

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

**Produzione di poliidrossialcanoati  
da biomassa lignocellulosica di  
scarto**



**Relatori**

Prof. Francesca Bosco

Prof. Silvia Tabasso

**Candidato**

Alessandro Pession

Luglio 2019

# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Le materie plastiche e l'evoluzione del mercato . . . . .	1
1.2	Poliidrossialcanoati . . . . .	3
1.2.1	Proprietà . . . . .	3
1.2.2	Biosintesi . . . . .	4
1.2.3	Biodegradabilità . . . . .	5
1.2.4	Applicazioni . . . . .	6
1.2.5	Produzione industriale . . . . .	7
1.3	Valorizzazione di biomasse lignocellulosiche con tecnologia a microonde . . . . .	9
1.3.1	Produzione di PHA da biomasse idrolizzate . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Scopo del lavoro</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>15</b>
3.1	Produzione monosaccaridi (MSC) . . . . .	15
3.1.1	Reazione di idrolisi acida in reattore a microonde . . . . .	15
3.1.2	Neutralizzazione con resina basica debole . . . . .	15
3.1.3	Liofilizzazione . . . . .	16
3.2	Allestimento fermentazioni . . . . .	16
3.2.1	Ceppo batterico . . . . .	16
3.2.2	Terreni di coltura . . . . .	16
3.2.3	Fermentazioni in coltura pura . . . . .	18
3.2.4	Strumentazione . . . . .	20
3.3	Analisi e caratterizzazioni chimico-fisiche . . . . .	21
3.3.1	Caratterizzazione monosaccaridi . . . . .	21
3.3.2	Determinazione densità ottica e pH delle colture . . . . .	21
3.3.3	Determinazione concentrazione biomassa . . . . .	22
3.3.4	Estrazione dei poliidrossialcanoati (PHA) . . . . .	22
3.3.5	Caratterizzazione dei PHA . . . . .	23

<b>4</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>25</b>
4.1	Curva di crescita di <i>Leuconostoc</i> in MRS . . . . .	25
4.2	Prove di fermentazione di <i>Leuconostoc</i> in <i>Khardenavis</i> con saccarosio	25
4.2.1	Ottimizzazione terreno . . . . .	25
4.2.2	Prove di crescita preliminari . . . . .	26
4.3	Ottimizzazione della neutralizzazione del grezzo di reazione su resina	29
4.3.1	Prima reazione - neutralizzazione in beker agitato . . . . .	29
4.3.2	Seconda reazione - neutralizzazione con singolo passaggio in colonna impaccata . . . . .	31
4.3.3	Terza reazione - neutralizzazione con doppio passaggio in colonna impaccata . . . . .	31
4.3.4	Confronto tra le metodologie di neutralizzazione . . . . .	31
4.4	Prova di fermentazione di <i>Leuconostoc</i> in <i>Khardenavis</i> con monosac- caridi in provetta . . . . .	32
4.5	Scale-up produzione monosaccaridi . . . . .	34
4.6	Fermentazione di <i>Leuconostoc</i> in <i>Khardenavis</i> con monosaccaridi in beuta . . . . .	36
<b>5</b>	<b>Conclusione e prospettive future</b>	<b>41</b>
	<b>Riferimenti bibliografici</b>	<b>43</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Le materie plastiche e l'evoluzione del mercato

La plastica è un bene essenziale per lo stile di vita moderno, data la sua superiorità come materiale dal punto di vista di costo, processabilità e proprietà funzionali. Nel 2017 la produzione mondiale di plastica ha raggiunto il valore di 348 milioni di tonnellate, l'Europa rappresenta il 18,5 % di questa produzione [1]. In Figura 1.1 sono riportati i polimeri maggiormente richiesti dal mercato europeo, nel 2018, (51.2 milioni di tonnellate di domanda totale) nei diversi settori applicativi. Come notiamo il packaging è il settore con più richiesta; polipropilene e polietilene da soli rappresentano quasi la metà della plastica utilizzata in Europa [1].

