovalorizzazione per il recupero energetico, ma l'eventuale contenuto di elementi nocivi per la salute (cloruri e fluoruri su tutti) e la possibilità

in fase di combustione di formazione di sostanze policicliche aromatiche (classificate come cancerogene) rendono questa soluzione un'arma a doppio taglio, dove gli aspetti negativi alla lunga nascondono i benefici. I dati, preoccupanti, a riguardo della produzione mondiale di plastica, indicano che oltre il 96% di tutti i manufatti polimerici non viene riciclato e che nell'arco di 20 anni la plastica prodotta potrebbe addirittura raddoppiare. Uno dei principali siti di inquinamento da prendere in considerazione è l'ambiente marino, dal momento che prima o poi tutti gli scarti vi confluiscono. Grazie ad eventi fortuiti, come l'incidente della Ever Laurel nel 1992, gli oceanografi sono stati in grado di ricostruire le rotte delle correnti marine intorno al globo terrestre, in modo da prevedere, con un certo grado di precisione, il destino dei detriti galleggianti. In maniera del tutto casuale, Charles Moore, durante una competizione per yacht nel Pacifico nel 1997, si è imbattuto nella Eastern Garbage Patch (EGP), la più grande massa di rifiuti antropici galleggiante attualmente presente sugli oceani [1]. La percentuale maggiore degli scarti che compongono la EGP sono di natura plastica e sono delle più varie tipologie (giocattoli, reti da pesca, bottiglie, buste e contenitori et cetera) ed è stato calcolato che, in questa zona, gli oggetti estranei superano il plancton con un rapporto di 6:1; questo causa enormi problemi non solo alla fauna marina, costretta a nutrirsi di sostanze non commestibili e tossiche, ma anche alle varie specie di uccelli che normalmente tendono a trovare il proprio nutrimento sulla superficie dell'oceano [1]. La presenza di plastica potenzialmente ingeribile non è poi il solo problema correlato a questa situazione: infatti a causa del materiale estraneo abbandonato in mare, molti animali corrono il grave pericolo di rimanere intrappolati all'interno di reti o altro, divenendo facile bottino per i predatori di zona. Il problema dei rifiuti non è circoscritto solo alle zone di oceano in cui essi si accumulano, ma è esteso anche alla deposizione dei detriti di plastica in prossimità di coste e spiagge. I dati sull'intrappolamento (entanglement) indicano che le specie animali colpite da questo fenomeno sono di diversa natura (Fig. 1.1.).

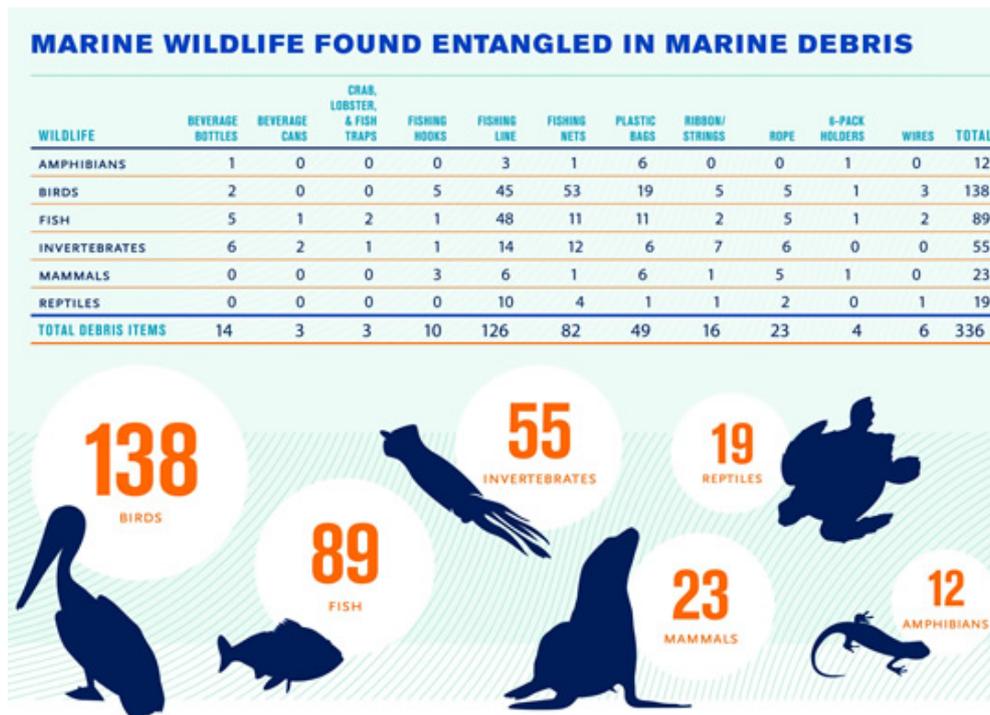


Figura. 1.1.: *Dati sull'intrappolamento di diverse specie animali in prossimità delle coste [2].*

Come accennato, alcune matrici polimeriche vengono additivate di diverse sostanze per conferire loro delle particolari caratteristiche ed il più delle volte questi elementi aggiuntivi sono nocivi. A causa dell'ingestione di minuscole particelle di plastica da parte dei pesci, queste sostanze possono depositarsi nei tessuti molli, risalendo dunque la catena alimentare fino ad arrivare all'uomo, causando potenzialmente danni gravissimi alla salute. In questa cornice diventa evidente come il passaggio all'utilizzo di materiale plastico biodegradabile derivato da fonti rinnovabili sia una tappa fondamentale nel percorso di abbattimento dell'impatto antropico sull'ambiente. La continua ricerca di nuove soluzioni tecnologiche è imprescindibile per il raggiungimento dell'obiettivo ed a questo proposito va menzionato il progetto CELBICON per i traguardi che potrebbe raggiungere [3]. È tuttavia riduttivo parlare di CELBICON soltanto a riguardo della possibilità di produzione di PHA, dal momento che si inserisce in un contesto molto più ampio e con molti altri obiettivi. Lo scopo principale è cercare di impiegare le emissioni gassose di CO₂ da fonti diverse per ottenere prodotti chimici biodegradabili e biocarburante [3]. Ciascuna sezione del processo è affidata ad un diverso ente di ricerca o azienda di settore, data la complessità delle operazioni che si vogliono portare avanti. L'idea alla base prevede di catturare la CO₂ atmosferica grazie ad un'unità adsorbente

appositamente progettata, per poi comprimerla e discioglierla nell'acqua ed in seguito inviarla all'interno di una cella elettrochimica, che sia in grado di effettuare la trasformazione al catodo di anidride carbonica ed acqua in monossido di carbonio ed idrogeno, nonché in sostanze solubili ad alto interesse chimico (per esempio acido formico e metanolo) [3]. La produzione di idrogeno fa parte della linea ad alta pressione del processo, mentre l'ottenimento dei green chemicals è raggiunto con un trattamento a pressione inferiore. Affinché questo sia possibile, deve necessariamente avvenire una reazione di riduzione in corrispondenza dell'anodo ed è stata selezionata quella di trasformazione del furfurale (composto chimico presente negli scarti agroalimentari) in acido furoico (utilizzato come battericida industriale), per la buona efficienza teorica riscontrata [3]. Una volta ottenuti H₂ e CO, è prevista l'alimentazione di questa corrente gassosa al bioreattore, nel quale è presente una biomassa formata da *Rhodospirillum rubrum*, un batterio dalle potenzialità molto interessanti, capace di sintetizzare teoricamente PHA fino a coprire circa l'80 % del suo peso secco [3]. A processo ultimato, la fase di downstream si occupa di effettuare la lisi cellulare ed il recupero della plastica appena prodotta, badando bene di non eccedere nei costi e di non arrivare alla degradazione del polimero. Ci sono diversi metodi pratici per poter effettuare l'estrazione del PHA dalle cellule batteriche. Il problema principale da fronteggiare nelle operazioni di downstream è sicuramente quello di dover causare la rottura della parete cellulare, dal momento che la sostanza di interesse è un prodotto intracellulare del metabolismo delle specie in questione. Tra le varie metodiche disponibili, vi è quella della Flash Explosion (FE), la quale prevede di portare il volume di biomassa da processare in condizioni di pressione tali che l'acqua contenuta all'interno delle cellule si trovi ancora nello stato liquido, a dispetto di una temperatura che normalmente causerebbe la sua evaporazione. Una volta effettuato questo stadio, la corrente viene fatta espandere isoentalpicamente attraverso una valvola di laminazione ed il repentino ritorno della pressione alle condizioni atmosferiche provoca l'immediata evaporazione delle molecole di acqua, che provocano l'esplosione della cellula. Come ultimo passo, in un altro serbatoio avviene la separazione dal materiale cellulare del PHA prodottosi, che così può essere analizzato e classificato (Fig. 1.2.). Lo scopo di questa tesi è tentare di dimostrare l'efficacia della FE per applicazioni di questo tipo, cercando di ottenere un biopolimero ad una purezza ragionevolmente alta e con tassi di recupero abbastanza soddisfacenti da poter giustificare un eventuale impiego su larga scala di questo processo. Lo svolgimento delle prove di laboratorio è stato subordinato alla realizzazione presso la Hysytech s.r.l. dei serbatoi necessari all'accumulo della biomassa processata e della progettazione della valvola di espansione. Sebbene ancora in fase sperimentale, il progetto CELBICON, così come anche altre iniziative

dello stesso tipo, potrebbe essere una valida risorsa per il futuro dell'industria polimerica e dei green chemicals ed alla luce dei dati sull'inquinamento che sono stati riportati è necessario prendere molto sul serio la questione dei rifiuti e, nella mia personale opinione, lo sviluppo delle tecnologie per la produzione delle plastiche da microrganismi rappresenterebbe un'opzione a medio-lungo termine per abbattere significativamente l'impatto ambientale causato dall'industria polimerica tradizionale, oltre che per ridurre considerevolmente l'impiego dei derivati del petrolio nei processi produttivi delle plastiche.

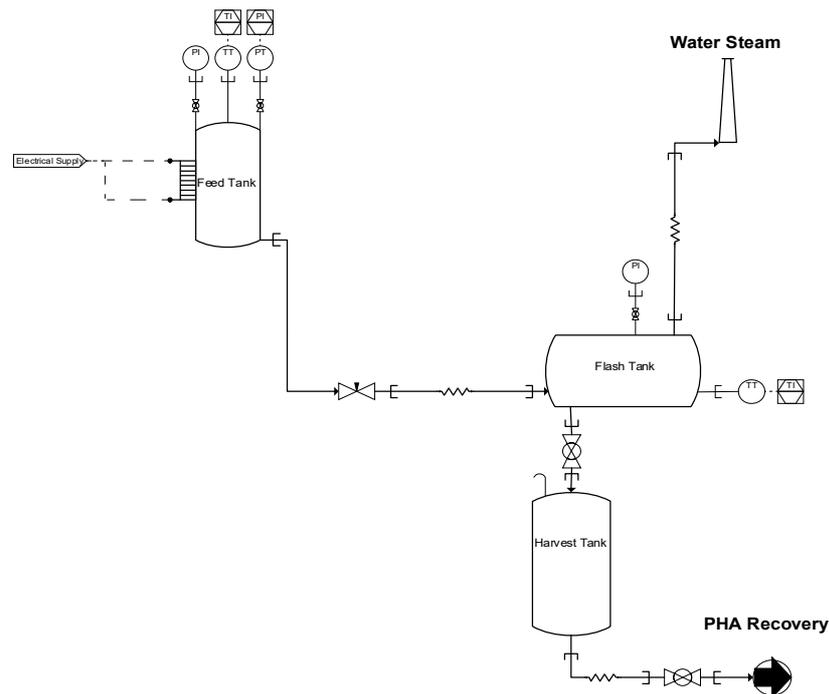


Figura. 1.2.: *Diagramma del processo di Steam Explosion per il recupero di PHA.*

La sfida per il futuro è quella di riuscire a produrre notevoli quantità di PHA (di cui si parlerà esclusivamente nel prosieguo della trattazione) a costi relativamente bassi ed in tempi brevi. L'indubbio vantaggio della produzione delle bioplastiche sussiste sicuramente nel considerevole abbattimento dell'utilizzo delle risorse derivate dal petrolio, però vanno tuttavia fatte anche alcune considerazioni sui punti a sfavore di queste nuove tecnologie; a parte le sopracitate riflessioni sulla eventuale parziale biodegradabilità, non bisogna trascurare che per poter fornire il substrato necessario alla produzione di materiali derivati da fonti naturali occorre utilizzare gran parte dei terreni agricoli già in uso per le esigenze alimentari della popolazione.

Inoltre gli eventuali impianti produttivi avranno un determinato impatto ambientale in termini di emissioni e risorse consumate, senza dimenticare che non tutti i ceppi batterici selezionati per la produzione mostrano una potenziale replicabilità su scala industriale della produttività mostrata in laboratorio. In ogni caso il comparto petrolchimico sta progressivamente evolvendo verso soluzioni tecniche a minore impatto ambientale, data la progressiva scarsità di materia prima fossile ed in tal senso ne è un esempio la recente riconversione da parte di ENI del proprio impianto di raffinazione di Porto Marghera, trasformato in una bioraffineria. Il traguardo che questa tesi si pone di raggiungere è la sperimentazione del procedimento di FE per il recupero della bioplastica, al fine di provarne o meno l'efficacia in vista di una eventuale futura applicazione su scala industriale e per perseguire tale scopo è stato necessario progettare e realizzare un apparato di test presso l'officina di Hysytech s.r.l.. La fase di design è stata dedicata alla costruzione di due serbatoi in acciaio inossidabile, uno dei quali destinato ad accogliere il campione di prova durante il raggiungimento dei parametri fisici operativi (temperatura e pressione), l'altro, invece, creato per poter raccogliere la soluzione dopo l'avvenuta laminazione attraverso la valvola. Parallelamente alla realizzazione dei recipienti è stato effettuato il dimensionamento della suddetta valvola, sulla base della pressione teoricamente raggiungibile a monte, dopo aver fissato la portata di liquido da processare grazie al diametro dei tubi di collegamento scelti. L'intera campagna sperimentale è stata impostata per provare l'efficacia della Flash-Explosion, ma, dal momento che questa tecnica è risultata inefficace dai risultati delle prove preliminari, si è scelto di effettuare dei test per confermare la bontà della scelta della metodica di Gas-Explosion, utilizzando sia l'azoto che l'anidride carbonica. Ultime le sperimentazioni si è passati a lavorare presso i laboratori del Politecnico di Torino e di IIT (Istituto Italiano di Tecnologia) con lo scopo di ottenere delle informazioni sul tasso di recupero di plastica con la procedura di GE e sulla efficacia della disgregazione cellulare raggiunta grazie a questo metodo. Infine, i risultati ottenuti e le relative conclusioni sono stati riportati in questo documento, in modo da provare a fornire una risposta soddisfacente al proposito di scegliere la GE come procedura standard di recupero del PHB all'interno del progetto CELBICON.

2. Bioplastiche e loro produzione

2.1. Definizione di bioplastica e brevi cenni storici

Da un punto di vista puramente concettuale, si definisce una “*bioplastica*” qualsiasi tipo di materiale con caratteristiche morfologiche e fisiche simili ai polimeri di origine petrolchimica, ma che al contempo sia prodotta a partire da fonti rinnovabili, sia riciclabile e sia soprattutto biodegradabile [4]. Contrariamente alle plastiche prodotte tradizionalmente, questa innovativa tipologia di materiali può derivare da una biomassa, la quale è in grado di sintetizzare catene polimeriche come tappe intermedie del proprio metabolismo [4], oppure da materie prime di origine naturale, come ad esempio la cellulosa o l’amido. In generale, però, non bisogna commettere l’errore di considerare ogni plastica prodotta con questa metodologia come totalmente rispettosa dell’ambiente; infatti si può prendere come caso esplicativo quello dell’acido polilattico, che diviene biodegradabile solo in seguito al raggiungimento di determinate condizioni ambientali (temperatura del polimero intorno ai 55 °C e umidità relativa ambientale pari almeno al 10%) [5]. Lo smaltimento di questa classe di macromolecole avviene grazie a particolari microrganismi identificati in ambienti ben precisi (terreno, discariche, scarichi civili ed industriali), i quali sono in grado di servirsi dei biopolimeri come fonte di carbonio per i propri processi metabolici. Le reazioni di degradazione possono avvenire sia in assenza che in presenza di ossigeno e questo influirà sui composti che verranno liberati in ambiente alla fine della catena di reazioni biologiche. Per quanto riguarda i polimeri naturalmente prodotti da alcuni ceppi batterici, è da ricordare che nel 1925 il microbiologo francese Maurice Lemoigne scoprì i meccanismi di produzione ed accumulo del poliidrossibutirrato (PHB), in particolari condizioni di nutrimento e stress esterno, all’interno delle cellule del *Bacillus megaterium*, ponendo le basi per i futuri utilizzi dei microrganismi nel settore delle bioplastiche [6]. Questa tipologia di polimero viene utilizzata dal suo organismo produttore come riserva di energia; infatti è stato notato che, al ritorno del batterio nel suo habitat di crescita ottimale, il PHB prodotto viene lentamente metabolizzato ed utilizzato come ulteriore fonte di carbonio [7]. A partire dalla scoperta di Lemoigne sono stati fatti dei tentativi di utilizzare questi sistemi biologici per la sintesi su scala industriale di plastiche naturali, ma non sempre si è arrivati a produttività tali da poter giustificare importanti investimenti del settore, anche alla luce della elevata competitività dei polimeri derivanti da fonti fossili. Emblematici sono in tal senso i casi della Zeneca, società britannica attiva dai primi anni ’80,

che produceva e commercializzava PHB sotto il nome di Biopol [7] fino al 1998 e l'austriaca Biotechnologische Forschungsgesellschaft, che si dedicava alla sintesi della stessa molecola [7]; entrambi i processi produttivi non sono stati in grado di imporsi sul mercato per questioni legate agli elevati costi produttivi, a fronte di una domanda all'epoca abbastanza limitata. I primi sforzi nazionali nel tentativo di creare un materiale sostitutivo delle tradizionali materie plastiche sono stati profusi dalla Novamont, azienda nata nel 1990, la quale è riuscita a sviluppare un polimero a partire dall'amido di mais, il Mater-Bi[®]. Esso viene utilizzato prevalentemente nel settore imballaggi e come rimpiazzo per i sacchetti in polietilene. Un'altra azienda molto importante nel panorama europeo è sicuramente la tedesca Biomer, produttrice dell'omonimo PHB. Le differenze tra le varie filosofie di sintesi derivano principalmente dai microbi utilizzati nelle fermentazioni e dalla composizione dei terreni di coltura. Parlando di questi ultimi, si può dire che la scelta di un substrato correttamente bilanciato, in grado di rispondere alle esigenze produttive, è abbastanza complessa e che le sostanze contenute in esso a volte possono essere anche molto costose. Con il progredire della ricerca sono stati scoperti ed isolati molti altri ceppi batterici in grado di fornire PHA e l'ingegneria genetica ha permesso di isolare gli operoni responsabili della sintesi dei particolari enzimi necessari a queste vie metaboliche, in modo tale da utilizzare la tecnologia del DNA ricombinante per creare nuovi sistemi di espressione atti a migliorare la velocità del processo produttivo.