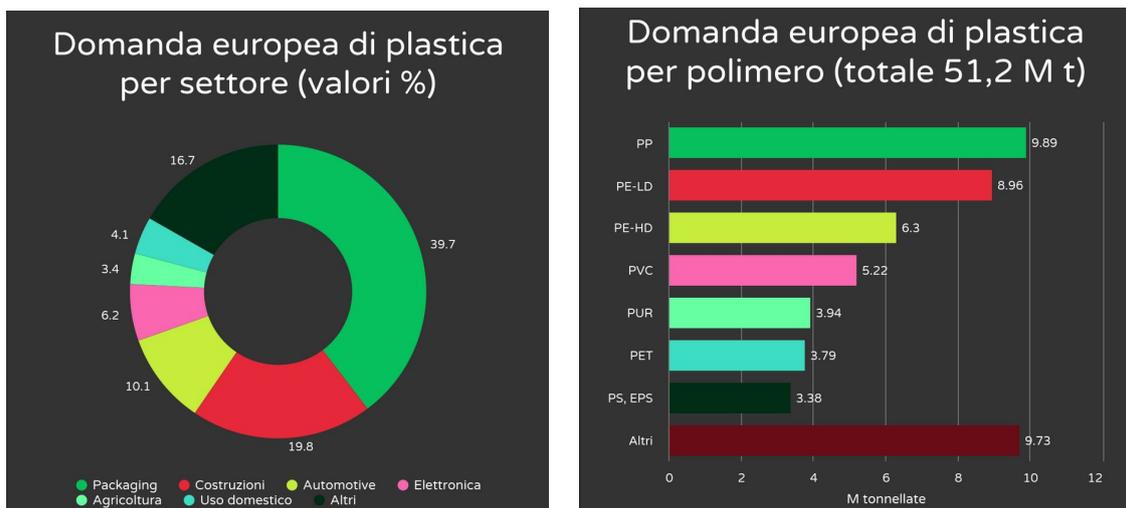


Figura 1.1. Domanda di plastica del mercato Europeo nel 2017 diviso per settore applicativo e tipo di polimero [1].

Le plastiche di origine petrolchimica hanno il difetto di permanere nell'ambiente per centinaia di anni, causando un notevole inquinamento. In Europa solo il 31.1 % della plastica utilizzata viene riciclata, il restante viene smaltito o in discarica o in un impianto di produzione di energia elettrica, producendo comunque una notevole quantità di CO<sub>2</sub>, gas a effetto serra. L'utilizzo di bioplastiche e plastiche biodegradabili ridurrebbe notevolmente la produzione di rifiuti e l'emissione di CO<sub>2</sub> durante il loro ciclo di vita, anche grazie all'inserimento di questi polimeri all'interno di un'economia circolare [2]. In questo modo i biopolimeri che non riescono a essere riciclati o usati nuovamente, possono essere trattati insieme ai rifiuti compostabili. Il compost ottenuto viene utilizzato per la crescita delle piante, dalle quali si possono ottenere nuovi prodotti in bioplastica attraverso processi di bio-raffineria. Ad oggi la maggior parte delle plastiche prodotte è di origine fossile, nel 2017 le bioplastiche rappresentano il due per cento della plastica prodotta a livello mondiale [3].

I biopolimeri possono essere suddivisi in tre categorie per origine e produzione:

1. Estratti direttamente da materiale naturale.  
Polisaccaridi come amido e cellulosa, e proteine come caseina e glutine.  
Mater-Bi<sup>®</sup> (Novamont, Italia), Solanyl<sup>®</sup> (Rodenburg, Olanda)[4]
2. Prodotti tramite sintesi chimica usando monomeri biologici e rinnovabili.  
Degli esempi sono l'acido polilattico (PLA) e il bio-polietilene (Bio-PE), sintetizzato partendo da etanolo.  
NatureWorks<sup>®</sup> (NatureWorks, US), U'z (Toyota, Giappone)[4], I'm Green<sup>®</sup> (Braskem, Brasile).
3. Prodotti da microrganismi.  
Poliidrossialcanoati.  
Biomer<sup>®</sup> (Biomer, Germania), Biopol<sup>®</sup> (Metabolix, US)[4]

Le plastiche prodotte tramite sintesi chimica usando monomeri biologici, come il BioPET, BioPE e BioPVC non sono biodegradabili, ma hanno proprietà simili alle loro controparti di origine fossile, avendo però il vantaggio di essere prodotte a partire da fonti rinnovabili. Ciò permetterebbe di inserirle nei cicli di riciclaggio o smaltimento già esistenti.