2.2. Caratteristiche dei polidrossialcanoati

Dal punto di vista chimico, i PHA sono appartenenti alla classe dei poliesteri e mostrano differenti caratteristiche a seconda delle varie unità monomeriche che li compongono. Diverse specie di batteri producono diversi tipi di polimeri, in base al proprio patrimonio genetico ed al substrato utilizzato per la biosintesi. Queste molecole possono essere suddivise in polimeri a catena laterale corta (Short Side Chain, SSC) oppure a catena laterale media (Medium Side Chain, MSC), in relazione alla differente lunghezza dei gruppi sostitutivi [8] (Fig. 2.1.).

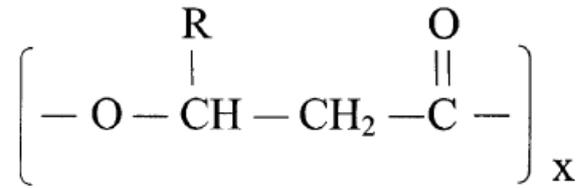


Figura. 2.1.: *Rappresentazione della struttura di un PHA generico [8].*

Alcuni tipi di PHA hanno la struttura degli omopolimeri (come il poliidrossibutirrato PHB), ma si possono modificare con criterio il substrato e la via sintetica per poter avere anche dei copolimeri (dei quali un esempio può essere il poliidrossibutirrato-idrossivalerato PHBV), in base alle caratteristiche desiderate. In generale queste sostanze vengono sintetizzate dai batteri come riserva di energia sotto forma di carboidrati quando sussistono delle modifiche a carico dell'ambiente in cui essi si trovano a vivere ed in base alla tipologia della fonte di carbonio disponibile per estrarre le componenti necessarie alla propria sopravvivenza. È stata notata un'interessante caratteristica nelle unità monomeriche che compongono questi polimeri: esse si manifestano tutte nella configurazione chirale destrogira, ennesima riprova del fatto che le reazioni di biosintesi mediate da enzimi sono estremamente stereospecifiche [7]. Questa peculiarità potrebbe essere sfruttata in applicazioni dove occorre avere un polimero enantiomericamente puro [7]. La massa di un generico PHA oscilla tra i 50.000 ed i 1.000.000 Da [8] ed a volte, come è stato detto, possono esserci anche reazioni di copolimerizzazione per ottenere sostanze dalle caratteristiche peculiari [8]. I poliidrossialcanoati presentano delle proprietà fisiche e meccaniche molto simili a quelle dei polimeri termoplastici, ma in alcuni casi mostrano un comportamento assimilabile agli elastomeri. In particolare si è scelto di focalizzare l'attenzione sul poliidrossibutirrato (PHB), il quale mostra molte similitudini con il polipropilene (PP), con cui condivide la degradazione intorno ai 180 °C e le caratteristiche fisiche [9] (Fig. 2.2.).

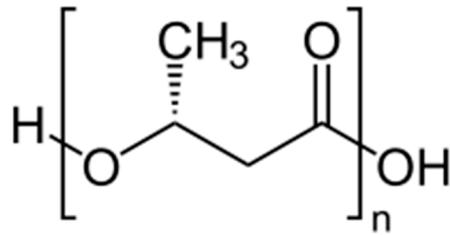


Figura. 2.2.: *Struttura molecolare del poliidrossibutirrato (PHB), uno dei PHA più versatili [9].*

Le molecole in questione vengono prodotte in seguito a processi metabolici di tipo fermentativo a carico di substrati di origine lipidica oppure zuccherina e se ne riesce a notare l'accumulo all'interno delle cellule dei batteri grazie a tecniche di microscopia (Fig. 2.3.).



Figura. 2.3.: *Immagine al TEM (microscopio elettronico a trasmissione) di cellule batteriche che mostrano accumulo di PHB. Da notare il colore bianco dei grani, segno distintivo di questo materiale [10].*

In natura sono stati individuati diversi generi di batteri in grado di sintetizzare PHA, come mostrato nella tabella 1, sia tra i Gram positivi, che tra quelli negativi. Le possibilità di applicazione di queste molteplici varietà di polimeri sono molto interessanti e secondo le stime più recenti si sta registrando un discreto incremento nel settore produttivo per questi materiali, date le promettenti potenzialità [8].

Tabella 1: Breve elenco di alcuni PHA prodotti a partire da diverse specie batteriche [8].

Microorganism	Carbon source	PHA	PHA content (%w/v)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gluconate	PHB	46–85
	Propionate	PHB	26–36
	Octanoate	PHB	38–45
<i>Bacillus megaterium QMB1551</i>	Glucose	PHB	20
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinants	Molasses	PHB	65
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 1267	Fructose/methanol	PHB	30
<i>M. extorquens</i> (ATCC55366)	Methanol	PHB	40–46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia and castor oil	PHA	20–30
<i>P. denitrificans</i>	Methanol	P(3HV)	0.02
	Pentanol	P(3HV)	55
<i>P. oleovorans</i>	Glucanoate	PHB	1.1–5.0
	Octanoate	PHB	50–68
<i>P. putida GPp104</i>	Octanoate	PHB	14–22
<i>P. putida</i>	Palm kernel oil	PHA	37
	Lauric acid	PHA	25
	Myristic acid	PHA	28
	Oleic acid	PHA	19
<i>P. putida</i> BM01	11-Phenoxyun-decanoic acid	5POHV	15–35
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucose	PHB	40

Tuttavia non sempre queste molecole vengono applicate nel loro stato originario. Per esempio il PHB puro presenta elevata fragilità, così come il suo copolimero PHBV, dunque le possibilità operative ne sono fortemente condizionate. Le ragioni di questa limitazione sono principalmente da ricercarsi all'interno della struttura cristallina del materiale; infatti la matrice amorfa del polimero va incontro ad un secondo processo di ricristallizzazione all'approssimarsi della temperatura di transizione vetrosa (T_g). È cosa nota che la mobilità delle catene di un polimero risulti fortemente impedita per valori di temperatura prossimi o al di sotto della T_g e dal momento che questo importante parametro fisico è quasi prossimo alla temperatura ambiente per queste sostanze, è logico dedurre che la loro lavorabilità sia molto bassa [9]. Per la loro natura intrinseca, i PHA vengono prodotti privi di impurità, le quali potrebbero agire da centri di nucleazione aggiuntivi, in grado di modificare la cinetica di cristallizzazione promossa dal raffreddamento a temperatura ambiente. Nella seconda cristallizzazione le catene amorfiche vengono inglobate nella matrice a maggiore percentuale cristallina grazie alla formazione di nuovi legami, con il risultato di avere degli ulteriori impedimenti al moto molecolare dei segmenti polimerici [9]. Ci sono delle strategie per migliorare lo scorrimento delle catene e,

dunque, la deformabilità di un polimero del genere; l'aggiunzione di plastificanti porta a buoni risultati in termini di aumento della duttilità, perché causa l'abbassamento della temperatura di transizione vetrosa [9] e, dal momento che si sta parlando di sostanze liquide, l'aggiunta di questi agenti ha il pregio di migliorare lo scorrimento relativo che c'è tra le varie catene del polimero, ostacolando il comportamento fragile. Tra le altre soluzioni tecniche per diminuire il comportamento fragile dei PHA, c'è la possibilità di creare delle miscele con determinate sostanze, anche di origine naturale (a tal scopo si utilizzano, tra le altre, la glicerina, il glicole polietilenico, vari esteri) direttamente durante la fase di stampaggio del polimero, la quale avviene in soluzione con liquidi affini a queste sostanze (cloroformio, dicloroetano ed altri). Si nota in questi casi un aumento della duttilità del polimero, a scapito però della resistenza a rottura. Nel caso dell'aggiunta di un ulteriore monomero, prendendo come caso esemplificativo il copolimero PHBV, si nota un aumento della temperatura di cristallizzazione, ma, contemporaneamente, è evidente un abbassamento della temperatura di fusione, che limita i settori di impiego. In generale, per quanto riguarda le caratteristiche meccaniche dei PHA, è preferibile evitare un eccessivo grado di cristallizzazione, dal momento che questa configurazione molecolare tende a infragilire le catene polimeriche, quando sarebbe desiderabile una maggiore flessibilità delle stesse, non soltanto in fase di lavorazione, ma anche in campo pratico.

2.3. Vie metaboliche per la sintesi dei PHA

Con il termine “metabolismo”, derivante dal greco antico *μεταβολή*, cambiamento, si intende quell'insieme di reazioni biologiche che avvengono all'interno delle cellule degli esseri viventi, affinché queste ultime possano continuare a sopravvivere. I meccanismi coinvolti sono molteplici e complessi, dal momento che implicano un vasto numero di enzimi e molecole. Occorre fare una distinzione tra le diverse trasformazioni biologiche, poiché le reazioni in questione sono tradizionalmente suddivise in due gruppi:

- ✚ **Reazioni Cataboliche:** rappresentano la parte iniziale del metabolismo, durante la quale avviene la degradazione delle macromolecole introdotte nel sistema e, attraverso la respirazione cellulare o reazioni equivalenti, viene prodotta l'energia necessaria allo svolgimento dei processi successivi.

✚ **Reazioni Anaboliche:** è la fase del metabolismo in cui l'energia ricavata in precedenza viene impiegata nella sintesi di molecole necessarie alla cellula, quali ad esempio proteine ed acidi nucleici.

Sia gli organismi eucarioti che quelli procarioti mostrano particolari serie di reazioni metaboliche, atte a trasformare un determinato composto. Questi stadi di reazione sono accelerati da enzimi estremamente specifici, che assolvono la funzione di catalizzatori biologici. Una determinata sequenza di trasformazioni prende il nome di “via metabolica” ed è molto interessante notare come sia in cellule estremamente semplici, che in quelle più complesse molte di queste vie siano in comune. Questo avvalorava le ipotesi secondo le quali l'evoluzione degli esseri viventi sul nostro pianeta derivi da un progenitore comune, il quale, differenziandosi in seguito, ha dato origine alle diverse tipologie di sistemi biologici. Le molecole necessarie alle cellule possono essere distinte in 4 grandi categorie:

✚ **Proteine:** sono formate, mediante legami peptidici, da lunghe sequenze di amminoacidi, di cui non tutti sono sintetizzabili dagli organismi stessi (amminoacidi essenziali). Molte di esse sono enzimi necessari alle reazioni chimiche di cui si è parlato in precedenza, ma sono coinvolte anche in altre funzioni molto importanti, come la comunicazione tra le cellule, l'induzione di una risposta biochimica in un particolare sistema, la generazione della risposta immunitaria al riconoscimento di uno specifico antigene.

✚ **Polisaccaridi:** le unità fondamentali che compongono questi polimeri sono i monosaccaridi, noti anche come zuccheri semplici (il glucosio o il fruttosio, per citarne alcuni). Possono essere lineari o ramificati, in alcuni casi hanno anche una struttura ad anello e sono deputati a particolari compiti all'interno dei sistemi biologici; sono in grado di immagazzinare e conservare energia in eccesso (formazione di amido delle piante e di glicogeno negli animali) e possono anche servire come polimeri strutturali (cellulosa nei vegetali e chitina negli invertebrati).

- ✚ **Lipidi:** sotto questo nome vengono tradizionalmente raggruppate una serie di molecole che hanno come caratteristica comune l'idrofobia. Esempi di sostanze lipidiche normalmente presenti all'interno delle cellule sono i trigliceridi, che vengono utilizzati come riserva energetica ed accumulati nel tessuto adiposo, i fosfolipidi contenuti all'interno della membrana cellulare ed i precursori degli ormoni steroidei, nella fattispecie il colesterolo.

- ✚ **Acidi Nucleici:** probabilmente costituiscono la categoria di molecole più importante per le funzioni biologiche; infatti sia il DNA che il RNA (rispettivamente acido deossiribonucleico e acido ribonucleico) risultano fondamentali nel trasferimento dell'informazione contenuta nel codice genetico alle successive generazioni cellulari, garantendo così la sopravvivenza della specie. La sintesi degli acidi nucleici e dei loro componenti è importante anche per le operazioni di trascrizione dell'informazione genetica per la sintesi proteica (m-RNA) e per le operazioni di riparazione del DNA quando si renda necessario. Entrambi gli acidi sono formati dai nucleotidi, composti da una base azotata, uno zucchero pentoso (deossiribosio in un caso e ribosio nell'altro) ed un gruppo fosfato.

È risaputo che precise specie di microrganismi prediligano specifiche sostanze nutritive e questo influenza sicuramente la composizione del terreno ove allestire le colture di laboratorio. Ad ogni modo, in risposta a subitane variazioni delle condizioni ambientali di crescita, una cellula può reagire modificando le reazioni del proprio metabolismo, vedendo variare di conseguenza le sostanze prodotte durante le tappe intermedie e, in alcuni casi, anche il prodotto finale della fase anabolica. I cambiamenti a carico dei diversi stadi di reazione sono dovuti all'accensione o allo spegnimento degli operoni presenti nel codice genetico, che recano le istruzioni necessarie per sintetizzare o meno un determinato enzima. Questo sistema di adattamento è alla base dei moderni processi di produzione di sostanze bioderivate e questo settore industriale è in rapida espansione, in quanto l'ingegneria genetica sta compiendo notevoli progressi nella comprensione dei sistemi di regolazione dell'espressione genica. Come è stato accennato in precedenza, esistono molte specie batteriche in grado di sintetizzare PHA seguendo specifiche vie di biosintesi. Tutte le informazioni necessarie per ottenere le proteine e gli enzimi sono codificate all'interno del genoma del microrganismo in questione.

Interessanti, a tal proposito sono stati gli studi effettuati prendendo come specie batterica *Alcaligenes eutrophus*, un microrganismo capace di accumulare quantità molto considerevoli di PHB, con percentuali intorno al 70-80% del proprio peso secco. In seguito a modificazioni nella somministrazione di almeno un elemento nutritivo chiave (come per esempio l'azoto oppure la fonte carboniosa stessa) [6], è stato messo in evidenza che l'acetil-CoA, generatosi a partire dalla gliceraldeide 3-fosfato ottenuta alla fine del catabolismo del glucosio, rappresenta il primo intermedio necessario alla sintesi del PHB, dal momento che in questa situazione non viene impiegato nel ciclo di Krebs. La sintesi del polimero avviene mediante l'azione di tre enzimi specifici, i quali sono stati identificati all'interno delle cellule di *A.eutrophus* [6]. La prima reazione prevede di condensare due molecole di acetil-CoA per fornirne una di acetoacetil-CoA, il quale viene poi ridotto per via enzimatica a idrossibutiril-CoA, inserito successivamente all'interno di una cascata di reazioni di polimerizzazione a stadi per fornire poli-idrossibutirrato. I complessi proteici coinvolti nei tre stadi sono, in ordine, 3-chetotilasi, acetoacetil-CoA riduttasi e PHA-sintasi. Gli enzimi necessari a questa via biosintetica continuano a svolgere il loro compito anche se, in contemporanea con il substrato di partenza, è presente un'ulteriore fonte di carbonio: questo genera delle differenze all'interno del meccanismo di sintesi e porta ad avere dei copolimeri, i cui monomeri vengono ottenuti per vie differenti [6]. Un esempio può essere rappresentato dall'ottenimento, ad opera della stessa serie enzimatica e sempre all'interno delle cellule di *A.eutrophus*, di poli-idrossibutirrato-valerato, del quale la sequenza monomerica idrossibutirrica è creata sempre a partire dal glucosio mediante acetil-CoA, mentre la catena idrossivalerica è il risultato del catabolismo dell'acido propionico (Fig. 2.4).

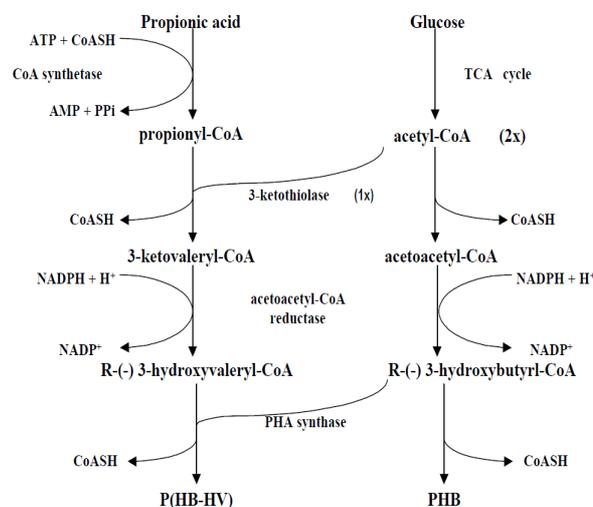


Figura. 2.4.: Sequenze di sintesi di PHB e PHBV all'interno di cellule di *A.eutrophus* [6].

Il prodotto finale viene accumulato sotto forma di granuli di colore bianco; in alcuni casi sono stati osservati depositi da circa 8-13 sfere con diametri compresi tra 0,2-0,5 μm [6]. Per verificare l'efficacia del processo di sintesi, possono essere effettuate diverse prove con l'obiettivo di rilevare la quantità di plastica presente intracellularmente. Alcuni di questi test non prevedono la distruzione della cellula, dunque hanno il vantaggio di poter indagare sulla resa del processo senza danneggiare la biomassa in coltura. In letteratura si trovano esempi applicativi di analisi agli infrarossi con trasformata di Fourier (FT-IR), cui vengono sottoposte le cellule per poter rilevare i picchi di assorbanza specifici per determinate sequenze molecolari. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule di *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas alkaligenes*, i quali producono PHA con diverse catene monomeriche [11]. In questo caso particolare la coltura batterica per la prima tipologia di batterio è stata allestita su melasso, mentre per le successive specie si è scelto di operare su terreni ricchi rispettivamente di glucosio ed ottanoato di sodio in precise quantità (8 mg L^{-1} per il primo substrato e 15 mg L^{-1} per il secondo) [11]. La bontà di questa tecnica analitica viene confermata dal confronto fatto con il cromatogramma ottenuto su campioni di PHA estratti in precedenza ed analizzati mediante Gel Permeation Chromatography (GPC) e si rilevano valori di assorbanza molto simili per gruppi funzionali comparabili [11]. I risultati sperimentali per questi tre ceppi batterici confermano abbastanza bene le ipotesi secondo le quali le plastiche ottenute per via biosintetica abbiano un grado di purezza molto buono; infatti, secondo i dati ottenuti, le assorbanze a determinate lunghezze d'onda combaciano con i picchi derivati dal gas cromatografo ed i risultati dello studio sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2: riassunto dell'analisi sulla purezza di PHA da diversi ceppi batterici [11].