Invece plastiche come il PLA e i PHA sono biodegradabili e non devono essere inserite nei cicli di riciclaggio e smaltimento classici ma compostati. Il PLA se smaltito in discarica permane per lungo tempo: le condizioni anaerobiche e le temperature tipiche di una discarica (circa 20 °C) non garantiscono una sufficiente attività batterica ed enzimatica in grado di degradare l'acido polilattico ad alto peso molecolare [5].

Nonostante tutte le complicazioni dovute al prezzo ancora poco competitivo, i pochi incentivi statali e la bassa flessibilità applicativa delle bioplastiche, la produzione di polimeri di origine biologica è in aumento e stimata a 7.5 milioni di tonnellate nel 2022, dalle 6.4 milioni di tonnellate del 2017 [3].

## 1.2 Polioidrossialcanoati

I Polioidrossialcanoati (PHA) sono dei biopolimeri sintetizzati da vari batteri, in specifiche condizioni di crescita quali l'assenza di micronutrienti [6] e l'eccesso di carbonio, e accumulati come deposito di energia.

I PHA sono dei poliesteri naturali, scoperti per la prima volta nel 1926 dal chimico francese Lemoigne che individuò il poli-3-idrossibutirrato (PHB) in *Bacillus megaterium* [7].

Negli anni '70 vennero identificati altri polimeri appartenenti ai PHA, composti da unità monomeriche diverse dall'acido idrossibutirrico. Questo ebbe un grosso impatto nella ricerca e nell'attrattiva commerciale dei PHA, perché l'omopolimero PHB è parzialmente cristallino e risulta quindi fragile, con poco interesse applicativo. Invece l'aggiunta di altri monomeri all'interno della struttura polimerica, per esempio il 3-idrossivalerato, migliora sensibilmente le sue proprietà.

Negli anni '80 vennero identificate le vie metaboliche e i geni responsabili alla biosintesi dei PHA. Tali geni furono clonati e inseriti in batteri ricombinanti (*E. coli*) e in piante transgeniche per la produzione di PHA [8].

Ad ora sono stati identificati più di 90 generi di batteri, sia Gram-positivi sia Gram-negativi, come produttori di polioidrossialcanoati, sia in condizioni aerobiche che anaerobiche [6].

La struttura chimica dei PHA è mostrata in figura 1.2. A seconda del numero di carboni nel gruppo alchilico laterale (R) essi sono classificati in tre classi: scl-PHA, a corta catena (meno di 5 atomi di carbonio); mcl-PHA, a catena media (5-14 atomi di carbonio); lcl-PHA, a catena lunga (più di 14 atomi di carbonio), poco comuni e non molto studiati [6].

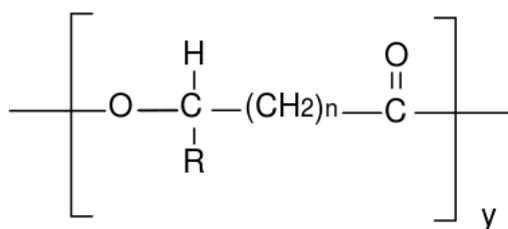


Figura 1.2. Struttura Generale dei PHA

### 1.2.1 Proprietà

I PHA sono generalmente polimeri termoplastici semi-cristallini, le caratteristiche fisiche e meccaniche sono simili a quelle di altre plastiche di largo utilizzo, come il propilene e il polietilene a bassa densità. Le proprietà di questi poliesteri dipendono dalla loro struttura chimica (omopolimero o copolimero) e data l'esistenza di un

gran numero di monomeri diversi è possibile ottenere diverse proprietà. Tra le caratteristiche più utili dei PHA riportiamo la biodegradabilità, la biocompatibilità e la bassa permeabilità al vapore acqueo, il che li rende molto interessanti in vari settori quali quello medico-chirurgico o del packaging alimentare.

Se analizziamo la tabella 1.1 notiamo che il PHB ha alcune proprietà termiche e meccaniche comparabili ai polimeri di origine fossili (per esempio il polipropilene), quindi un alto punto di fusione e una buona resistenza a trazione. Tuttavia il PHB è poco interessante dal punto di vista applicativo, a causa della sua rigidità e fragilità (numero di Young sopra l'unità e basso allungamento a rottura); questo è dovuto alla formazione di grossi cristalli durante una ri-cristallizzazione che avviene nel tempo a temperatura ambiente [9].