Strain ID no.	Source of sample collection	FT-IR analysis		GC analysis: PHA monomer composition (%)
		Wave-number (cm ⁻¹)	Possible PHA components	
UWD	Kindly provided by Dr. W.J. Page (University of Alberta)	1728 1262	PHB	100HB
DG0801	Oil-contaminated river	1739 1261 2925	HB and mclHA	92HB, 8HD
DG0802	Oil-contaminated river	1739 1260 2924	HB and mclHA	98HB, 2HO
DG0805	Oil-contaminated river	1744 1165 2926(s)	mclHA	0.3HB, 58HO, 41HD
DG0806	Oil-contaminated soil	1744 1162 2926(s)	mclHA	22HO, 78HD
DG0815	Oil-contaminated river	1744 1165 2928(s)	mclHA	0.6HB, 19HO, 80HD
DG1317	Oil-contaminated sea (the Yellow Sea)	1744 1165 2928(s)	mclHA	0.4HB, 20HO, 80HD
YS2	Petroleum waste-water treatment plant	1739 1257 2926	HB and mclHA	23HB, 39HO, 38HD
YS10	Petroleum waste-water treatment plant	1739 1258 2926	HB and mclHA	14HB, 50HO, 36HD
YS12	Petroleum waste-water treatment plant	1739 1257 2926	HB and mclHA	22HB, 40HO, 38HD
YS13	Petroleum waste-water treatment plant	1744 1168 2929(s)	mclPHA	0.3HB, 59HO, 41HD

In natura esistono molte specie differenti che siano in grado di fornire questo particolare tipo di plastica, ma mantenere e creare delle colture di ceppi batterici puri può non essere una strategia vincente per avere una buona produttività. Il problema di lavorare con dei ceppi particolari è rappresentato dalla facilità di contaminazione e dalla difficoltà nell'isolarli su terreni di coltura liquidi oppure solidi. Altri inconvenienti non di poco conto a livello di produzione su larga scala possono essere individuati nella velocità di crescita delle biomasse e nella necessità di provvedere al loro nutrimento utilizzando dei terreni di coltura a volte anche molto complessi e particolarmente costosi.

2.4. Cenni sull'ingegneria genetica

Negli ultimi trent'anni, grazie ai progressi registrati nel campo dell'ingegneria genetica, è stato possibile isolare dal genoma dei ceppi batterici di interesse le sequenze nucleotidiche necessarie per la sintesi degli enzimi chiave nel processo di produzione dei PHA. La biologia molecolare

ha conosciuto la sua fase di maggiore sviluppo intorno agli anni 70, quando, grazie al lavoro di Paul Berg e del suo team presso l'università di Stanford, sono state messe a punto le prime tecniche sperimentali per poter permettere l'espressione di una determinata sequenza genica all'interno di un sistema di espressione esterno, quale ad esempio il batterio *Escherichia coli*, il più studiato in ambito biotecnologico per la sua semplicità strutturale e la velocità di moltiplicazione [12]. Le tecniche utilizzate per poter produrre una determinata proteina in un organismo ospite sono raggruppate sotto la dicitura "clonaggio"; scendendo nel particolare, l'operazione è suddivisa in diverse tappe intermedie:

1. **Isolamento del gene di interesse;** si parte da una sequenza di codice genetico e poi vengono fatti dei tagli in corrispondenza dei frammenti nucleotidici desiderati. Si sfruttano a tal proposito delle proteine tipiche degli organismi batterici, gli enzimi di restrizione, i quali tagliano il DNA in corrispondenza di punti specifici. La loro funzione primaria è quella di eliminare dal materiale genetico del batterio il DNA esogeno introdotto nel sistema in seguito ad un'infezione virale, ma vengono usati con successo anche per questo scopo. Non è raro, però, usare un tratto di mRNA per poi ottenere la sequenza di origine mediante l'enzima trascrittasi inversa.
2. **Introduzione del gene ricombinante in un vettore;** in questo stadio le possibilità sono diverse e tutte quante prevedono di selezionare un particolare vettore di clonaggio, una sequenza particolare di DNA, naturale o meno, in grado di legarsi al frammento di codice genetico che si vuole tradurre in grandi quantità. I vettori più usati sono i plasmidi, frammenti di DNA circolare, che vengono legati alla sezione di interesse mediante l'enzima DNA ligasi. Il vantaggio di questo sistema è rappresentato dal fatto che il plasmide all'interno di un batterio si replica in maniera autonoma rispetto al suo genoma cromosomiale, non influenzandone la crescita. Altre tecniche prevedono l'utilizzo di batteriofagi, sistemi biologici in grado di parassitare le cellule batteriche selezionate come sistema di espressione. In questo caso il DNA del fago viene modificato, inserendovi la sequenza nucleotidica precedentemente isolata ed in seguito la coltura batterica viene infettata da queste cellule modificate, le quali sfruttano gli organuli degli ospiti per i propri meccanismi di sintesi proteica, tra i quali però vi si troverà anche la molecola ricombinante. In riferimento a *E.coli*, il suo virus naturale è il fago λ , molto utilizzato in biochimica.

3. **Inoculo del vettore nel sistema di espressione;** il vettore viene inserito all'interno delle cellule batteriche selezionate come ospiti. Dal momento che le colonie batteriche non sono quasi mai di una sola specie, insieme al plasmide viene anche introdotto un particolare antibiotico e soltanto i batteri resistenti ad esso saranno in grado di sopravvivere, recando con loro il DNA ricombinante. Essi formeranno delle colonie e si moltiplicheranno, creando molte copie del prodotto di interesse.

4. **Selezione dei microrganismi produttori;** infine è necessario verificare se effettivamente il gene sia stato espresso nel sistema biologico prescelto e questa operazione viene normalmente eseguita mediante la tecnica analitica Southern Blotting, molto utile nel caso in cui si debbano identificare specifiche sequenze nucleotidiche all'interno di miscele complesse. Si procede all'aggiunta nel campione di enzimi di restrizione per isolare il tratto di DNA di interesse ed in seguito la miscela viene sottoposta ad elettroforesi su gel di agarosio o di poliacrilammide per separare i singoli tratti di codice genetico. Successivamente si denaturano gli acidi nucleici presenti e si pone il gel a contatto con un foglio di nitrocellulosa e diversi strati di materiale assorbente: per questioni legate alle forze capillari, la soluzione tende a risalire ed i frammenti di DNA rimangono perfettamente verticali. Il foglio di nitrocellulosa viene trattato con DNA esogeno per eliminare i fenomeni di denaturazione ed infine viene immerso all'interno di una soluzione contenente sostanze in grado di ibridizzare le diverse catene nucleotidiche, identificando così le differenti sequenze e permettendo di verificare se il gene ricombinante sia presente all'interno del campione analizzato.

Sebbene la via metabolica più comune per la sintesi dei PHB preveda di servirsi dell'acetil-CoA in condizioni alterate di crescita, esistono diversi sistemi biologici che mostrano diversi stadi di reazione, a partire da altri intermedi del ciclo di Krebs. Logicamente questo lascia intendere che anche gli enzimi necessari non saranno gli stessi di cui si è parlato in precedenza. Il risultato finale in questo caso può essere un PHB con catene laterali di differente lunghezza rispetto al caso base. Può essere citato come esempio dimostrativo il metabolismo del *Clostridium kluuyveri*, il quale utilizza come primo intermedio reattivo nella produzione di PHB il succinil-CoA, facente anch'esso parte del ciclo dell'acido citrico [13]. L'unità monomerica ottenuta

mediante reazione a partire dall'acetil-CoA (*R.eutropha*) è il 3-idrossibutirrato, mentre se si utilizzasse come reagente primario il succinil-CoA (*C.kluyveri*) si otterrebbe il 4-idrossibutirrato. Le caratteristiche del polimero finale potrebbero anche risultare molto diverse se si cambiasse il monomero di sintesi, ma queste differenze nei cammini anabolici sono molto utili nel caso si volessero ottenere dei copolimeri di maggiore interesse commerciale. Oltre ai risultati promettenti ottenuti mediante il clonaggio dei geni specifici di *R.eutropha* in *E.coli*, sono stati fatti degli interessanti tentativi in relazione alla possibilità di far coesistere nello stesso organismo ospite entrambe le sequenze enzimatiche, in modo da ottenere un particolare tipo di PHB, con entrambe le tipologie di monomero all'interno della propria unità ripetitiva (Fig. 2.5.).

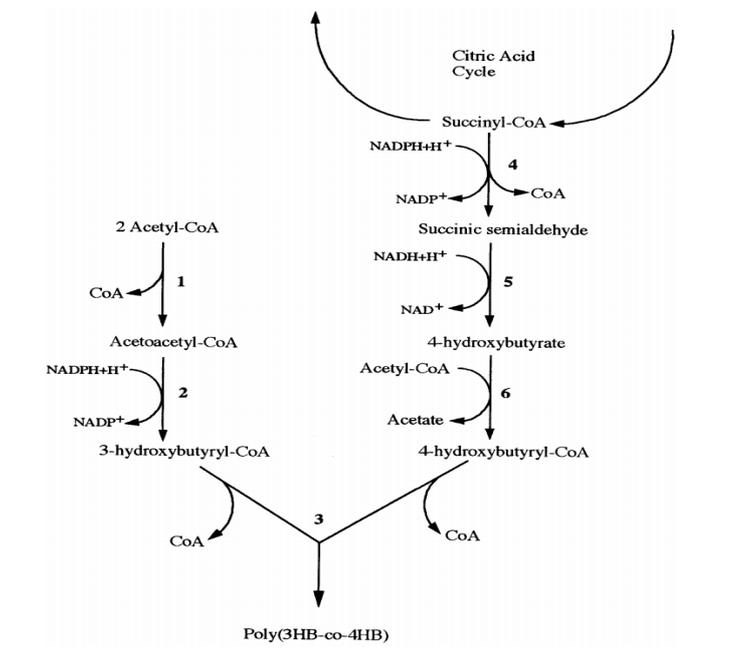


Figura 2.5.: Meccanismo proposto per la sintesi del poli-3-idrossi-4-idrossi-butirrato [13].

Anche in questo caso ci si è affidati a *E.coli* come sistema di espressione ed i plasmidi recanti le sequenze geniche necessarie per la sintesi del copolimero sono stati preparati mediante utilizzo di enzimi di restrizione e DNA ligasi. Le colture di laboratorio sono state realizzate all'interno di cilindri sterili in opportune condizioni di incubazione (48 h a 37 °C) e la successiva raccolta del polimero è stata effettuata mediante centrifugazione della biomassa preventivamente liofilizzata seguita da estrazione con il cloroformio. Infine la caratterizzazione

chimica della struttura del copolimero è stata possibile grazie all'utilizzo congiunto della tecnica gel permeation chromatography (GPC) e della Nuclear Magnetic Resonance (NMR), previa separazione dei granuli di plastica dai residui cellulari mediante un'operazione di filtrazione. I risultati delle due analisi hanno evidenziato come il batterio ricombinante sia stato in grado di sintetizzare il copolimero teorizzato grazie alle vie biosintetiche. Tuttavia è stata notata una netta preponderanza del 3-idrossibutirrato (90% in peso rispetto a tutto il polimero prodotto), facendo presumere che la cascata di reazioni a partire dall'acetil-CoA fosse più rapida rispetto all'altra. In ogni caso è stato dimostrato che è possibile nella pratica riuscire ad ottenere un polimero ad elevato peso molecolare anche con la compresenza di due diverse strade metaboliche [13].

2.5. Meccanismi di degradazione dei PHA

Finora è stato descritto con dovizia di particolari il cammino metabolico che porta alla produzione dei PHA, mostrando anche gli enzimi coinvolti nel processo. Come si ricorderà dall'introduzione, tuttavia, i tentativi di promuovere lo sviluppo di questo particolare settore delle materie plastiche sono motivati principalmente dalla caratteristica peculiare di questi poliesteri: la biodegradabilità. Essa rappresenta uno dei maggiori vantaggi a lungo termine se si riuscissero ad imporre sul mercato questi materiali innovativi, dal momento che ci si ritroverebbe a parlare di un "circolo virtuoso", all'interno del quale sia le materie prime che i prodotti risulterebbero essere praticamente ad impatto ambientale nullo. La capacità dei PHA di essere degradati naturalmente risiede nel fatto che possano essere adoperati come fonte di carbonio da parte di diverse specie microbiche, sia di tipo batterico che fungino. Passando alla biodegradazione dei PHA, che rappresenta di fatto la loro caratteristica distintiva, si può introdurre il discorso riportando che sono state scoperte in natura diverse specie batteriche e non in grado di poter trarre il proprio nutrimento a partire da questi poliesteri grazie alla loro capacità di metabolizzare le catene polimeriche attraverso particolari enzimi. Alcuni dei ceppi che possiedono la capacità di sfruttare le molecole di PHB come substrato nutritivo sono stati identificati all'incirca 40 anni fa [14], anche se nel corso degli anni ne sono stati individuati molti altri che mostrano le stesse caratteristiche. Gli ambienti in cui è possibile riconoscere ed isolare le colonie microbiche in questione sono di vario tipo e, nel corso degli anni, il ciclo evolutivo e la scarsità di sostanze nutritive disponibili hanno indotto il codice genetico di altre

specie di microrganismi a modificarsi in modo da accogliere il PHA come fonte di carbonio primaria, necessaria alla sopravvivenza. Sono stati effettuati diversi studi a riguardo ed è degna di menzione una particolare procedura di identificazione di specie biodegradanti previo isolamento delle stesse da alcuni campioni di suolo proveniente dalle foreste della Siberia [14]. Lo scopo principale della sperimentazione è stato quello di riuscire a comprendere quali fossero le specie microbiche deputate alla degradazione di PHB e PHBV tra quelle presenti all'interno della fauna microbiologica tipica delle zone dove crescono il larice siberiano (*Larix sibirica*) e la betulla piangente (*Betula pendula*) [14]. Sono state preparate delle reti sulle quali sono stati depositi i campioni di PHB e PHBV ed in seguito sono state interrate in prossimità delle radici di due alberi appartenenti alle specie sopracitate. Al fine di avere un buon riscontro dai dati ottenuti, si è scelto di mantenere i campioni sotto terra per due stagioni all'anno in due annate differenti; questa scelta è stata fatta in modo da poter valutare con più precisione l'influenza di parametri quali temperatura e umidità sullo sviluppo di biomassa. Come era lecito attendersi, il tasso di crescita microbica ha mostrato delle differenze dovute alle condizioni climatiche ed ambientali, variabili con le stagioni e con il tipo di terreno analizzato ed è possibile riscontrare ciò osservando la Tabella 3.

Tabella 3: Prospetto dei risultati dell'analisi sulla popolazione microbica totale sui campioni di suolo prelevati in diversi archi temporali [14].

Soil sample	Total microbial number, CFU in 1 g of soil	
	2007	2010
<i>L. sibirica</i>		
Root zone at the moment of PHA placement	$(1.47 \pm 0.08) \times 10^9$	$(3.16 \pm 0.24) \times 10^6$
Root zone at the end of the season	$(5.11 \pm 0.42) \times 10^9$	$(5.28 \pm 1.76) \times 10^7$
PHA surfaces	$(1.60 \pm 0.04) \times 10^{11}$	$(1.35 \pm 0.11) \times 10^8$
<i>B. pendula</i>		
Root zone at the moment of PHA placement	$(1.33 \pm 0.47) \times 10^8$	$(2.67 \pm 0.16) \times 10^5$
Root zone at the end of the season	$(2.21 \pm 0.24) \times 10^9$	$(6.77 \pm 4.51) \times 10^7$
PHA surfaces	$(1.29 \pm 0.08) \times 10^9$	$(1.96 \pm 0.05) \times 10^8$

Trascorso il tempo necessario, i campioni sono stati recuperati e purificati per via enzimatica e sono state effettuate delle analisi di laboratorio per constatare i valori dei parametri cruciali per lo sviluppo microbico e per le reazioni metaboliche [14]. Al tempo stesso è stato possibile censire la fauna microbiologica mediante tecniche standard per i batteri e grazie alle

caratteristiche morfologiche per i funghi. Una volta riconosciuti tutti i ceppi presenti nei campioni di suolo, si è provveduto a verificare quali fossero i principali utilizzatori di PHB e PHBV come substrato nutritivo ponendo PHA in polvere nelle capsule contenenti i microbi. I risultati dei test effettuati hanno mostrato come circa un quarto della popolazione microbica del suolo presso il larice fosse composto da *Alcaligenes*, assunto a specie dominante per quei campioni, mentre hanno evidenziato una maggiore varietà di microbi nella zona della betulla, con prevalenza di *Pimelobacter*, *Actinomyces*, e *Micrococcus* [14]. Per quanto riguarda l'analisi della popolazione fungina, si è riscontrata la presenza preponderante delle specie *Verticillium* e *Penicillium* al di sotto del larice, mentre per la betulla si sono segnalati specificatamente *Beltrania* ed ancora *Penicillium* [14]. I risultati ottenuti hanno dimostrato come la quantità in peso di PHB fosse diminuita in percentuale maggiore nei campioni presi dal terreno del larice, in quanto più umido e più ricco di microrganismi. L'analisi dei campioni di DNA raccolto da queste specie microbiche hanno evidenziato la presenza dei geni che codificano per un particolare enzima, PHA-depolimerasi, il quale riesce a catalizzare la reazione inversa dell'ultimo stadio di formazione del PHB, degradando così la molecola [14]. Le condizioni necessarie alla piena degradazione di una matrice polimerica di PHB devono tenere conto, come si è visto, anche della possibilità di crescita dei microbi che si occupano della digestione, la quale può avvenire sia in condizioni aerobiche, che anareobiche. Nel primo caso le reazioni di degradazione porteranno alla generazione di anidride carbonica ed acqua, risultanti dai fenomeni di respirazione cellulare, mentre nell'altro scenario si noterà la produzione di metano in sostituzione dell'acqua. Affinché le reazioni di degradazione avvengano con la massima efficienza, è necessario che vengano mantenuti precisi valori di umidità, pH e temperatura per non compromettere la biomassa. In maniera del tutto analoga a quanto è già stato visto a proposito della produzione di PHB, è possibile utilizzare le nozioni del clonaggio dei geni in altri sistemi di espressione per poter modificare dei particolari ceppi microbici in modo da avere a disposizione nuove cellule in grado di eseguire la digestione del poliestere e per riuscire a produrre allo stesso tempo gli enzimi chiave del processo di degradazione, utilizzabili per lo stesso scopo, ma senza dover ricorrere ai microbi. Riprendendo in parte il discorso sull'ingegneria genetica, circa venti anni fa è stato possibile identificare all'interno delle cellule di *Rhizobium meliloti* i geni recanti le informazioni necessarie alla sintesi degli enzimi in grado di degradare il PHB ed è stato fatto un tentativo per modificare *E.coli* in modo tale da sintetizzare queste proteine specifiche [15]. Per poter ricavare il poliestere con il quale effettuare le prove di digestione è stata allestita una coltura batterica di *Paracoccus denitrificans* su un substrato di etanolo ed in condizioni di carenza di fonte di carbonio, in modo da stimolare

l'accumulo intracellulare di PHB [15]. Allo stesso tempo è stata predisposta in laboratorio una colonia di *E.coli* come sistema di espressione dei geni isolati in *R. meliloti* ed una successiva analisi mediante SDS-PAGE ha mostrato che tra le proteine sintetizzate dal batterio ricombinante fosse presente una macromolecola di dimensioni paragonabili al complesso di PHA-depolimerasi [15]. Per dimostrare l'efficacia degli enzimi ricombinanti nel processo di degradazione dei poliesteri ottenuti dalla coltura batterica si è miscelato l'estratto cellulare di *E.coli* con il PHB recuperato meccanicamente da *P.denitrificans* (i metodi di recupero dei PHA dai microrganismi saranno introdotti in seguito) ed è stata effettuata un'analisi sulla torbidità della soluzione in funzione del tempo e della concentrazione dei prodotti di reazione [15]. Sono stati infine identificati come composti risultanti da questo processo di degradazione degli esteri ed i monomeri di 3HB, prova che la degradazione del poliestere è effettivamente avvenuta e si è registrato, come ci si poteva attendere, una diminuzione della torbidità della soluzione, dal momento che gradualmente si è passati da macromolecole a composti a minor peso (Fig. 2.6.).