Sempre in tabella 1.1 sono riportate le proprietà di diversi copolimeri dei PHA. Innanzitutto si nota che essi presentano una temperatura di fusione più bassa che ne migliora la lavorazione (infatti la temperatura di decomposizione del PHB è di 200 °C, prossima a quella di fusione di 179 °C). Inoltre, l'allungamento a rottura dei copolimeri è nettamente superiore a quella del PHB, così come l'elasticità.

Tabella 1.1. Comparazione delle proprietà di diversi PHA, PP e LDPE [10] [11] [12] [13]

Polimeri	T fusione (°C)	T trasizione vetrosa (°C)	Modulo di Young (GPa)	Resistenza a trazione (MPa)	Allungamento a rottura (%)	Resistenza all'impatto (J/m)
PHB	179	4	3.5	40	5	50
P(3HB-co-3HV)						
3 mol %	170	5	2.9	38	-	60
20 mol %	145	-1	0.8	20	50	400
P(3HB-co-4HB)						
10 mol %	159	-35	-	24	242	-
90 mol %	50	-39	100	65	1080	-
P(3HB-co-3HHx)						
10 mol %	127	-1	-	21	400	-
17 mol %	120	-2	-	20	850	-
P(3HB-co-6%3HD)	80	-40	-	20	300	-
PP	176	-10	1.7	38	400	45
LDPE	130	-30	0.2	10	620	-

In definitiva, la famiglia dei PHA presenta un ampio range di proprietà termiche e meccaniche, in dipendenza della composizione monomerica, che allarga le possibilità applicative. Per esempio i mcl-PHA si comportano da elastomeri, con una bassa temperatura di fusione, bassa resistenza a trazione e alto allungamento a rottura, caratteristiche che li rendono più flessibili ed elastici dei scl-PHA.

## 1.2.2 Biosintesi

I PHA sono sintetizzati da svariati organismi viventi, di cui i principali sono piante e batteri. Porrier et al. [14] hanno mostrato come sia possibile accumulare PHA in

piante transgeniche. Tuttavia concentrazioni elevate del polimero impediscono lo sviluppo della pianta portando a rese non ottimali, inoltre i tempi di crescita e il costo dell'ingegneria genetica per l'espressione dei geni produttori dei PHA rendono sconveniente l'utilizzo delle piante [15].

Finora sono stati studiati centinaia di batteri, sia Gram+ che Gram-, in grado di sintetizzare i PHA, in diverse condizioni di crescita. Con l'utilizzo dell'ingegneria genetica si è allargato il numero di specie produttive.

I polioidrossialcanoati fungono da riserva di energia per i microrganismi. Essi vengono sintetizzati, sotto forma di granuli intracellulari, in condizioni di stress quali l'eccesso di carbonio e la carenza di macronutrienti (azoto, fosforo, ossigeno, ecc.); quando la fonte di carbonio viene esaurita, i microrganismi sono in grado di depolimerizzare i PHA e di utilizzarli come nuova fonte di carbonio [16].

La biosintesi dei PHA è stata ampiamente studiata e ad oggi sono state individuate otto principali vie metaboliche [17] (Figura 1.3). Se analizziamo la via metabolica degli zuccheri notiamo che il monomero viene sintetizzato a partire da acetil-CoA. Altre vie evidenziano che vari intermedi metabolici (per esempio del ciclo di Krebs o della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi) servono da precursori per la sintesi dei monomeri necessari. La polimerizzazione avviene ad opera dell'enzima PHA-sintetasi, esso è stereospecifico, per questo i PHA prodotti dai microrganismi sono isotattici.

A seconda della fonte di carbonio, della specie batterica utilizzata e delle condizioni di crescita si può controllare il polimero ottenuto. Si è visto che utilizzando medium contenenti, oltre alla fonte di carbonio, un componente che funga da precursore si possono ottenere dei copolimeri; per esempio aggiungendo acido propionico o acido levulinico ad un medium contenente glucosio si può ottenere P(3HB-co-3HV) [18]. Inoltre è possibile la sintesi di copolimeri a blocchi alternando nel tempo l'approvvigionamento del substrato carbonioso [19].