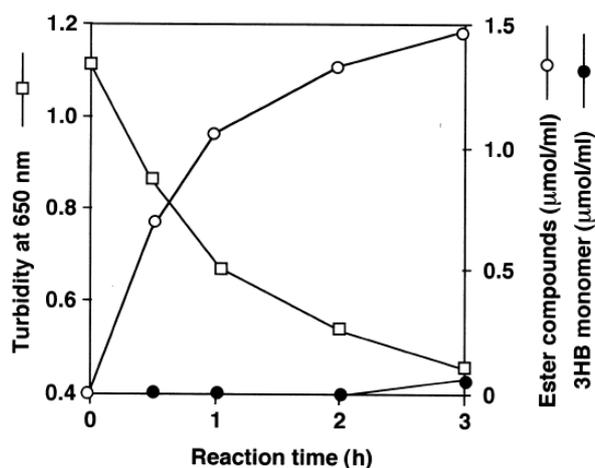


Figura. 2.6.: Andamento della torbidità della soluzione di prova in funzione del tempo. Si notino le curve che mostrano la graduale formazione dei prodotti di reazione [15].

2.6. Allestimento delle colture batteriche

Per poter effettuare gli esperimenti in laboratorio, ovviamente è necessario poter disporre di concentrazioni precise di microrganismi ed affinché questo obiettivo venga raggiunto occorre avere colture batteriche ben bilanciate ed efficienti. La sfida è rappresentata sicuramente dal dover far crescere la specie in questione in tempi relativamente rapidi, mantenendola al contempo capace di replicarsi in un ambiente favorevole, grazie all'apporto di un substrato nutritivo appositamente scelto e, possibilmente, abbastanza economico. Essenziali per una corretta crescita delle cellule sono sia i fattori ambientali che quelli nutrizionali e questi ultimi possono essere suddivisi in macronutrienti e micronutrienti, in ragione delle differenti quantità di substrato necessarie per lo sviluppo biologico. I macronutrienti rappresentano una classe di sostanze chimiche assolutamente necessarie affinché le cellule abbiano tutto il necessario per poter sintetizzare le molecole fondamentali attraverso il metabolismo; principalmente si sta parlando di elementi quali il carbonio, l'azoto, il fosforo ed il potassio. Tuttavia non si possono fare delle eccessive generalizzazioni, dal momento che non tutte le specie biologiche hanno bisogno delle stesse sostanze nelle stesse dosi, ma va sottolineato come il substrato carbonioso, in forme diverse, sia comunque il punto di partenza per le reazioni metaboliche di interesse biologico di tutte le specie presenti sul pianeta. Facendo riferimento ai micronutrienti, si sta parlando di una classe di molecole o elementi che aiutano la crescita dei microrganismi, pur essendo necessari soltanto in piccole quantità. Possiamo introdurre in questo gruppo le vitamine, gli amminoacidi non essenziali, i sali minerali ed alcuni metalli quali il manganese ed il nichel, che fungono da attivatori per alcuni enzimi. Perché la coltura di un particolare microbo sia efficace, occorre individuare quali siano le sostanze nutritive più idonee per il suo sviluppo e così, grazie all'evidenza empirica, si è in grado di formulare la composizione del terreno ove allestire la coltura batterica. In base alle sostanze presenti, un substrato colturale può essere di vario tipo, ma per le applicazioni biotecnologiche solitamente si tende a desiderare la prevalenza del ceppo batterico di interesse rispetto a tutte le altre specie presenti all'interno della coltura. Per fare questo si prediligono terreni discriminativi, dove la composizione è modulata in modo tale da promuovere la crescita e la formazione di colonie esclusivamente per la specie voluta, rallentando contestualmente lo sviluppo per tutte le altre forme di vita eventualmente presenti all'interno della coltura. Come è facile intuire, è estremamente importante associare ad un corretto apporto di sostanze nutritive un ambiente di crescita favorevole ed anche in questo caso ci sono dei parametri essenziali da regolare con estrema

precisione per raggiungere gli obiettivi desiderati. Nel corso degli anni sono state messe a punto delle procedure sperimentali volte a migliorare i terreni di coltura grazie all'individuazione di parametri chiave, come ad esempio la metodologia Plackett-Burmann. Questa, come altre tecniche comunemente utilizzate in questo ambito, è un esempio di Design of Experiment (DOE), ovvero una strategia atta ad individuare le interazioni più costruttive tra i parametri modificabili nell'esperimento per raggiungere il miglior risultato possibile. Queste metodiche, pur differenziandosi tra loro nella struttura, sono tutte basate sulla statistica ed hanno come comune obiettivo quello di cercare di diminuire significativamente il numero di prove da effettuare, con notevole risparmio di risorse e di tempo. In generale si cerca di identificare un gruppo di parametri che sicuramente influenzano la risposta al loro modificarsi, come ad esempio la pressione o la temperatura; in seguito si identificano i livelli entro cui far variare questi fattori e poi si passa al calcolo del numero di esperimenti da organizzare con queste combinazioni di dati. Successivamente il ricercatore utilizza le tecniche di DOE più opportune per diminuire il numero complessivo di prove di laboratorio, ottimizzando l'intero procedimento. Sfruttando il calcolo combinatorio, per valutare l'effetto finale di n parametri con 2 livelli ciascuno (convenzionalmente "ALTO" e "BASSO" livello), si dovranno organizzare in totale 2^n esperimenti, ma, utilizzando la metodica di Plackett-Burman, è possibile selezionare soltanto $n+1$ prove da effettuare, avendo identificato le interazioni tra parametri più produttive [16]. I fattori ambientali sono molto importanti, perché non tutte le specie reagiscono nello stesso modo se poste in uno stesso ambiente; per esempio una microalga, in quanto fotoautotrofa, necessiterà di un ambiente luminoso per poter effettuare la reazione della fotosintesi clorofilliana, mentre un batterio anaerobico quale per esempio il *Lactobacillus bulgaricus* richiederà un ambiente privo di ossigeno, dal momento che potrebbe nuocere al suo sviluppo. Altri importanti sono fattori quali il pH e la temperatura, perché per entrambi questi parametri esistono in letteratura degli intervalli ottimali entro cui mantenere una determinata specie per favorirne la crescita e lo sviluppo. In laboratorio come a livello industriale, la tipologia di coltura ed il recipiente all'interno cui allestirla vengono scelte sulla base di alcune considerazioni, come ad esempio le caratteristiche metaboliche della specie da far crescere, il tipo di terreno utilizzato, la scala del processo. Solitamente per prove sperimentali di piccola entità si prediligono contenitori dai volumi piuttosto contenuti, di cui possono essere presi come modello le beute Erlenmeyer e le bottiglie di Roux. Passando a volumi maggiori, si ricorre principalmente a soluzioni rappresentate dai bioreattori e dai fermentatori, i quali possono avere anche molte altre caratteristiche aggiuntive, come ad esempio la possibilità o meno di montare degli agitatori meccanici per favorire l'aerazione della coltura, se richiesta. La relazione

matematica principalmente utilizzata per comprendere lo sviluppo di una biomassa e la sua crescita è l'equazione di Monod, teorizzata dall'omonimo chimico francese negli anni '60 del secolo scorso. Essa si dimostra particolarmente utile per definire in maniera efficace la velocità di crescita di un determinato microrganismo in funzione della concentrazione del substrato necessario. Per le considerazioni sullo sviluppo microbico, solitamente viene costruita la curva di crescita per il microrganismo in esame; il grafico in questione è un potente strumento per individuare le differenti fasi biologiche della biomassa. Infatti la curva rappresenta la variazione della velocità di crescita del batterio in funzione del consumo della sostanza utilizzata come substrato ed è possibile individuare differenti andamenti nel parametro, correlabili alle diverse fasi evolutive del sistema biologico. Si parte da una fase di adattamento del microbo all'ambiente di coltura per poi registrare un considerevole aumento della velocità di crescita dovuto all'attivazione dei principali processi metabolici. In seguito si nota chiaramente un rallentamento nello sviluppo, che culmina in un plateau, il quale indica che il materiale nutritivo viene principalmente utilizzato per il mantenimento delle condizioni di crescita raggiunte in precedenza. Il plateau che è stato nominato in precedenza è da riferirsi alla fase di crescita stazionaria. L'ultima sezione del grafico mostra come, ad un certo punto dello sviluppo, nonostante l'apporto del nutritivo, il microrganismo vada inevitabilmente incontro a fenomeni di invecchiamento e degradazione cellulare, arrivando infine alla morte (Fig. 2.7).

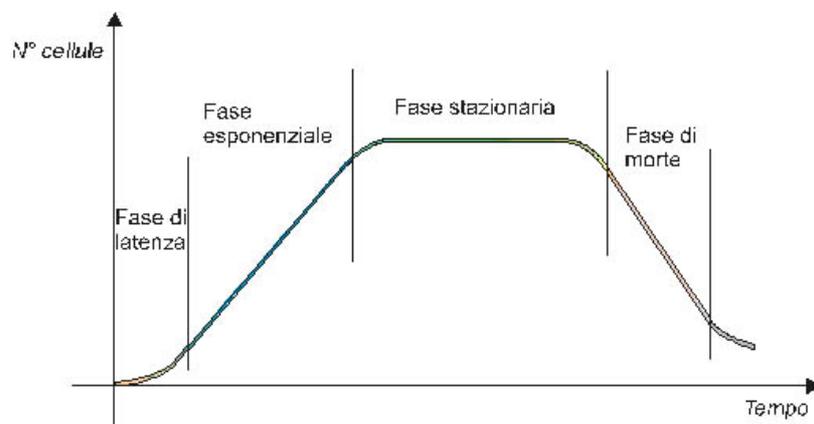


Figura. 2.7.: *Tipico esempio di curva di crescita batterica, con le diverse fasi in evidenza* [17].

Per quanto riguarda lo stato fisico dei substrati, le possibilità tecniche prevedono di scegliere tra terreni liquidi o solidi; nel caso di microrganismi di natura batterica e, in alcuni casi, fungina,

l'isolamento delle forme di vita microbiche su terreni solidi addizionati di agar rappresenta una buona soluzione per avere delle buone crescite delle colonie. I metodi di semina su solido possono essere di diversa natura e la scelta di una tecnica in particolare dipende dalla natura del microorganismo e dall'eventuale prodotto da recuperare in seguito alla biosintesi. Tuttavia esistono alcune specie organiche, come ad esempio le microalghe, per le quali la via preferibile per l'isolamento e la crescita prevede l'utilizzo di un substrato di natura liquida. La scelta di quest'ultima tipologia di semina risulta appropriata anche nel caso in cui le cellule abbiano un consistente bisogno di acqua allo stato liquido. Tornando ai fermentatori da laboratorio, ve ne sono di differenti tipologie e sono le esigenze del processo a dettarne la scelta. I parametri sensibili per ottimizzare la crescita della biomassa all'interno del reattore possono essere controllati dall'esterno mediante tecniche differenti e la severità del sistema di monitoraggio varierà significativamente sulla base delle caratteristiche richieste al processo e della destinazione d'uso del prodotto bioderivato; infatti un antibiotico richiederà una sterilità maggiore ed un controllo sull'eventuale degradazione termica migliore rispetto ad un additivo alimentare quale l'acido citrico, anch'esso ormai ottenuto in larga parte attraverso processi fermentativi. Parlando poi di dimensioni, esistono tre diverse taglie per i fermentatori:

✚ **Scala di laboratorio:** Appartengono alla categoria i fermentatori di volume fino a 10 l.

✚ **Scala pilota:** i volumi di questi reattori possono arrivare fino a 500 l.

✚ **Scala industriale:** questa classe comprende apparecchiature di volume superiore a 500 l.

Non meno importante, infine, risulta la scelta della modalità operativa da scegliere, in quanto è possibile gestire la crescita della biomassa in forma batch, continua oppure fed-batch. Generalmente impostare un reattore in modalità batch è consigliabile quando si vuole ottenere una buona quantità di biomassa in tempi relativamente brevi [18]. In questo caso il fermentatore viene caricato preventivamente con tutto il substrato necessario alla proliferazione della biomassa, la quale cresce consumando tutto ciò che le è necessario giungendo fino alla fase di crescita stazionaria, quando avviene il recupero del materiale biologico [18]. Lo svantaggio principale di questo sistema consiste nell'impossibilità di regolare la velocità di crescita della biomassa agendo sull'alimentazione, dal momento che non abbiamo correnti in ingresso di nessun tipo [18]. Per ovviare a questo problema intrinseco del sistema batch, è stata sviluppata la coltura in continuo, la quale prevede il continuo prelievo e la continua somministrazione delle sostanze nutritive, mentre la massa microbica si trova sempre all'interno del reattore [18]. La struttura stessa dell'apparecchio permette di mantenere nel tempo le condizioni di crescita stazionarie, dove avviene solitamente la sintesi di molte sostanze utili. Avviare una coltura in

continuo prevede comunque una prima fase di crescita in condizioni batch, per ottenere una buona quantità di biomassa di partenza, per poi passare a regolare l'ingresso e l'uscita dei nutrienti [18]. Questa modalità è particolarmente indicata in situazioni in cui è necessario mantenere un ritmo di produzione costante nel medio-lungo periodo, ma è anche possibile che cicli produttivi piuttosto lunghi possano portare a contaminazioni ed accumulo di mutazioni all'interno delle cellule, dovuti alle continue generazioni [18]. (Fig. 2.8.).



Figura. 2.8.: *Nella fotografia di sinistra un reattore di laboratorio in modalità batch [19], in quella di destra uno pilota in modalità continua [20].*

Infine è possibile far lavorare i fermentatori biologici in fed-batch: in questo caso si ha una corrente entrante, ma nessuna uscente. La coltura viene avviata come se fosse una normale modalità batch, poi, una volta che la biomassa ha raggiunto la zona di crescita esponenziale, viene avviata l'alimentazione del substrato, per regolare l'aumento della massa biologica in proporzione ai nutrienti entranti nel processo [18]. Questa tipologia di fermentazione non viene applicata in circostanze che richiedono una produttività elevata, sebbene abbia come vantaggio quello di prevenire contaminazioni nella biomassa ed inibizioni da accumulo di metaboliti tossici [18].

3. Processi di recupero della bioplastica

Dopo la fase iniziale di coltura della biomassa e la successiva fase di produzione della sostanza obiettivo, occorre effettuare il recupero del prodotto dal terreno di coltura residuo e, eventualmente, anche dall'interno delle cellule stesse. Complessivamente, le operazioni di recupero e purificazione del prodotto ottenuto per via fermentativa sono racchiuse nella categoria dei cosiddetti *downstream processes* (DSP), la cui progettazione è molto importante e delicata. Difatti non esistono soluzioni tecniche prestabilite applicabili direttamente ai processi da trattare, perché ciascuna coltura batterica presenta caratteristiche peculiari di cui tenere conto durante la fase di sviluppo dei DSP. Le tecniche di recupero solitamente vengono scelte in base alle caratteristiche fisiche del medium di coltura, alla natura del prodotto da estrarre, alle dimensioni delle cellule microbiche, alla scala del sistema. Un punto molto importante nei DSP è la separazione della biomassa da quello che resta del brodo di coltura, dal momento che questa operazione ha una duplice utilità; i prodotti derivati da fermentazioni possono essere ottenuti all'interno delle cellule microbiche oppure all'esterno di esse ed effettuare la separazione della biomassa dal medium consente in un caso di concentrare il materiale biologico da trattare successivamente e nell'altro di poter lavorare direttamente sul brodo per procedere con l'estrazione delle molecole di interesse. Per poter raggiungere questo traguardo preliminare sono disponibili molte tecniche, quali ad esempio la centrifugazione, la sedimentazione del materiale solido oppure la filtrazione [21]. La scelta di una metodica rispetto ad un'altra non può prescindere dalle caratteristiche della biomassa da trattare, dalle risorse disponibili e dai costi di processo. Nel nostro caso, essendo il PHB un poliestere prodotto ed accumulato all'interno della parete cellulare, per poterne effettuare l'estrazione è necessario separare le cellule dal terreno e portare le stesse in condizioni tali da indurre la rottura delle cellule. Una volta raggiunto questo scopo, è necessario recuperare il biopolimero dal resto delle sostanze liberatesi in seguito alla disgregazione delle cellule. La sfida maggiore per questa tipologia di processi fermentativi è sicuramente rappresentata dalla scelta del metodo da utilizzare per provocare la lisi cellulare. Le considerazioni da fare per poter prendere una decisione precisa in merito non sono banali, perché sono molti gli aspetti da valutare; la strategia deve essere ottimizzata tenendo conto delle caratteristiche fisiche del ceppo batterico a disposizione, ma anche della tipologia della plastica e della sua quantità in rapporto al peso della biomassa [21]. Tuttavia sono anche da non sottovalutare fattori quali l'impatto ambientale

del procedimento prescelto e, naturalmente, la purezza del prodotto finale ed il suo tasso di recupero, parametri fondamentali per poter dare una precisa stima economica della fattibilità del processo su scala industriale [21]. Portare a rottura la parete cellulare dei batteri è complicato, perché c'è un'elevata pressione osmotica all'interno della cellula, ma bisogna anche scegliere una tecnica che non vada ad inficiare sulla natura del prodotto da recuperare. È interessante notare come ci siano delle procedure volte a favorire il rilascio di PHB in modo non traumatico, sebbene esse siano ancora in fase di studio; si è arrivati a modificare *E.coli* in modo da fornirgli i geni necessari alla sintesi di particolari enzimi di digestione, in grado di indebolire dall'interno della parete cellulare, favorendo il rilascio di PHB senza imporre ulteriori stress al sistema [22]. Ci sono diversi metodi di lisi efficaci utilizzati in laboratorio, ma hanno l'inconveniente che non tutti sono replicabili con successo su scala industriale. È possibile effettuare una sommaria classificazione delle tecniche di lisi in base alla natura del procedimento stesso:

✚ **Metodi Fisici e Meccanici:** Come suggerisce il nome, questa categoria di tecniche prevede di utilizzare lo stress indotto esternamente tramite apparati meccanici per raggiungere l'obiettivo. A seconda del tipo di macchinario, il risultato verrà raggiunto grazie a fenomeni fisici differenti. La disgregazione cellulare può avvenire mediante applicazione di ultrasuoni attraverso una sonda posta all'interno della sospensione cellulare oppure grazie ad omogeneizzatori e mulini a biglie. Tuttavia un'eccessiva esposizione della massa microbica a severe condizioni fisiche può portare a degradazioni irreversibili del prodotto che si intende recuperare.