### 1.2.3 Biodegradabilità

Uno dei principali vantaggi dei PHA è la loro biodegradabilità in diversi ambienti, sia in condizioni aerobiche sia anaerobiche, senza la formazione di nessun prodotto tossico. La biodegradazione dipende dalle proprietà del polimero (composizione, grado di cristallinità, peso molecolare) e dalle condizioni ambientali (pH, temperatura, attività microbica, umidità, superficie colonizzata) [9].

Sono stati individuati svariati microrganismi (funghi, batteri e molti dei PHA produttori) capaci di sintetizzare enzimi extracellulari in grado di idrolizzare i PHA e formare monomeri e oligomeri idrosolubili, utilizzabili come fonte di carbonio [10].

Si è notato come i copolimeri degradino più velocemente, a causa della loro minore cristallinità, dato che la zona amorfa viene attaccata per prima [20]. La velocità di degradazione varia dai mesi, in acque reflue (Figura 1.4) ad anni, in acqua marina [21].

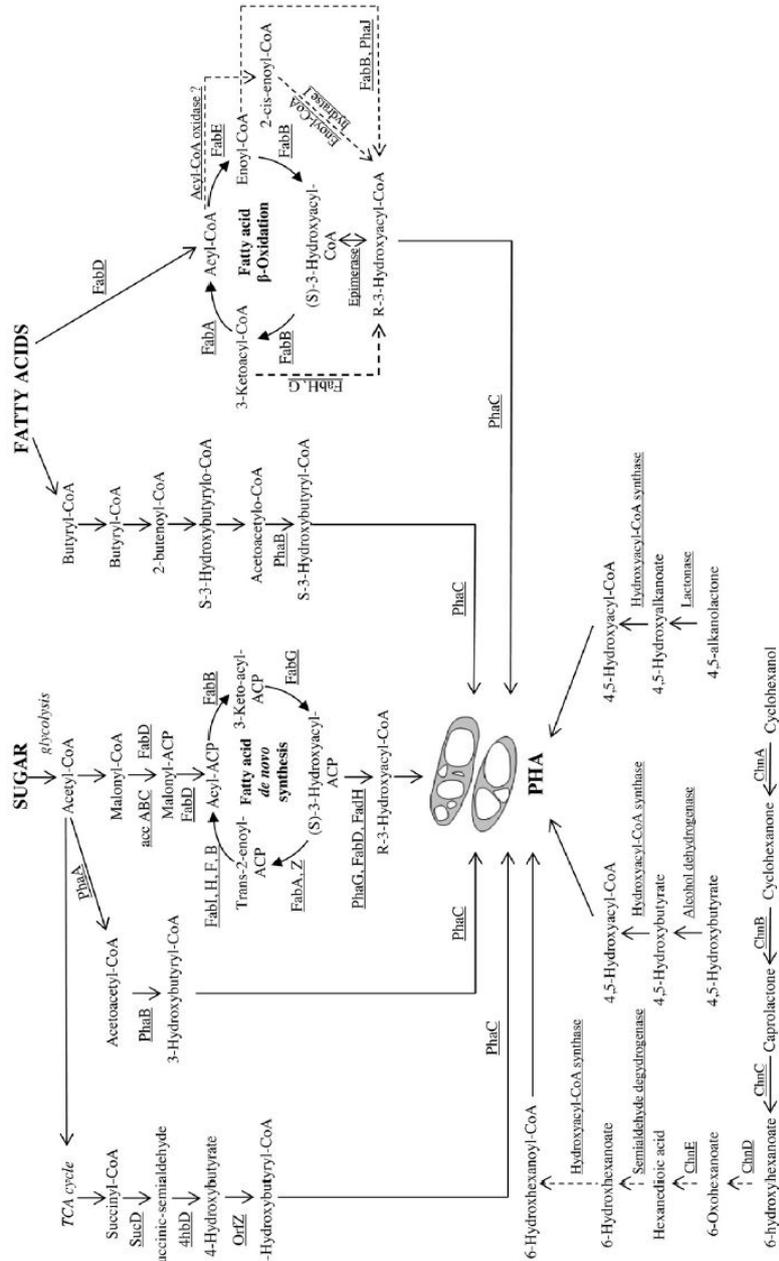


Figura 1.3. Vie metaboliche per la sintesi dei PHA [17]