✚ **Metodi Biologici:** in questo caso non si ricorre a soluzioni meccaniche, ma si fa uso di sostanze in grado di degradare la parete cellulare in maniera selettiva, sfruttando reazioni altamente selettive, come per esempio l'accoppiamento enzima-substrato. Infatti rientrano in questo gruppo le tecniche che prevedono l'impiego di lisozima, o altri enzimi degradanti, e antibiotici, i quali impediscono alle cellule microbiche di sintetizzare correttamente la propria parete, rendendone dunque più semplice la lisi successiva.

✚ **Metodi chimici:** quest'ultima classe di metodologie è basata sull'aggiunta di particolari molecole alla biomassa da trattare, le quali sono in grado di agire come agenti modificanti della consistenza e della permeabilità della membrana cellulare. In questo caso vengono adoperati toluene ed altri solventi organici, che solubilizzano i fosfolipidi all'interno della parete con conseguente dissoluzione della stessa, ma anche altre sostanze che agiscono diversamente. Solitamente si utilizzano tensioattivi, i quali si legano ai lipidi presenti nella parete cellulare, ma può venire impiegata anche l'acqua distillata, dal momento che, essendo povera di soluti, è in grado di innescare un gradiente di concentrazione osmotico se le cellule sono poste a contatto con essa: l'acqua contenuta all'interno dei batteri tende a passare all'esterno della cellula e questa violenta fuoriuscita causa la rottura delle cellule microbiche (shock osmotico). Per questo motivo, in medicina, le soluzioni somministrabili per via parenterale devono essere isotoniche.

Come primo passo, nel caso di prodotti intracellulari come il PHA, le cellule microbiche vanno incontro a diverse tipologie di pretrattamenti, volti ad indebolire la parete ed a rendere più semplici le operazioni successive [22]. Bisogna specificare che questi processi non sono alternativi tra loro, ma è necessario selezionare il metodo che meglio si adatta al prodotto da recuperare ed alla natura della cellula da processare. Per esempio si può innalzare la temperatura della biomassa in soluzione per indurre delle modificazioni a carico delle componenti della parete cellulare, ma questa soluzione potrebbe portare in alcuni casi alla degradazione della sostanza di interesse oppure alla sua denaturazione, entrambe eventualità indesiderate [22]. Oltre a questo tipo di strategia, è possibile trattare la soluzione batterica con composti alcalini, che potrebbero anch'essi danneggiare il prodotto, oppure si può sottoporre la biomassa ad un raffreddamento tale da indurre la formazione di ghiaccio all'interno della cellula: questo favorisce la distruzione meccanica della cellula, ma è un processo difficilmente replicabile su scala industriale a causa dei costi molto elevati [22]. Una volta che il materiale cellulare è stato disgregato, si può passare alla fase di recupero vera e propria, anch'essa resa possibile da numerose tecniche.

3.1. Estrazione con solvente

Le prime metodiche prevedevano di estrarre con apposito solvente il prodotto da recuperare a partire dal residuo di frammentazione delle cellule. Operativamente parlando, ci si pone l'obiettivo di separare il biopolimero dal resto del lisato, sfruttando l'affinità tra la molecola di interesse, la quale, come è stato detto in precedenza, risulta chimicamente un poliestere, ed un solvente non polare. Una volta che il PHB si sia completamente solubilizzato all'interno della sostanza prescelta, è possibile allontanare il materiale indesiderato in maniera abbastanza semplice, dal momento che si denota una netta separazione tra le fasi coinvolte in ragione delle differenti solubilità delle specie chimiche. Il recupero finale della plastica viene di norma effettuato modificandone l'equilibrio in soluzione mediante l'aggiunta di un opportuno antisolvente, il quale ha una natura chimica compatibile con il solvente estrattivo, ma non con il polimero. E' possibile anche causare la precipitazione dei granuli di PHB mediante modificazioni fisiche, ad esempio provocando l'evaporazione del solvente estrattivo [23]. Lemoigne stesso, dopo aver scoperto i processi di sintesi del PHB, ha adoperato questa tecnica per isolare i poliesteri dal residuo delle cellule frammentate, trattando la soluzione con etanolo caldo [22].

3.1.1. Caratteristiche dei solventi utilizzati

Sulla base di quanto detto in precedenza, le sostanze più idonee ad effettuare questa operazione risultano essere solventi organici quali il diclorometano o l'acetonitrile [22]. In letteratura è possibile reperire informazioni su un gran numero di esperimenti volti a dimostrare l'efficacia dei vari solventi proposti per l'estrazione della bioplastica. Sono infatti stati testati procedimenti estrattivi a base di solventi clorurati, dioli ed esteri su PHB prodotto da *Bacillus megaterium* e *Rhodospirillum rubrum* [23]. I risultati di queste sperimentazioni hanno evidenziato che la purezza della plastica recuperata sia vicina al 90% con ciascuna delle sostanze in esame [23] e che l'efficacia di un solvente rispetto ad un altro sia influenzata dalla temperatura di esposizione, parametro significativamente legato alla solubilità [23]. È bene sottolineare come l'utilizzo di questa metodica di recupero sia particolarmente indicato dal punto di vista commerciale dal momento che non sussistono particolari modifiche nella struttura della plastica estratta, contrariamente a quanto accade utilizzando l'ipoclorito di sodio, agente chimico in grado di digerire selettivamente ciò che non interessa recuperare. L'impiego di questa sostanza

è stato oggetto di studio, dal momento che, a fronte di buoni valori di recupero e purezza della plastica estratta, è stata notata una parziale indesiderata depolimerizzazione nelle catene di PHB [23]. Tra i solventi clorurati, che risultano tra i più efficaci, sicuramente quello che gode di maggiore considerazione dal punto di vista delle prestazioni è il cloroformio, studiato anche per processi di recupero su scala industriale. Oltre ai costi delle operazioni di riciclo delle sostanze estraenti, che pure non sono trascurabili per impianti ad elevata produzione, non bisogna comunque sottovalutare il fatto che alcuni dei composti utilizzati in queste operazioni siano potenzialmente tossici sia per l'uomo che per l'ambiente, tenendo anche presente che questo metodo di recupero non si addice ad enzimi e proteine, in quanto i gruppi funzionali potrebbero venire danneggiati dal solvente stesso. Emblematico è in tal senso il caso del cloroformio, già citato per le sue caratteristiche estrattive, ma identificato come sospetto cancerogeno e notevole agente inquinante. Per ovviare a questi inconvenienti, ci si sta interrogando sull'eventuale utilizzo per questo tipo di applicazione di solventi privi di sostanze nocive. In tale ottica può essere riportato uno studio che è stato eseguito sul poliestere ricavato da *Cupriavidus necator*, recuperato mediante una soluzione di acqua ed etanolo: i risultati hanno mostrato che la resa del procedimento è paragonabile a quella dell'estrazione tradizionale con cloroformio, che la purezza della bioplastica è leggermente peggiore, senza che fossero rilevate modificazioni nella struttura del polimero [24]. Ulteriori passi in questa direzione sono stati fatti proponendo come solvente anche l'acetone; In uno studio si è utilizzata questa sostanza nelle operazioni di recupero di PHA da cellule di *Pseudomonas putida*, previo trattamento delle stesse con metanolo o idrossido di sodio, al fine di allontanare la maggior quantità possibile di materiale estraneo [25]. I dati ottenuti hanno dimostrato come l'utilizzo di metanolo sia più efficace della soda caustica al fine di aumentare il recupero della plastica [23], a fronte, in entrambi i casi studiati, di una diminuzione del PHB recuperabile [23]. Per quanto riguarda l'efficacia dell'acetone, i risultati hanno illustrato come questa metodica trovi maggior successo quando impiegata su cellule con una elevata percentuale di plastica sul loro peso secco, visti i buoni valori di recupero e purezza [23]. In altra sede è stato effettuato un confronto tra la tradizionale estrazione con cloroformio ed una innovativa procedura ad alta temperatura e pressione con acetone; è stato realizzato un contenitore dove è stata posta la biomassa da trattare e l'acetone alle condizioni di 120 °C e 7 bar di pressione. In queste condizioni avviene la completa solubilizzazione del PHB nel solvente, dopo un tempo di esposizione di circa 20 minuti [26]. In seguito è stata effettuata una filtrazione per allontanare tutte le sostanze estranee e la soluzione di interesse è stata raccolta in un altro recipiente. A questo punto è stata causata la precipitazione del polimero mediante raffreddamento con ghiaccio e la bioplastica è stata

separata dalla frazione liquida mediante centrifugazione [26]. Il solvente esausto è stato infine recuperato mediante un'operazione di distillazione [26]. L'aspetto rilevante in questo caso non è tanto legato ai tassi di recupero o di purezza della plastica in esame, visto che è stato nuovamente dimostrato come l'utilizzo del cloroformio conduca ai migliori risultati, quanto al tempo necessario al completamento delle operazioni di estrazione; infatti la procedura con il cloroformio richiede un tempo di esposizione particolarmente elevato (circa 12 ore), invece il metodo con l'acetone, a parità di temperatura di processo, risulta di gran lunga più veloce [26].

3.1.2. Ruolo dell'antisolvente

La precipitazione dei granuli di plastica nei processi estrattivi sopra elencati viene ottenuta mediante l'evaporazione del solvente oppure mediante un raffreddamento della soluzione, ma in genere questi DSP prevedono l'utilizzo di uno specifico antisolvente. Questo approccio è impiegato frequentemente nei processi produttivi che coinvolgono nanoparticelle [27], per via dei costi contenuti e dell'impiego di strumenti ed apparecchiature relativamente semplici da utilizzare [27]. Dal punto di vista operativo, condurre l'operazione di estrazione di un soluto con un antisolvente vuol dire aggiungere una sostanza alla soluzione in esame al fine di modificarne l'equilibrio di solubilità [27]. Infatti si sceglieranno come antisolventi delle sostanze che presentano buona affinità chimica con il solvente, ma non con il soluto [27]; una volta raggiunte le condizioni di sovrasaturazione, il soluto precipita ed allora è possibile effettuare il recupero dello stesso [27]. La sovrasaturazione influenza delle proprietà importanti delle particelle precipitate, come le dimensioni, la morfologia ed il grado di cristallinità [27]. Come per i solventi di estrazione, anche per questa classe di sostanze sono stati fatti degli esperimenti per poter identificare le specie più adatte al procedimento. I risultati ottenuti hanno suggerito l'etanolo ed il metanolo come le sostanze più efficaci nel causare la precipitazione della bioplastica [21], unitamente ad etere dietilico ed esano, mentre è sicuramente interessante notare come viene indicato anche l'acetone come antisolvente, sebbene in precedenza sia stato testato come solvente estrattivo [26]. È doveroso fare delle precisazioni in merito all'esano; questo idrocarburo viene normalmente usato come antisolvente per il recupero di polidrossialcanoati a corta catena, mentre lo stesso liquido è in grado di portare in soluzione PHA con catene monomeriche a maggiore lunghezza [21]. Questa caratteristica dell'esano trova riscontro in altri ambiti industriali legati al settore alimentare; infatti nella produzione di olio d'oliva in seguito alle operazioni di spremitura del frutto si viene ad ottenere un sottoprodotto

formato principalmente da ciò che resta nei noccioli e delle bucce: la sansa. Dalla sansa è possibile estrarre ulteriormente la frazione lipidica, successivamente lavorata fino a renderla commestibile e, normalmente, questa operazione viene effettuata grazie proprio all'esano, in grado di solubilizzare i trigliceridi da recuperare. Chimicamente i trigliceridi si configurano come poliesteri, dunque risulta ragionevole dedurre che lo stesso solvente può essere impiegato per l'estrazione di PHA. È anche possibile indurre la precipitazione della molecola di interesse mediante aggiunta di polielettroliti, modifiche al pH ed alla temperatura, salting-out con altri composti.

3.2. Tecniche di recupero alternative

La scelta del metodo di recupero dei PHA è guidata in particolar modo da considerazioni di natura economica, dal momento che bisogna tentare di accoppiare un'elevata efficienza di processo con un investimento sostenibile per la costruzione delle apparecchiature. È possibile fare un breve elenco delle tecniche di recupero per il PHA comunemente utilizzate in ambito industriale e di ricerca:

✚ **Mulini a biglie:** Ad oggi, specialmente nel settore dei biofarmaci, il metodo che più di ogni altro viene replicato con successo su scala industriale è rappresentato dall'utilizzo dei mulini a biglie, sperimentati con successo in laboratorio. Il principio di funzionamento è molto semplice, poiché si tratta essenzialmente di caricare la biomassa all'interno di un cilindro riempito di biglie, le quali possono essere di vario materiale e di varie dimensioni a seconda delle condizioni operative che si vogliono ottenere, successivamente posto in rotazione attorno al proprio asse longitudinale. Il movimento rotatorio cui è sottoposto il recipiente genera un rimescolamento delle sfere, che, urtando tra loro e con le pareti, riescono a tritare le cellule precedentemente inserite nel mulino. I fattori essenziali per la buona riuscita dell'operazione sono da ricercarsi nel numero e nella dimensione delle biglie, nella velocità di rotazione imposta, nel design del mulino e nelle caratteristiche fisiche del materiale da tritare [28]. La bontà di questo sistema è stata dimostrata con delle prove sperimentali ad hoc, grazie alle quali si è riusciti ad evidenziare la completa disgregazione delle cellule di *Alcaligenes latus* con delle sfere di 512 micron di diametro ed una velocità di rotazione pari a 52,800 rpm [28].

- ✚ **Omogeneizzazione:** Come soluzione pratica alternativa alla triturazione è stata studiata l'omogeneizzazione ad alta pressione, ovvero una tecnica che causa l'esplosione della biomassa da trattare mediante una violenta espansione dalla camera di alimentazione in un'altra dove la pressione è sensibilmente inferiore. L'obiettivo viene raggiunto solitamente attraverso una valvola appositamente progettata ed è stato provato come, a causa delle ridottissime dimensioni raggiunte dai detriti cellulari durante il procedimento, l'efficienza nel recupero sia inferiore rispetto a quella calcolata per i mulini a biglie, ma si è anche arrivati ad individuare una purezza nel PHA estratto superiore al 95%, in base a prove effettuate su *Alcaligenes latus* [28].

- ✚ **Ultrafiltrazione:** Se le dimensioni delle molecole sono adatte, se il prodotto è espresso esternamente e se la purezza richiesta è elevata, come nel caso dei biofarmaci e degli enzimi, è prassi comune ricorrere all'ultrafiltrazione (UF), ma i moduli possono anche risultare molto costosi.

- ✚ **Estrazione con fluidi supercritici:** Grazie alle caratteristiche di alta selettività verso i PHA e di non tossicità del fluido è anche previsto come metodo estrattivo il trattamento con CO₂ in condizioni supercritiche [22], ma esso richiede ingenti investimenti per poter utilizzare il gas con quelle peculiari qualità fisiche.

- ✚ **Resine a scambio ionico:** Tra le altre tecniche può anche essere considerato l'adsorbimento delle sostanze da recuperare su resine scambiatrici di ioni, un processo poco gravoso dal punto di vista tecnico e che garantisce buoni risultati, in quanto è anche facilmente controllabile e replicabile su scale più grandi, ma va comunque previsto un modo per poter rendere ionizzabile la sostanza da estrarre, perché tutto è basato sullo scambio tra ioni dello stesso segno.

3.3. Tecniche di purificazione

Il passo immediatamente successivo all'estrazione è la purificazione del prodotto per esigenze commerciali e funzionali. Quest'operazione viene effettuata prevalentemente servendosi di tecniche cromatografiche a permeazione di gel, le quali discriminano le sostanze presenti nella corrente da trattare in base alle dimensioni, ma è possibile ricorrere ad altre versioni basate sullo stesso principio, le quali, però, sfruttano le affinità chimiche ed elettriche delle molecole da

purificare con il substrato scelto per riempire i moduli. Generalmente, l'ultimo stadio dei DSP consiste nei trattamenti cui sottoporre i prodotti biotecnologici al fine di ottenere questi ultimi nella forma desiderata. In questo caso, se si parla di sostanze solide, perché sia possibile metterle in commercio, è necessario allontanare la maggior percentuale possibile di umidità e solitamente si utilizzano metodi di cristallizzazione o di essiccazione, purché non si arrivi in condizioni tali da modificare termicamente la sostanza ottenuta.

3.4. Presentazione del metodo di recupero oggetto di studio

Per quanto riguarda gli scopi di questa trattazione, si farà riferimento ad una particolare tecnica di lisi cellulare, che prende il nome di Flash-Explosion (FE). Dal momento che le cellule microbiche mantengono al loro interno una certa percentuale di acqua, il metodo prevede di riscaldare la soluzione in cui giace la biomassa, previa pressurizzazione, fino a raggiungere le condizioni di equilibrio liquido-vapore. In seguito, grazie ad una repentina espansione con una valvola, la pressione si abbatta drasticamente causando una rapida evaporazione dell'acqua delle cellule, in maniera simile ad un flash adiabatico. La subitanea espansione del vapore dall'interno della massa microbica provoca l'esplosione della stessa, riversando nel medium di coltura tutto quello che è contenuto all'interno delle cellule, tra cui anche il PHB da recuperare ed analizzare. La sequenza operativa scelta per il downstream del poliestere prodotto all'interno del progetto CELBICON è la sopracitata Flash-Explosion ed è lo scopo di questa tesi cercare di verificare sperimentalmente l'efficacia della stessa e, eventualmente, proporre delle alternative più efficienti e replicabili su scala industriale. Un'altra strategia possibile per questo progetto potrebbe essere la Gas-Explosion. In questo caso non si andrebbe ad agire su sostanze all'interno delle cellule, ma ci si concentrerebbe esclusivamente sul gas che circonda la biomassa. Infatti l'idea è quella di provocare la rottura delle cellule modificando la pressione circostante e permettendo dunque che il gas penetri all'interno della biomassa; una volta raggiunto un tempo ragionevole per poter permettere ad una adeguata quantità di gas di passare all'interno delle cellule, si procede alla laminazione attraverso la valvola e, in risposta al ritorno della pressione alle condizioni ambiente, si causa la fuoriuscita delle molecole gassose dall'interno della biomassa, causando la rottura delle pareti. È possibile utilizzare molti gas per questa applicazione, come per esempio l'azoto, ma a livello industriale viene applicata maggiormente l'anidride carbonica. L'aspetto interessante di questa strategia di recupero risiede nel fatto che non è necessario raggiungere valori elevati di temperatura, poiché è più

importante il contributo della pressione imposta al sistema. L'inconveniente in questo tipo di approccio è rappresentato dalla necessità di introdurre dell'altro gas nei recipienti dove sono contenuti i batteri, andando ad influenzare i costi finali dell'interno procedimento di recupero. Alternativamente a queste due tecniche, va ricordata la Steam-Explosion, la quale sfrutta gli stessi principi enunciati per la Gas-Explosion, utilizzando tuttavia vapore saturo ad elevate temperatura e pressione. Una volta effettuata la lisi cellulare, il PHB ottenuto in forma di granuli viene separato per sedimentazione in un serbatoio appositamente progettato presso Hysytech s.r.l. e poi successivamente analizzato presso i laboratori del Politecnico di Torino, al fine di ottenere dati sufficienti a stabilire se il DSP scelto sia effettivamente la strada migliore da percorrere per questo progetto e, eventualmente, modificare strategia di recupero. Le tecniche analitiche prescelte sono essenzialmente di due tipologie: una volta a determinare l'efficacia della rottura cellulare in seguito alla procedura e l'altra incentrata sulla determinazione della quantità della plastica raccolta. Si è scelto di stimare la resa di esplosione mediante la determinazione del contenuto proteico nel brodo raccolto dopo la laminazione; la rottura delle cellule inevitabilmente comporta il passaggio in soluzione delle proteine e del materiale intracellulare, totalmente assente nei campioni di partenza. Per quanto riguarda il tasso di recupero di PHB, la strategia analitica è stata impostata sulla misurazione del peso dei granuli di plastica estratti mediante l'utilizzo di un solvente. Per la descrizione dettagliata delle metodiche di laboratorio si faccia riferimento al corrispondente capitolo.