### 1.2.4 Applicazioni

I PHA sono una classe di polimeri che si adattano bene ad una vasta gamma di applicazioni. Data la biocompatibilità, biodegradabilità e le buone proprietà barriera, il primo campo di utilizzo dei PHA è stato nel packaging (bottiglie di

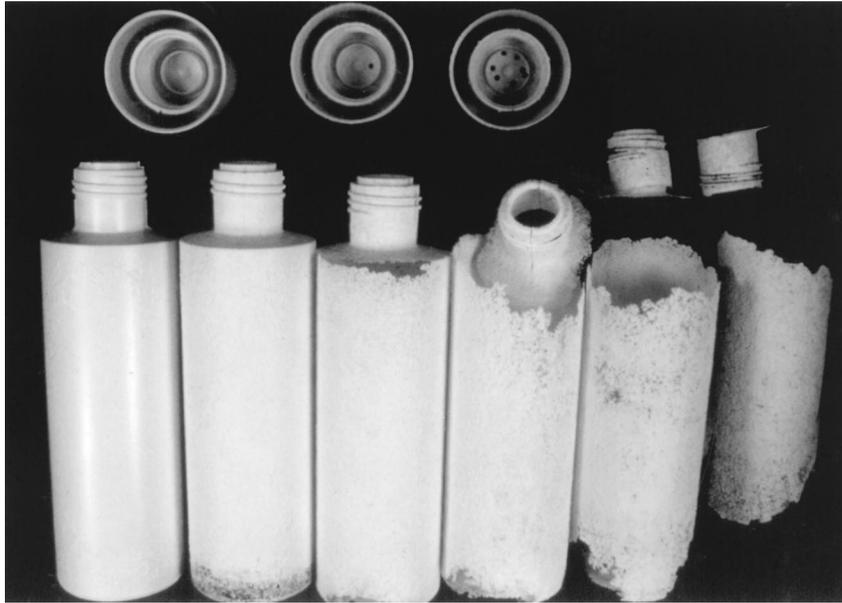


Figura 1.4. Degradazione di bottiglie in P(3HB-3HV) in acque reflue in condizioni aerobiche, temperatura di 20 °C, a 0, 2, 4, 6, 8 e 10 settimane [21]

shampoo, contenitori per cosmetici) e in ambito alimentare (film per la copertura di cartoni, bottiglie per il latte) [22].

I PHA vengono utilizzati estensivamente in ambito medico grazie alla non tossicità dei composti di degradazione, in particolare il PHB a basso peso molecolare e l'acido 3-idrossibutirrico sono presenti nelle cellule di svariati organismi, nonché nel sangue umano [23]. Gli ambiti in cui i PHA vengono maggiormente impiegati sono l'ingegneria tissutale (ricostruzione di vasi sanguigni, protesi e rigenerazione di tessuto osseo), la farmaceutica (sistemi per il rilascio dei farmaci), la chirurgia (filo per suture, scaffolds) e la cardiologia (stent, valvole cardiache).

In agricoltura i polimeri biodegradabili stanno trovando sempre più spazi applicativi, ad esempio: teli per la pacciamatura biodegradabili, che vengono degradati direttamente nel terreno invece di essere rimossi [24]. Pesticidi integrati in pellets di PHB, il pesticida viene rilasciato mentre il polimero viene degradato; l'attività batterica che causa il degrado del polimero è correlata con l'attività parassitaria, in questa maniera più c'è necessità di antiparassitario più il PHB viene degradato, liberando il pesticida, così da evitarne un eccessivo utilizzo [25].

### 1.2.5 Produzione industriale

La produzione industriale dei PHA è iniziata negli anni '80, quando il prezzo del petrolio aumentò, portando maggiore interesse verso una plastica proveniente da fonti non fossili. Il primo brevetto riguardante il PHB, come una termoplastica

biodegradabile, risale al 1962. Un impianto pilota per la produzione dei PHB fu realizzato da ICI (Imperial Chemical Industries); la produzione fu però arrestata a causa del costo troppo elevato e delle caratteristiche peggiori del polimero, quando confrontato con il polietilene. Nel 1983 avvenne la commercializzazione da parte di Zeneca (ex ICI), con il nome di Biopol, del P(3HB-3HV) [10]. In seguito numerose aziende iniziarono la produzione di diversi PHA, ad oggi se ne contano 10 con un'alta potenzialità produttiva [26].

Negli anni, la ricerca si è concentrata nell'abbassamento del costo dei PHA in vari modi: la selezione di diversi ceppi batterici iperproduttori, l'utilizzo di fonti di carbonio derivanti da scarti e l'impiego di tecniche fermentative più efficienti.

I batteri più utilizzati per la produzione sono *Alcaligenes eutropha*, per la produzione di P(3HB) e P(3HB-3HV); *Alcaligenes latus*, un buon candidato per la produzione di P(3HB); *Protomonas extorquens*, utilizzando metanolo come fonte di carbonio, substrato più economico del glucosio; *Escherichia coli*; *Pseudomonas oleovorans*, il quale può produrre diversi tipi di PHA in funzione del substrato utilizzato [27].

In studi precedenti [28] in cui si è effettuata una fermentazione con una coltura mista in scotta di latte, è stato individuato *Leuconostoc sp* come PHA-produttore. Questo genere presenta alcuni vantaggi: è un organismo GRAS, non produce endotossine in quando Gram+ ed è capace di produrre diverse molecole, ad esempio acido lattico, che potrebbero avere interesse se prodotte in contemporanea ai PHA. Il polimero prodotto da *Leuconostoc* è stato individuato quale il copolimero P(3HB-3HV).

L'utilizzo di scarti industriali prevede un pretrattamento per rendere il substrato adatto alla crescita microbica e all'accumulo dei PHA. Tale processo non può essere troppo complesso e dispendioso, altrimenti il vantaggio economico verrebbe meno. I principali scarti e sottoprodotti industriali, utili al recupero della fonte di carbonio per la produzione di PHA, possono essere suddivisi in diverse categorie [29]:

1. Melasso dalla produzione di zucchero.
2. Materiale contenente amido.
3. Materiale contenente cellulosa ed emicellulosa.
4. Siero di latte proveniente dall'industria casearia.
5. Glicerolo, oli e acidi grassi.
6. Substrati gassosi.
7. Acque reflue.

Le tecniche fermentative sono principalmente tre: "batch", "feed-batch" e in continuo. La coltura in "batch" è utilizzata nella fase di arricchimento in PHA-produttori, quando si utilizza una biomassa mista. Mentre in coltura pura tale

strategia fermentativa viene implementata in modo che si raggiunga una buona concentrazione cellulare, nella fase di crescita e successivamente, in seguito all'esaurimento di un particolare macronutriente, si abbia accumulo di PHA. La scelta su quale macronutriente debba essere in difetto dipende dal ceppo batterico utilizzato, inoltre non vengono raggiunte concentrazioni cellulari elevate [30].

La coltura "feed-batch" prevede una prima fase identica alla coltura "batch", fino all'ultima parte della fase esponenziale di crescita, a quel punto viene introdotto del substrato fresco in modo da garantire una velocità di crescita desiderata e evitare la produzione di sottoprodotti. Tale tecnica viene utilizzata quando la produzione di PHA non è associata alla fase di crescita (per esempio in *C. necator*) e presenta valori di densità cellulare migliori che in coltura "batch" [30].

I processi sviluppati in continuo hanno un notevole interesse commerciale in quanto presentano produttività più alte che negli altri sistemi, soprattutto quando vengono utilizzati batteri con un'elevata velocità di crescita. In ambito di ricerca solo l'8 % delle colture si sono svolte in continuo, questo perché la prima fase di studio prevede l'ottenimento di informazioni sulla fattibilità e l'ottimizzazione delle condizioni di crescita; invece gli impianti pilota sono maggiormente utilizzati in modalità "feed-batch", la quale permette una migliore scalabilità [31].