4. Progettazione delle apparecchiature

L'idea di sperimentare la Flash-Explosion come metodo di estrazione del PHA ha reso necessarie la progettazione e la realizzazione di due serbatoi in acciaio inossidabile per applicazioni alimentari. Oltre a ciò si è provveduto al dimensionamento della valvola di laminazione, vera chiave dell'intero processo, in quanto in grado di regolare la severità dell'espansione. Per poter stilare i bilanci di materia necessari si è ricorso alle stime preliminari effettuate nell'ottica di CELBICON, avendo considerato una certa resa in PHA da parte della biomassa ed una successiva concentrazione della stessa mediante filtrazione (Fig. 3.1.). Originariamente il processo di filtrazione mediante un apparecchio FUNDABAC® della Dr. M sarebbe dovuto essere parte integrante del sistema di recupero della biomassa, ma infine si è deciso di non includerlo nello schema e di utilizzare per la progettazione dei serbatoi le informazioni ottenute dalla simulazione dell'operazione di concentrazione.

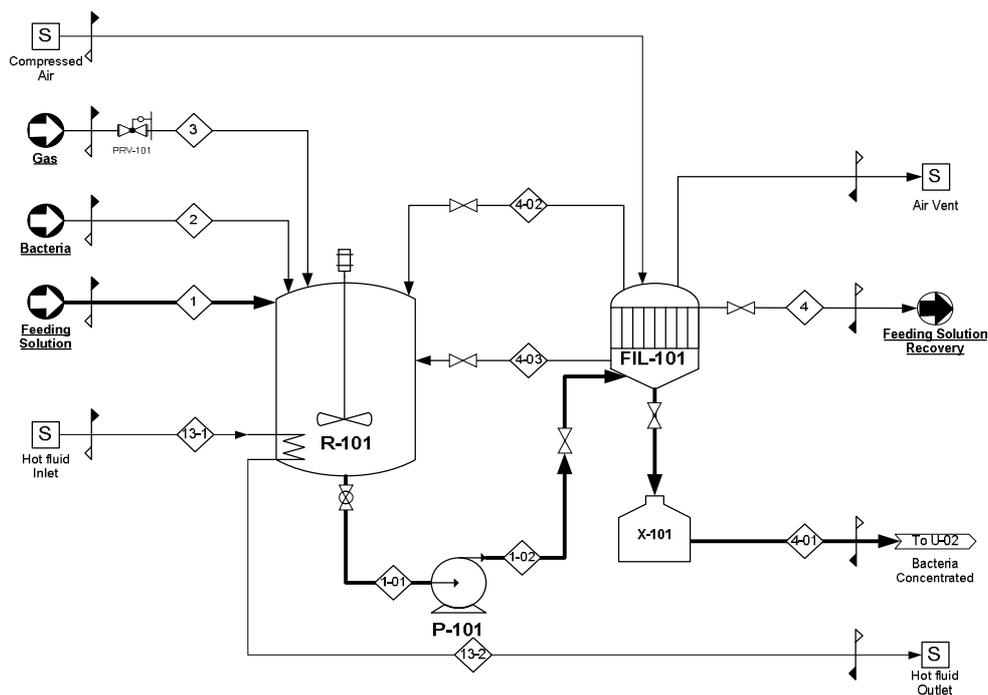


Figura. 4.1.: Schema del processo di filtrazione della biomassa da trattare.

Secondo lo schema riportato, che rappresenta la filtrazione fittizia cui la biomassa è stata sottoposta, la soluzione biologica viene caricata in un apposito serbatoio, per poi essere inviata all'interno di un filtro a candela di tipo FUNDABAC: con il primo passaggio della soluzione da concentrare attraverso la tela posta attorno della candela si viene a creare il cake sulla

superficie esterna dell'elemento filtrante, che contribuisce a migliorare ulteriormente la capacità di filtrazione dell'apparecchiatura. In seguito si impone una leggera pressione all'interno della camera filtrante per fare in modo che la torta non si stacchi dalla candela, pregiudicando l'efficacia dell'operazione. A filtrazione ultimata vi è il recupero della soluzione concentrata mediante un apposito cilindro graduato e si procede allo scarico dello strato superficiale esterno grazie al passaggio di aria compressa all'interno della candela. I valori di portate da processare e le relative frazioni molari sono riassunte nella Tabella 4. Per precisione, occorre dire che la dicitura "NPCM" è l'acronimo di Non Productive Cell Material, vale a dire tutto quello che, all'interno della cellula, non è classificabile come PHA. Si noti come il quantitativo di PHA atteso all'interno delle cellule batteriche sia tale da garantire una produttività giornaliera pari a circa 100 g di bioplastica. Questo dato non è stato verificato sperimentalmente per *il Rhodospirillum rubrum*, ma è indicato dagli intenti del progetto CELBICON come la quantità minima di PHA da produrre con questo sistema e con queste metodiche, al fine di poter provare ad effettuare uno scale-up per la realizzazione eventuale di un impianto pilota.

Tabella 4: Dati preliminari dei bilanci di materia del progetto CELBICON.

	SOLUZIONE IN INGRESSO		SOLUZIONE CONCENTRATA		SOLUZIONE RECUPERATA	
	g/d	%w	g/d	%w	g/d	%w
PHA	112	0,2	112	6,67	0	0
NPCM	447	0,79	447	26,67	0	0
H2O	53088	94,06	1016	60,6	52072	95,08
OTHER	2794	4,95	102	6,07	2692	4,92

Se fosse stata predisposta nella realtà la filtrazione della soluzione come primo passo, allora sarebbe stata sottoposta alla conseguente Flash o Gas Explosion la soluzione batterica concentrata, dal momento che ci sarebbero state maggiori probabilità di recuperare il maggior quantitativo possibile di PHA. Sulla base dei dati riportati sono state effettuate diverse considerazioni al fine di poter svolgere i calcoli di design dei serbatoi; nei ragionamenti successivi si è intesa la soluzione biologica come composta principalmente da acqua, in modo da potersi avvalere dei valori delle sue proprietà fisiche e si è scalato il processo per avere una produzione giornaliera di 1000 g di PHA, mantenendo le stesse percentuali in peso, come illustrato nella Tabella 5.

Tabella 5: Dati di CELBICON scalati per ottenere dal processo 1000 g al giorno di PHA.

SUBSTANCE	[g/d]	%w
PHA	1000,033	6,67
WATER	9085,758	60,60
NPCM	911,5744	6,08
OTHER	3995,635	26,65
TOTAL	14993	100

I calcoli svolti per la progettazione del sistema sono stati basati sulle tecniche di design per i barilotti in cui avviene l'operazione unitaria nota come flash. Le formule che sono riportate nel seguito sono state ricavate da testi specializzati, a cui si rimanda per eventuali approfondimenti. Lo scopo principale dei calcoli di progettazione è stato quello di ottenere per il serbatoio le dimensioni adatte affinché fosse stato possibile effettuare una completa separazione tra le fasi liquida e vapore, presenti entrambe in virtù delle condizioni fisiche del flash, sulla base della velocità di risalita del gas. È stato inoltre importante fornire il giusto spazio di espansione al vapore presente all'interno del serbatoio, in modo tale da permettere la completa caduta per gravità delle residue gocce di liquido eventualmente trascinate dalla corrente gassosa. Per poter migliorare l'efficienza dei barilotti di flash, è possibile predisporre dei sistemi di abbattimento delle nebbie (demister), ma nel caso presentato non è stato necessario. Per quanto soltanto il serbatoio secondario sia stato progettato in modo tale da prevedere la presenza delle due fasi dopo la laminazione attraverso la valvola a spillo, anche il primo contenitore è stato progettato con i criteri di un barilotto di flash, anche perché durante la fase sperimentale ci si è trovati spesso in condizioni fisiche tali da avere la compresenza nello stesso vessel di liquido e vapore. Utilizzando i dati sulle portate massiche della Tabella 2 ed avendo impostato una base temporale per i calcoli pari ad 1 h, si è arrivati a calcolare una portata totale oraria da processare di $0,015 \text{ m}^3/\text{h}$. Successivamente si è scelto di impostare un grado di vaporizzazione in seguito all'avvenuta espansione pari a 0,13, in modo tale da calcolare una portata liquida di $2,2 \times 10^{-3} \text{ kg/s}$ ed una portata di vapore di $3,3 \times 10^{-4} \text{ kg/s}$. Per semplificare i calcoli si sono trattate queste due correnti come composte totalmente da acqua, per cui è stato possibile selezionare 1000 kg/m^3 e $0,59 \text{ kg/m}^3$ come valori di densità per la fase liquida e vapore rispettivamente. I criteri di progettazione dei serbatoi ruotano attorno al valore massimo ammissibile di velocità della

fase vapore in ingresso al recipiente e questo parametro viene calcolato con l'equazione di Sounders-Brown (4.1.).

$$V = (k) \sqrt{\frac{\rho_L - \rho_V}{\rho_V}} \quad (4.1.)$$

Dove V rappresenta la velocità del vapore, k è il Vapor Loading Factor (VLF) e ρ_L e ρ_V indicano rispettivamente la densità del liquido e del vapore.

Per il calcolo del VLF, è possibile fare riferimento a diverse relazioni, ma quella che è stata utilizzata in questo contesto è l'equazione di Blackwell (4.2.).

$$k = [A + B \ln(V) + C \ln(V^2) + D \ln(V^3) + E \ln(V^4)] \quad (4.2.)$$

Dove V indica il parametro calcolato con l'equazione 4.1. ed A, B, C, D ed E sono delle costanti i cui valori sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6: Valori delle costanti dell'equazione di Blackwell.

A	-1,87
B	- 0,81
C	- 0.18
D	- 0,0145
E	- 0,0010

I calcoli hanno restituito come risultati un VLF pari a 0,38 e, di conseguenza, una velocità del vapore di 4,75 m/s. Per questioni legate alla comodità di utilizzo delle apparecchiature e di risparmio di risorse in fase di costruzione si è scelto di progettare il recipiente destinato ad accogliere i campioni da processare come un flash vessel verticale, mentre per l'altro è stato

scelto di procedere con i calcoli di design di un drum orizzontale, altro termine identificativo per gli apparecchi dove avviene una separazione tra fase liquida e fase vapore. L'unica differenza tra le due modalità di progettazione sussiste nel valore del VLF: infatti nel caso del recipiente verticale esso è 1,25 volte più piccolo di quello calcolato per il serbatoio orizzontale. Nota la velocità del vapore e nota la portata dello stesso è stato possibile calcolare la sezione di passaggio, da cui ricavare il diametro minimo di progetto per il serbatoio. Il volume complessivo richiesto è stato calcolato a partire dalla portata di liquido, avendo imposto come parametro di progetto un tempo di residenza minimo all'interno dei serbatoi pari a 10 minuti. A questo punto è stato necessario selezionare un diametro per la costruzione del serbatoio, avendo scelto di procedere alla realizzazione a partire da tubi commerciali e, ipotizzando i recipienti come cilindrici, sulla base del volume calcolato e del diametro del tubo prescelto è stato possibile ricavare la lunghezza complessiva per entrambi i contenitori. Il calcolo è stato fatto iterativamente fino ad ottenere in entrambi i casi un rapporto lunghezza su diametro compreso tra 3 e 5. Per raggiungere la convergenza nei calcoli, per il recipiente verticale è stato scelto un diametro di circa 114 mm e per il vessel orizzontale si è optato per un diametro di 88 mm, corrispondenti rispettivamente a tubi commerciali da 4 in e 3 in. I parametri calcolati per entrambi i serbatoi sono riassunti nella Tabella 7.

Tabella 7: Risultati dei calcoli svolti durante la fase di progettazione.

DRUM ORIZZONTALE		UNITA' DI MISURA	DRUM VERTICALE		UNITA' DI MISURA
Kh	0,4854	[-]	Kv	0,3883	[-]
Uv max	5,9328	[m/s]	Uv max	4,7462	[m/s]
A min	1,17E-05	[m ²]	A min	1,46E-05	[m ²]
A totale min	8,99E-05	[m]	D min	4,33E-03	[m]
D min	0,0108	[m]	V	0,0014	[m ³]
D	0,1632	[m]	D scelto	0,1140	[m]
V	0,0014	[m ³]	L	0,1371	[m]
D scelto	0,0880	[m]	L vapore	0,3048	[m]
L	0,2645	[m]	L totale	0,4419	[m]
L/D	3,0065	[-]	L/D	3,8775	[-]

Bisogna sottolineare che nel caso del drum orizzontale il diametro minimo sia stato aumentato di 0,15 m per questioni conservative e che nei calcoli del drum verticale sia stata impostata una lunghezza minima per la zona destinata ad accogliere il vapore pari a 0,30 m, per le stesse motivazioni. Come si può notare, in entrambi i casi sono state rispettati i rapporti tra lunghezza e diametro, come da ipotesi progettuali. Dai risultati delle iterazioni è emerso come la scelta dei

tubi da 4 in e 3 in sia perfettamente in linea con le esigenze di costruzione e con le ipotesi di progettazione. Le dimensioni finali teoriche dei due serbatoi sono infine indicate nella tabella 5.

Tabella 8: Dati dimensionali dei serbatoi.

	D [m]	L [m]
ORIZZONTALE	0,088	0,264573
VERTICALE	0,114	0,442036

I tubi commerciali sono dotati poi di spessori differenti, secondo la loro schedula: avendo applicato ad entrambi i contenitori la teoria dei recipienti a pareti sottili per il dimensionamento degli apparati destinati a lavorare sottopressione, è stato possibile calcolare lo spessore necessario per poter operare in tutta sicurezza anche a pressioni di gran lunga maggiori di quelle preventivate. I risultati finali hanno dimostrato che in entrambi i casi lo spessore adeguato risulti pari a 3 mm, dunque i tubi sono ambedue di numero di schedula 10. La realizzazione pratica dei serbatoi è stata eseguita in maniera differente, dal momento che il primo di essi ha la necessità di essere caricato in maniera discontinua, essendo il processo di tipo batch. Infatti il primo vessel è stato costruito in due sezioni, collegate mediante clamp. La parte superiore è essenzialmente un semplice fondo bombato sul quale sono stati praticati quattro fori per poter permettere l'inserzione di tubi strumentali per le apparecchiature di misura e controllo, mentre l'altra sezione è costituita dal tubo da 4 in con un fondello saldato ad un'estremità, avente il tubo di scarico posizionato sul fondo del pezzo. Il drum orizzontale, invece, è stato realizzato a partire dal tubo da 3" con due fondi torosferici a chiudere i due lati aperti. Completano l'apparato sperimentale i tubi in rilsan per collegare i due recipienti e la valvola a spillo, identificata nel modello HF1300 della ditta Hamlet, avendo impostato una perdita di carico di 10 bar tra l'ingresso e l'uscita del congegno e tutto il sistema è stato testato in pressione con acqua al fine di garantirne la tenuta fino a 30 bar, in modo tale da poter gestire senza alcuna preoccupazione la pressurizzazione dei contenitori durante la fase operativa. Vista la necessità di dover riscaldare il campione durante la fase di sperimentazione, si è provveduto a fornire il serbatoio verticale di due gusci in materiale ceramico atti a fornire calore mediante irraggiamento, sfruttando le resistenze elettriche poste al loro interno. Il sistema riscaldante a pieno regime assorbiva 1 kW e per prevenire qualsiasi infortunio legato al contatto accidentale

con superfici calde in fase operativa si è provveduto a rivestire il serbatoio con uno strato di materiale isolante, per l'esattezza lana di vetro. Gli strumenti a disposizione per effettuare la raccolta dati e il monitoraggio dei parametri durante gli esperimenti consistevano semplicemente in termocoppie PT100 e trasmettitori di pressione, i quali comunicavano con il sistema di acquisizione attraverso un quadro elettrico appositamente progettato, che si occupava anche di fornire la necessaria alimentazione ai gusci di riscaldamento. Completa l'elenco degli strumenti un manometro analogico montato sul primo serbatoio grazie ad un sifone, progettato per proteggere lo strumento dalle alte temperature potenzialmente raggiungibili. Il programma di lettura dei dati in ingresso è stato realizzato grazie al linguaggio di programmazione Labview, un codice dedicato esclusivamente ad applicazioni di questo tipo. Nella sua configurazione finale, il software era in grado di leggere in tempo reale la temperatura e la pressione interne del serbatoio verticale, la pressione del serbatoio orizzontale e la temperatura esterna del recipiente di monte, dal momento che era necessario fornire questa informazione al controllore on/off presente nel quadro di comando, responsabile del raggiungimento e del mantenimento della temperatura desiderata in base alle condizioni di prova selezionate. Le apparecchiature presentate sono state poi montate su di un telaio di sostegno, in modo tale da consentirne una facile movimentazione ed un facile utilizzo durante le operazioni di manutenzione e di caricamento (Fig. 3.2.).



Figura 4.2.: *L'apparato sperimentale di CELBICON nella sua configurazione finale.*

5. Materiali e Metodi

5.1. Allestimento degli esperimenti

Una volta costruito l'apparato sperimentale e redatta la tabella guida per gli esperimenti, il passo successivo è stato scontato: l'inizio dei test in laboratorio. Tra i proponenti iniziali del progetto CELBICON c'era la volontà di utilizzare il *R. rubrum* nel processo di produzione della plastica da recuperare ma, a causa di diversi problemi legati alle difficoltà di crescita della biomassa, è stato deciso di basare i processi biologici su *Escherichia Coli*, opportunamente modificato a livello genetico per poter produrre PHB. Questa decisione non ha modificato drasticamente l'approccio da seguire, dal momento che questa tesi non si occupa di verificare le reazioni metaboliche che sono alla base dell'ottenimento dei polioidrossialcanoati; lo scopo della sperimentazione è concentrato sulla dimostrazione dell'efficacia del procedimento di rottura delle cellule prescelto per il progetto, dunque al variare della biomassa trattata non cambia assolutamente nulla per l'indagine stabilita. La soluzione processata in ogni singola prova era composta da *E. coli* ricombinante disperso nel suo brodo di coltura. Gli inoculi batterici venivano sempre eseguiti durante la fase di crescita esponenziale delle cellule, in modo da minimizzare i tempi necessari per avere un quantitativo di biomassa significativo. All'interno delle cellule batteriche componenti la biomassa veniva accumulato il PHB prodottosi in seguito al metabolismo. Le prove effettuate sono suddivisibili in due sezioni: quelle preliminari erano volte al testare la tenuta in pressione di tutto l'apparato, tubazioni comprese; le prove ufficiali indicate nel seguito, invece, avevano valori di temperatura e pressione ben definiti, in modo tale da comprendere meglio l'influenza di queste variabili sull'efficacia della Flash-Explosion. Purtroppo, l'inefficacia mostrata da questa tecnica in seguito ai primi test ha reso necessario reimpostare completamente la tabella degli esperimenti per fare in modo di testare la Gas-Explosion. L'apparato costruito per la FE è stato utilizzato senza alcuna difficoltà anche per le prove di GE. Al termine delle prove di esplosione cellulare, i campioni ottenuti sono stati portati presso i laboratori del Politecnico di Torino, in modo tale da predisporre delle opportune procedure analitiche per provare o meno l'efficacia della laminazione e per determinare la quantità di plastica recuperata dalla biomassa di partenza.

5.2. Preparazione delle colture

Per ciascuno degli esperimenti previsti sono stati preparate colture di *E. coli* all'interno di beute da 70 ml su un terreno ricco denominato LB medium, usato tradizionalmente per la crescita batterica, in aggiunta ad un contenuto di glucosio pari al 10% del volume complessivo ed a poche gocce di una soluzione 20 mg/ml di cloramfenicolo, un antibiotico necessario per evitare la proliferazione di qualunque specie batterica non rilevante. All'interno dell'LB medium troviamo il triptone come fonte di polipeptidi, il cloruro di sodio, che fornisce ioni per l'equilibrio osmotico e l'estratto di lievito da cui le cellule traggono molte altre sostanze nutritive necessarie alla crescita. Una volta raggiunta la fase di crescita stazionaria, il contenuto delle beute è stato centrifugato (5 minuti a 4000 rpm) per poter separare la biomassa dal brodo di coltura ed il sedimento è stato sospeso nuovamente in bottiglie contenenti un uguale volume di soluzione PBS all'1%. Questa soluzione contiene cloruro di sodio, idrogenofosfato di disodio (Na_2HPO_4) e tracce di altri sali minerali e viene comunemente utilizzata in biologia quando è necessario mantenere costante il pH di un campione.

5.3. Svolgimento delle prove

La parte sperimentale vera e propria è stata svolta presso i laboratori di Hysytech s.r.l., avvalendosi dell'apparecchiatura che è stata descritta in precedenza. Ogni prova è stata condotta processando un volume di 250 ml di soluzione neutra con *E. coli*, ottenuta con le tecniche riportate nel paragrafo corrispondente. Il primo passo prevedeva di rimuovere la parte superiore dello strato di coibente che ricopre il serbatoio superiore, per poi aprire la morsa clamp e sollevare la calotta. Dopo di questo si passava ad un rapido esame visivo dell'interno del recipiente, al fine di verificare che non ci fossero incrostazioni di nessun tipo o altri elementi sporcanti, ovvi ostacoli alla buona riuscita del test. Conclusa questa parte preliminare, il serbatoio veniva riempito con la soluzione di prova (250 ml), premurandosi di aver correttamente chiuso la valvola a valle di quella preposta alla laminazione, precedentemente aperta secondo il coefficiente di efflusso desiderato, per evitare il passaggio della soluzione attraverso la tubazione fino all'accumulo nel secondo serbatoio senza aver effettuato l'espansione. Caricato il campione, veniva ripristinato il coperchio del serbatoio e lo strato di materiale isolante, venivano collegati al pannello di controllo gli strumenti di misura predisposti, si accendeva il sistema di acquisizione dati e si provvedeva ad impostare dal quadro

elettrico il valore di temperatura da raggiungere mediante i gusci elettrici, se la prova lo richiedeva. In attesa del riscaldamento occorre prestare massima attenzione alle soglie di allarme del controllore ON/OFF del pannello di controllo, per evitare qualsiasi problema connesso ad un indesiderato aumento di temperatura (Fig.5.1.). Tralasciando le prove a temperatura ambiente, dove era semplicemente richiesta la pressurizzazione mediante azoto o anidride carbonica, la procedura appena descritta è analoga per tutti gli altri test. A questo punto, se era prevista la messa in pressione attraverso la bombola, si impostava il riduttore di pressione della stessa sul valore desiderato e si procedeva all'erogazione del gas avendo registrato il valore di pressione all'equilibrio. In ogni caso, una volta raggiunte le condizioni operative desiderate, era necessario attendere lo stesso lasso di tempo (1 ora), per uniformare tutte le prove sperimentali, trascorso il quale si procedeva all'operazione di espansione aprendo la valvola seguente quella di laminazione: il riduttore di pressione faceva in modo che all'interno del serbatoio ci fosse una pressione costante durante questa fase e si attendeva il completo passaggio della soluzione processata nel secondo serbatoio. Terminata la laminazione si chiudeva la valvola di erogazione del gas e si procedeva al recupero del campione dal recipiente di accumulo mediante l'apposita valvola e si spegnevano il sistema di acquisizione dati ed i gusci di riscaldamento e, una volta raffreddatosi l'apparecchio, si procedeva alla pulizia con acqua, sapone e candeggina, badando bene di eliminare qualunque traccia di sedimento (Fig.5.1.).



Figura 5.1.: *L'apparato di test durante lo svolgimento di una delle prove.*

5.4. Determinazione del peso secco della biomassa

Per poter analizzare correttamente i dati derivanti dalle sperimentazioni, è stato necessario determinare il peso secco della biomassa effettivamente presente all'interno delle colture di partenza. Infatti senza questo passo preliminare, non è possibile avere delle informazioni riguardo l'iniziale contenuto di cellule e, quindi di bioplastica, nei campioni da processare, rendendo inutile ogni analisi successiva.

5.4.1. Materiale occorrente

- Micro pipetta;
- Capsula Petri;
- Pompa a vuoto;
- Campana da vuoto;
- Forno;
- Bilancia da laboratorio;

5.4.2. Procedimento

Prelevare 4 ml di campione e porlo in una capsula Petri precedentemente sterilizzata e pesata con la bilancia da laboratorio. Coprire con l'apposito vetrino la capsula Petri e inserirla nella campana da vuoto. Collegare la pompa a vuoto alla valvola della campana ed accenderla per azzerare la pressione. Verificare la riuscita dell'operazione controllando che la campana non si apra dall'esterno. Porre la campana all'interno del forno e riscaldarla per 60 minuti a 90 gradi. Il vapore acqueo che si libererà in seguito al riscaldamento verrà assorbito dagli appositi cristalli igroscopici presenti all'interno della campana stessa. Trascorso il tempo necessario, prelevare la campana, aprire la valvola per rompere il vuoto e pesare la capsula con la bilancia da laboratorio. La differenza tra il peso complessivo e la tara rappresenta il peso secco della biomassa.

5.5. Estrazione del PHB con cloroformio

Una volta che le prove sono state eseguite, i campioni ottenuti sono stati trasferiti al Politecnico di Torino, per poter essere analizzati in laboratorio con la collaborazione di IIT. Lo scopo di questa tesi è verificare l'efficacia della Gas-Explosion per il recupero del PHB e per questo motivo si è scelto di quantificare la plastica ottenuta in seguito ad ogni singola prova effettuata. Il metodo selezionato per raggiungere questo obiettivo è basato sull'estrazione del PHB mediante un solvente ad esso affine (cloroformio), seguito dal trattamento con antisolvente (esano). La procedura che verrà descritta nel seguito è stata impostata sulla base di informazioni reperite in letteratura sui metodi estrattivi più efficaci per la bioplastica [29].

5.5.1. Materiale Occorrente

- Cloroformio (CHCl_3);
- Esano (C_6H_{14});
- Provette in vetro Pyrex®;
- Olio minerale per bagno termostatico;
- Agitatore Magnetico con piastra riscaldante;
- Agitatore Vortex;
- Ancorette magnetiche;
- Centrifuga da Laboratorio;
- Acqua distillata;
- Pipetta Pasteur in vetro;
- Bilancia di precisione da laboratorio;
- Micro pipetta;
- Cappa aspirante;
- Frigorifero;

5.5.2. Procedimento

Prelevare 50 ml dal campione processato e centrifugare a 4000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Separare il surnatante dal sedimento di fondo, porre quest'ultimo in una provetta di vetro e aggiungere 1 ml di acqua distillata con la micro pipetta. Agitare la provetta con il Vortex per 30 secondi, verificare che il sedimento sia completamente tornato in sospensione e porre all'interno della provetta l'ancoretta magnetica. Aggiungere mediante micro pipetta 1 ml di cloroformio, chiudere la provetta ed immergerla in bagno termostatico a 60°C, mantenendo il sistema in agitazione mediante la piastra magnetica a 900 rpm (Fig. 5.2.).

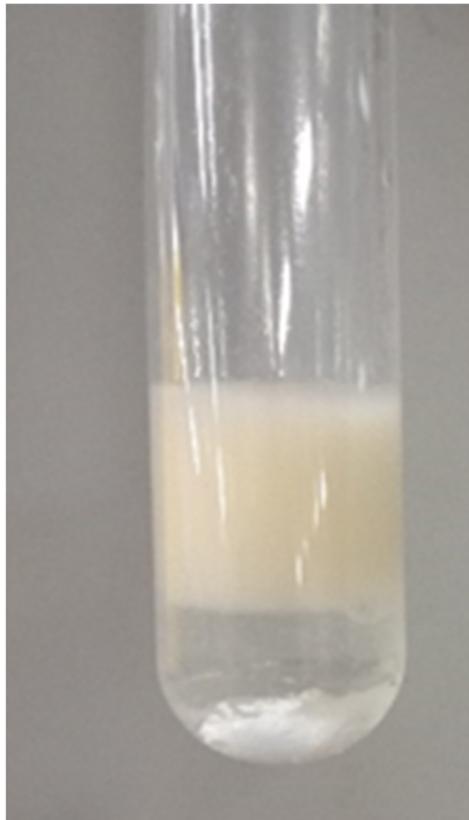


Figura 5.2.: *la provetta con all'interno il sedimento in sospensione (parte superiore) ed il cloroformio (parte inferiore) prima di essere trasferita nel bagno termostatico; si noti sul fondo la presenza dell'ancoretta magnetica per l'agitazione.*

Lasciare incubare per 120 minuti, centrifugare nuovamente a 4000 rpm per 15 minuti e notare la formazione di tre fasi distinte (Fig. 5.3.).



Figura 5.3: *come si presenta il campione dopo la seconda centrifugazione; la fase sul fondo è rappresentata dal cloroformio con il PHB solubilizzato.*

Il cloroformio si raccoglie al fondo ed a questo punto ha solubilizzato il PHB presente nel campione di partenza. Prelevare la soluzione organica dal fondo della provetta mediante la pipetta Pasteur, spostarla in un'altra provetta e diluirla in 5 volumi di esano. Conservare in frigorifero per 12 h a 4°C, centrifugare per far raccogliere sul fondo il PHB precipitato e recuperarlo lasciando evaporare la fase liquida per 12 h a 80° C. Infine pesare la plastica recuperata mediante la bilancia di laboratorio (Fig. 5.4.).

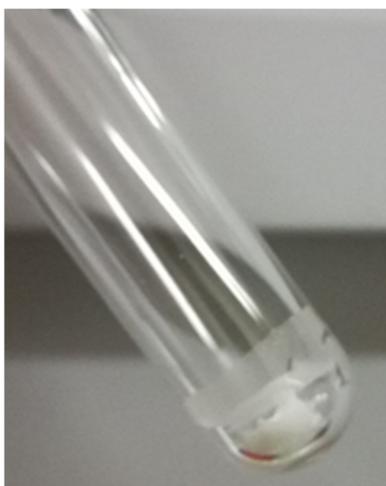


Figura 5.4.: *immagine del PHB precipitato dopo evaporazione del solvente.*

6. Risultati

6.1. Caratteristiche delle prove

La campagna sperimentale definitiva è stata impostata in modo tale che venissero svolte 5 distinte prove. Si è scelto di operare con la tecnica della Gas-Explosion per 4 esperimenti, mentre per l'ultimo si è optato per valutare l'effetto della sola temperatura sulla rottura delle cellule. I gas scelti per condurre i test sono stati l'anidride carbonica (CO₂) e l'azoto (N₂): come è stato riportato nel capitolo 3, la CO₂ viene impiegata in condizioni supercritiche per estrarre direttamente la plastica dalle cellule, ma, in questo caso, si punta a far solubilizzare il gas all'interno della biomassa con un certo tempo di latenza ed una certa pressione per poi lasciarlo espandere alle condizioni atmosferiche, provocando così la rottura della parete cellulare. Per quanto riguarda l'azoto, non esistono esempi di un suo utilizzo in questo campo e la sua scelta è stata guidata dalle sue caratteristiche di inerte, in modo da poter operare con un grado di sicurezza maggiore. Le caratteristiche delle singole prove sono riportate di seguito:

- ✚ **PROVA A, 170° C:** questo test è stato pensato per valutare l'effetto della temperatura nell'indebolimento della parete cellulare. È bene ricordare che l'elevato valore di temperatura raggiunto durante la prova può portare alla degradazione termica del PHA.
- ✚ **PROVA B, N₂ 12 bar, 170° C:** le cellule sono state esposte alla pressione indicata una volta raggiunto il set-point di temperatura. Il tempo di latenza, per poter permettere al gas di sciogliersi nella fase liquida è stato di un'ora.
- ✚ **PROVA C, CO₂, 12 bar, 170° C:** le condizioni di prova sono analoghe alla prova B, cambia soltanto il tipo di gas utilizzato.
- ✚ **PROVA D, CO₂, 12 bar, 30° C:** dopo i test in cui è stato valutato l'effetto combinato di temperatura e pressione, in questo caso si è scelto di valutare esclusivamente l'influenza di quest'ultima.

✚ **PROVA E, N₂, 12 bar, 30° C:** analoga alla prova D, con la sola differenza del gas impiegato.

La scelta del valore di pressione è stata dettata dai limiti tecnici di funzionamento dei riduttori di pressione delle bombole di N₂ e di CO₂, mentre la temperatura è stata volutamente impostata così elevata per poter avere sicuramente degradazione della membrana cellulare fosfolipidica. Per le prove con riscaldamento e messa in pressione si è pressurizzato il sistema soltanto dopo il raggiungimento del valore desiderato di temperatura, perché occorre attendere che si stabilizzasse l'aumento di pressione dovuto all'innalzamento termico. Per maggiore chiarezza la tabella 9 riassume quanto esposto finora.

Tabella 9: Schema degli esperimenti condotti.

PROVA	GAS	PRESSIONE IMPOSTA [bar]	TEMPERATURA IMPOSTA [°C]	PRESSIONE ALL'EQUILIBRIO [bar]	TEMPO ESPOSIZIONE [h]
A	-	1	170	6	1
B	N ₂	12	170	6	1
C	CO ₂	12	170	6	1
D	CO ₂	12	30	12	1
E	N ₂	12	30	12	1

6.2. *Peso secco dei campioni e quantità iniziale di PHB*

Prima che venissero eseguite le prove di esplosione cellulare, è stata effettuata la determinazione del peso secco per le due colture utilizzate negli esperimenti. Si parla di due colture differenti poiché le cinque prove sono state effettuate nell'arco di due giorni distinti, dunque la concentrazione avrebbe potuto essere diversa, dal momento che i campioni non provenivano tutti dalla stessa biomassa. I risultati dell'analisi del peso secco sono riportati nella

tabella 10, insieme ai valori di concentrazione della biomassa sui 4 ml prelevati secondo la procedura di test.

Tabella 10: determinazione di peso secco e concentrazione.

DATA COLTURA	PROVE DI RIFERIMENTO	TARA [g]	PESO SECCO [g]	PESO BIOMASSA [g]	CONCENTRAZIONE [g/l]
21/06/2018	A,C,D	30,95	31,00	0,0447	11,17
22/06/2018	B,E	33,04	33,07	0,0344	8,6

Alla luce di queste informazioni, è stato possibile calcolare l'ammontare di biomassa presente all'interno dei 50 ml di campione prelevati per ogni singola estrazione e, tenendo conto che è stato stimato che il 60% del peso secco delle cellule in esame è costituito da PHB, anche la quantità totale di bioplastica disponibile per il recupero. Questi dati sono illustrati nella tabella 11.

Tabella 11: contenuto iniziale di PHB in ognuno dei 5 campioni.

PROVA	CONCENTRAZIONE [g/l]	BIOMASSA CONTENUTA IN 50 ml [g]	PHB TEORICAMENTE DISPONIBILE [g]
A	11,17	0,56	0,34
B	8,6	0,43	0,26
C	11,17	0,56	0,34
D	11,17	0,56	0,34
E	8,6	0,43	0,26

6.3. Estrazione con cloroformio e peso della plastica recuperata

I test di estrazione con cloroformio, eseguiti secondo la procedura precedentemente descritta, sono stati effettuati in triplicato, per avere una maggiore sicurezza sui risultati ottenuti. Prima che venissero utilizzate, sono state anche pesate le provette di vetro, in modo tale da eliminare successivamente la tara dal computo del peso del PHB recuperato. I pesi netti delle provette sono riassunti nella tabella 12.

Tabella 12: pesi delle provette utilizzate per tutte e 15 le prove di estrazione.

PROVA	PESO PRIMA PROVETTA [g]	PESO SECONDA PROVETTA [g]	PESO TERZA PROVETTA [g]
A	22,67	22,85	22,73
B	22,71	22,67	22,80
C	22,72	22,77	22,66
D	22,63	22,65	22,69
E	22,70	22,79	22,72

Dopo tutte le estrazioni con cloroformio e la conseguente completa evaporazione del solvente, sono state pesate nuovamente tutte le provette con il PHB estratto depositato sul fondo ed i dati ottenuti sono stati inseriti nella tabella 13.

Tabella 13: pesi complessivi delle provette e della plastica estratta.

PROVA	PESO PRIMA PROVETTA [g]	PESO SECONDA PROVETTA [g]	PESO TERZA PROVETTA [g]
A	22,72	22,89	22,81
B	22,72	22,89	22,81
C	22,75	22,79	22,69
D	22,64	22,70	22,71
E	22,76	22,81	22,78

Infine, facendo una semplice differenza tra i pesi delle provette con all'interno il PHB e di quelle vuote, è stato possibile risalire al peso della bioplastica estratta per ciascuno dei campioni di partenza ed i risultati di questa operazione sono illustrati nella tabella 14.

Tabella 14: quantificazione del PHB effettivamente recuperato da ciascuna provetta.

PROVA	PESO PHB PRIMA PROVETTA [g]	PESO PHB SECONDA PROVETTA [g]	PESO PHB TERZA PROVETTA [g]
A	0,051	0,040	0,077
B	0,012	0,052	0,051
C	0,026	0,017	0,026
D	0,0078	0,05	0,018
E	0,064	0,018	0,059

6.4. Resa dell'estrazione

Per poter interpretare al meglio i dati ottenuti, è stato necessario introdurre un nuovo parametro, la resa di estrazione, definito dal rapporto tra i pesi della plastica effettivamente recuperata e della biomassa presente nel campione (6.1.). Questo fattore fa riferimento all'operazione di estrazione con il cloroformio, per valutarne l'efficacia.

$$RESA\ ESTRAZIONE = \frac{mg\ PHB\ RECUPERATI}{g\ BIOMASSA\ INIZIALI} \quad (6.1.)$$

I valori calcolati della resa di estrazione, unitamente alla media tra i tre dati a disposizione per ciascun campione ed alla deviazione quadratica standard degli stessi, sono stati inseriti nella tabella 15. Al fine di rispettare la formula 6.1. si sono usati i dati della tabella 14 moltiplicati per 1000.

Tabella 15: rese di estrazione, medie e deviazioni quadratiche standard di tutti i campioni.

PROVA	PESO BIOMASSA [g]	RESA PRIMA PROVETTA	RESA SECONDA PROVETTA	RESA TERZA PROVETTA	MEDIA	DEVIAZIONE QUADRATICA STANDARD
A	0,56	92,52	71,94	138,70	110,38	58,38
B	0,43	27,90	121,62	120,03	45,75	39,15
C	0,56	47,24	30,42	47,42	41,70	9,76
D	0,56	13,95	89,48	33,82	89,84	53,64
E	0,43	149,30	43,25	138,60	101,06	34,18

Come si può vedere, ci sono fluttuazioni attorno al valore medio per tutti i campioni, in particolar modo è notevole la percentuale di errore per i set di prova A e D. Per meglio illustrare i dati appena presentati, si è disegnato un diagramma a barre, in modo da evidenziare quali prove presentano la resa di estrazione migliore (Fig. 6.1.).

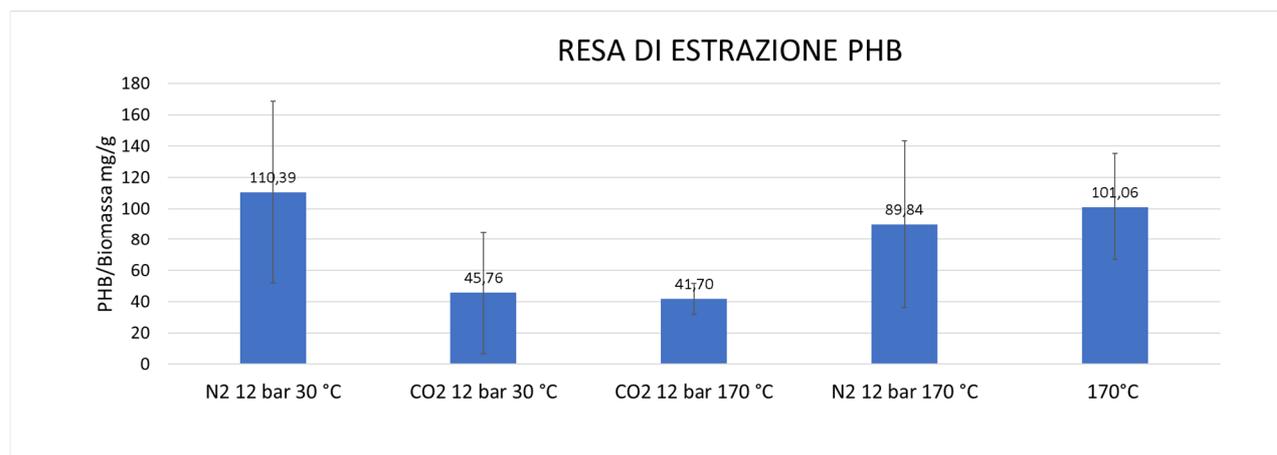


Figura 6.1.: Diagramma a barre con le rese di estrazione;

6.5. Tasso di recupero del PHB

Per completare l'indagine obiettivo di questa tesi, è stato necessario stimare anche il quantitativo di PHB che viene recuperato a partire dalla quantità inizialmente presente nella biomassa. Anche in questo caso è stata introdotta una nuova formula, che descrive il tasso di recupero del PHB (6.2.).

$$TASSO DI RECUPERO PHB = \frac{RESA DI ESTRAZIONE PHB}{g PHB PRESENTE NELLA BIOMASSA} \quad (6.2.)$$

Si è scelto di utilizzare nell'espressione la resa di estrazione per tenere conto dell'operazione svolta per recuperare effettivamente la plastica, di cui non è possibile ignorare il contributo. Analogamente al paragrafo precedente, i calcoli sono stati riassunti nella tabella 16, unitamente alle medie ed alle deviazioni quadratiche standard. Per la precisione, in questo caso si sono utilizzati i valori della tabella 14 tal quali, senza la conversione da grammi a milligrammi.

Tabella 16: tassi di recupero, medie e deviazioni quadratiche standard di tutti i campioni.

PROVA	PHB NELLA BIOMASSA [g]	TASSO DI RECUPERO PRIMA PROVETTA	TASSO DI RECUPERO SECONDA PROVETTA	TASSO DI RECUPERO TERZA PROVETTA	MEDIA	DEVIAZIONE QUADRATICA STANDARD
A	0,34	0,28	0,21	0,41	0,42	0,22
B	0,26	0,11	0,47	0,47	0,13	0,11
C	0,34	0,14	0,09	0,14	0,12	0,029
D	0,34	0,04	0,27	0,10	0,34	0,20
E	0,26	0,58	0,17	0,54	0,30	0,10

Anche questi calcoli mostrano una certa percentuale di errore e, come è stato già fatto in precedenza, si è scelto di mostrare il tasso di recupero in forma percentuale con l'aiuto di un grafico a barre, per avere un quadro più chiaro della situazione (Fig. 6.2.)

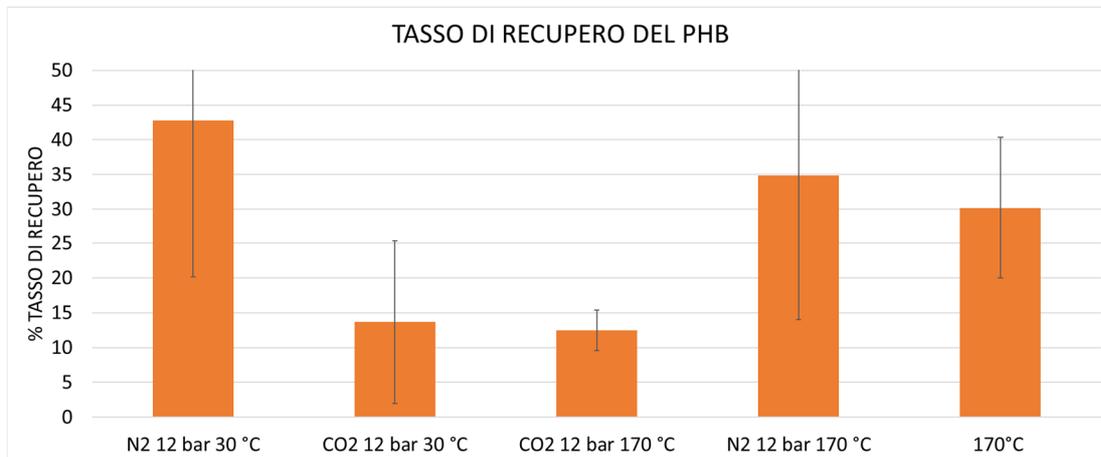


Figura 6.2.: *diagramma a barre con i tassi di recupero*

Come si può vedere dai due grafici, le prove più significative per quanto riguarda i valori di recupero e resa dell'estrazione sono rappresentate sicuramente da quelle condotte utilizzando l'azoto. Occorre menzionare anche la prova eseguita con il semplice riscaldamento, dal momento che evidenzia una buona influenza della temperatura sul trattamento di rottura cellulare.

7. Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano che la resa di estrazione ed il tasso di recupero del PHB hanno andamenti paragonabili per ogni campione analizzato. In particolare è stato interessante notare come i test che hanno evidenziato i migliori risultati siano stati quelli condotti con l'azoto, mentre in generale la temperatura elevata ha favorito la rottura cellulare e la conseguente raccolta di PHB. Per contro, le prove effettuate utilizzando l'anidride carbonica si sono rivelate le meno efficaci in assoluto, sia per la resa di estrazione, che per il recupero. Le cause di questi dati non soddisfacenti sono probabilmente da ricercarsi nelle condizioni operative scelte, le quali influenzano significativamente l'esito della sperimentazione. Infatti sono stati condotti degli esperimenti di questo tipo per il recupero della bioplastica ed in questi studi si è utilizzata l'anidride carbonica intorno ai 40 bar, con una temperatura di circa 40°C ed un tempo di esposizione pari a 3 ore [30]. Dunque la pressione risulta un parametro molto importante non solo per l'efficacia dell'operazione di rottura cellulare tramite la laminazione, ma anche per altri metodi di recupero che non prevedono l'utilizzo di gas, quali ad esempio la French Press: il campione viene caricato all'interno di una camera in acciaio inox in cui viene creato il vuoto attraverso una valvola di laminazione. Espulsa tutta l'aria presente viene azionato un pistone che provvede a far salire la pressione fino anche a 200 bar. In seguito la valvola a spillo viene aperta per poter permettere la laminazione ed il repentino abbassamento di pressione porta alla distruzione le cellule presenti nell'apparecchiatura [31]. Per quanto riguarda la temperatura, è stato dimostrato che un valore elevato della stessa porta a risultati migliori, ma ci sono anche degli inconvenienti legati alla degradazione termica del polimero che si intende recuperare. Facendo un confronto tra i vari campioni dopo l'estrazione e l'evaporazione del solvente, è emerso che quelli trattati alle temperature più elevate mostravano il PHB precipitato come una polvere finemente dispersa sul fondo della provetta, mentre il polimero recuperato da quelli processati a temperatura ambiente appariva di una consistenza maggiore (Fig. 7.1.).

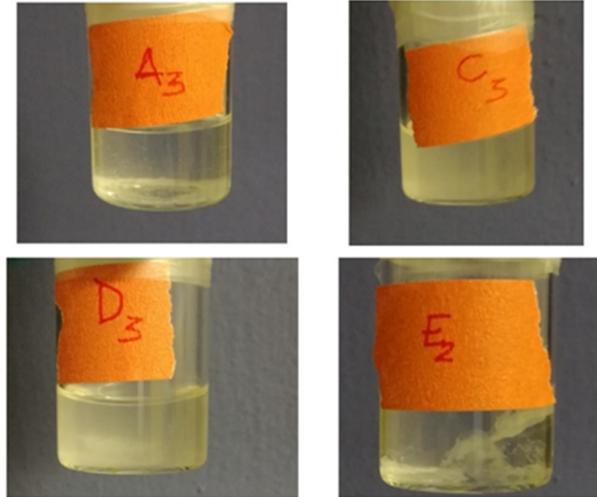


Figura 7.1.: *Confronto dei campioni dopo la precipitazione del PHB; si noti la differenza tra la plastica del campione A₃ (170 °C) e quella estratta dal campione E₂ (12 bar, 30 °C).*

In conclusione si può dire che una maggiore temperatura aumenti di molto le possibilità che le cellule vengano danneggiate, in quanto degrada significativamente la parete delle stesse, ma, allo stesso tempo, è da sottolineare anche l'effetto sulla qualità del polimero recuperato, perché un valore eccessivo di temperatura modifica irreversibilmente la morfologia e la cristallinità del poliestere. Per poter migliorare l'efficacia della rottura cellulare e del conseguente recupero di bioplastica, è possibile adottare alcune soluzioni tecniche: per esempio si può pensare di aumentare semplicemente la pressione operativa durante le prove di Gas-Explosion, compatibilmente con la tenuta dell'apparecchiatura, oppure si potrebbe agire sulla quantità di biomassa inizialmente caricata, dal momento che processandone un quantitativo maggiore si dovrebbe ottenere un recupero di plastica più elevato.

Alternativamente ad *E. coli* si potrebbe pensare di testare un ulteriore ceppo batterico, con una capacità di produzione di PHB migliore, mentre sarebbe anche interessante valutare l'effetto di un pretrattamento sulla biomassa da processare: una possibilità sarebbe quella di effettuare una filtrazione dei campioni in modo da aumentare ulteriormente la concentrazione di biomassa, mentre sarebbe anche possibile aggiungere alla soluzione di prova ipoclorito di sodio, il quale, come è stato illustrato in precedenza, agisce a livello della parete cellulare solubilizzandola e, di fatto, indebolendola, favorendo così la rottura della stessa. Tuttavia occorre prestare molta attenzione alla possibilità che l'ipoclorito di sodio danneggi in un certo grado anche la struttura del PHB, inficiandone così la purezza.

Bibliografia

- [1] T. M. Kostigen, «The World's Largest Dump: The Great Pacific Garbage Patch,» *Discovery Magazine*, 2008.
- [2] «https://www.researchgate.net/figure/Number-of-marine-wildlife-found-entangled-in-marine-debris-during-the-24-th-annual_fig18_269405308,» [Online].
- [3] European Union, *CELBICON Proposal SEP*, 2015.
- [4] J. Luengo, B. Garcia, A. Sandoval, G. Naharro e E. Olivera, «Bioplastics from microorganisms,» *Current Opinion in Microbiology*, 2003.
- [5] K. Ho, A. Pometto e P. Hinz, «Effects of Temperature and Relative Humidity on Polylactic Acid Plastic Degradation,» *Journal of environmental polymer degradation*, 1999.
- [6] T. V. Ojumu, J. Yu e B. O. Solomon, «Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer,» *African Journal of Biotechnology*, vol. III, pp. 18-24, 2004.
- [7] B. Kessler, R. Weusthuis, B. Witholt e G. Eggink, «Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes,» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2001.
- [8] C. Reddy, R. Ghai, Rashmi e C. Kalia V, «Polyhydroxyalkanoates: an overview,» *Bioresource Technology*, 2003.
- [9] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri e A. V, «Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging,» *eXPRESS Polymer Letters*, 2014.
- [10] «<https://polymerinnovationblog.com/polyhydroxyalkanoates-natures-polyester/>,» [Online].
- [11] K. S. S. Hong, W. Tian, G. Q. Chen e W. Huang, «A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy,» *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999.
- [12] P. Schubert, A. Steinbuchel e H. Schlegel, «Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* Genes for Synthesis of Poly-3-Hydroxybutyric Acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli*,» *Journal of Bacteriology*, 1988.
- [13] E. V. Henry e D. Douglas, «Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose,» *Journal of Biotechnology*, 1997.
- [14] A. N. Boyandin, S. V. Prudnikova, M. L. Filipenko e A. Khrapov E, «Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbial Communities of Different Structures and Detection of PHA Degrading Microorganisms,» *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011.

- [15] D. Gao, A. Maehara, T. Yamane e S. Ueda, «Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product,» *FEMS Microbiology Letters*, 2001.
- [16] R. Plackett e J. Burman, «The Design of Optimum Multifactorial Experiments,» *Biometrika*, 1946.
- [17] «<http://curba.racine.ra.it/local/biologia/ipertesto%20ridotto/curvacrescita.htm>,» [Online].
- [18] «<https://www.vialattea.net/content/2641/>,» [Online].
- [19] «https://it.wikipedia.org/wiki/Bioreattore#/media/File:Autoclavable_bench-top_laboratory_bioreactor_%26_fermenter,_Lambda_MINIFOR.jpg,» [Online].
- [20] «<http://www.dellatoffola.it/it/catalogue-products/prodotti-macchine-per-caseifici>,» [Online].
- [21] M. Koller, H. Niebelschütz e G. Braunegg, «Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass,» *Engineering in Life Science*, 2013.
- [22] B. Kunasundari e K. Sudesh, «Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates,» *eXPRESS Polymer Letters*, 2011.
- [23] N. Jacquél, C. Lo, Y. Wei, H. Wu e S. Wang, «Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates),» *Biochemical Engineering Journal*, 2008.
- [24] M. Mitra, A. Mohd, P. Lai-Yee, A. Hidayah, S. Yoshihito e A. Yoshito, «Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol,» *Biotechnol Letters*, 2011.
- [25] X. Jiang, J. Ramsay e B. Ramsay, «Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440,» *Journal of Microbiological Methods*, 2005.
- [26] M. Koller, R. Bona, E. Chiellini e G. Braunegg, «Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure,» *Biotechnol Letters*, 2013.
- [27] J. J. Iris e D. J. Mc Clements, «Production of nanoparticles by anti solvent precipitation for use in food systems,» *Trends in Food Science & Technology*, 2013.
- [28] M. Madkour, D. Heinrich, M. Alghamdi, I. Shabbaj e A. Steinbüchel, «PHA Recovery from Biomass,» *Biomacromolecules*, 2013.
- [29] M. L. Fiorese, F. Freitas, J. Pais, A. M. Ramos, G. M. F. Aragao e M. A. M. Reis, «Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate,» *Engineering Life Science*, 2009.
- [30] K. Nakamura, A. Enomoto e F. H., «Disruption of microbial cells by the flash discharge of high-pressure carbon dioxide,» *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994.

[31] S. Jubeau, L. Marchal e P. J, «High pressure disruption: a two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*,» *Journal of applied phycology*, 2013.

Con questa ultima pagina termina un viaggio iniziato tante sessioni d'esame fa. Il tempo sembra essere volato in questi ultimi anni, densi di gioie e dolori, di ansie e preoccupazioni, di giornate positive e di altre meno serene.

Ci tenevo a ringraziare la mia relatrice, la professoressa Debora Fino per l'opportunità offertami e per la sua guida.

Un grazie va anche a Beatrice e Tonia, per tutti i consigli e l'aiuto che mi hanno dato in questi mesi di intenso lavoro.

Un ringraziamento sincero è dovuto ai ragazzi di Hysytech, che mi hanno insegnato molto e che mi hanno fatto sentire come se fossi a casa.

Un enorme grazie a tutti gli amici e le amiche che mi sono stati sempre vicino, tra mangiate, serate, partite a Risiko!, momenti di studio e di sport. Un pezzetto di questo piccolo traguardo è anche vostro.

Grazie a Raimondo, amico vero e caro, per avermi guidato in momenti in cui non riuscivo a trovare la giusta direzione.

Grazie anche a mio fratello Fabrizio, per avermi dato la forza di andare avanti in molte situazioni.

Infine grazie a mamma e papà, non ce l'avrei mai fatta senza il vostro aiuto. Nonostante la distanza siete stati sempre presenti e non mi avete mai fatto mancare il vostro amore ed il vostro sostegno.