### Costi di produzione

Benché le plastiche di origine microbica siano più vantaggiose sotto molti aspetti rispetto ai polimeri di origine fossile, i PHA risultano ancora poco competitivi a causa del loro alto costo. I fattori principali che influenzano il costo finale del prodotto sono la fonte di carbonio, la modalità di fermentazione e i processi di estrazione e lavorazione del polimero. Tali scelte vanno a influenzare il contenuto di polimero all'interno della cellula; più la concentrazione è elevata più l'estrazione è agevole abbassando il prezzo del prodotto.

Si è visto che fonti di carbonio di recupero, come idrolizzati di scarti vegetali o siero di latte, siano dei buoni substrati per l'accumulo di PHA e nonostante diano rese complessivamente più basse, il prezzo finale del polimero risulta più basso rispetto a processi che utilizzano fonti di carbonio raffinate [32].

## 1.3 Valorizzazione di biomasse lignocellulosiche con tecnologia a microonde

Le biomasse lignocellulosiche sono composte principalmente da cellulosa, emicellulosa e lignina. L'interesse principale verso queste biomasse è il loro riutilizzo come substrato di partenza per la produzione di molecole a basso peso molecolare, provenienti da fonti rinnovabili. La cellulosa e l'emicellulosa sono i principali carboidrati che compongono le biomasse, da esse si possono ottenere i monosaccaridi che le

compongono, mediante idrolisi del legame glicosidico. I monosaccaridi principali ottenuti dall'idrolisi sono glucosio, xiloglucani, xilani, mannani e glucomannani.

L'idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa può avvenire in due modalità: per via enzimatica o per via chimica, con l'utilizzo di acidi minerali diluiti. Il processo enzimatico prevede condizioni blande ma è caratterizzato da tempi lunghi e da un alto costo, dovuto agli enzimi utilizzati. Il processo chimico invece prevede l'impiego di alte temperature e alte pressioni, per evitare l'evaporazione dell'acido utilizzato.

Di particolare interesse per l'idrolisi acida delle biomasse lignocellulosiche è l'utilizzo delle microonde [33]. Le reazioni organiche microonde-assistite sono caratterizzate da un notevole aumento delle velocità di reazione e della selettività, diminuendo i tempi di trattamento.

Le microonde sono una radiazione elettromagnetica di frequenza 300 MHz - 300 GHz, ma gli strumenti, sia per uso domestico che di ricerca, lavorano a 2.45 GHz, per evitare interferenze con i sistemi radar. Le reazioni microonde-assistite si basano sul "riscaldamento dielettrico in microonde", fenomeno per cui una sostanza assorbe le microonde e le converte in calore. La capacità di una sostanza di convertire l'energia elettromagnetica in calore, ad una data frequenza, è determinata dal fattore di perdita, che dipende dalla costante dielettrica del materiale e dalla perdita dielettrica (indice dell'efficienza di conversione della radiazione in calore). Per un rapido riscaldamento è richiesto un solvente con un alto fattore di perdita [34].

I gradienti di temperatura ottenuti con un riscaldamento a microonde sono invertiti rispetto al riscaldamento classico conduttivo. In altre parole, la parte più interna del campione si trova ad una temperatura superiore a quella più esterna, garantendo un riscaldamento più omogeneo. Questo fenomeno, accoppiato al veloce aumento di temperatura, è sufficiente a spiegare l'aumento della reattività nelle reazioni microonde-assistite.

### 1.3.1 Produzione di PHA da biomasse idrolizzate

L'utilizzo di residui agro-alimentari rientra nell'ottica di reimpiego degli scarti industriali per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto, come le bioplastiche di origine batterica prodotte con monosaccaridi provenienti da idrolizzati.

In letteratura troviamo svariati studi che concentrano la loro attenzione nell'utilizzo di idrolizzati come fonte di carbonio nella produzione di PHA, poiché circa il 40 - 48 % del costo di produzione dei PHA si può ascrivere alla fonte di carbonio utilizzata per la fermentazione [31]. L'utilizzo di substrati provenienti da materiali grezzi di scarto è una valida alternativa per l'abbattimento del costo del polimero.

Di interesse per il nostro studio è il confronto delle rese di fermentazione (indicate come peso della biomassa secco al litro, w/v) e di produzione di PHA (percentuale di PHA estratto rispetto alla biomassa secca, w/w), utilizzando idrolizzati. I dati raccolti in letteratura sono riportati in tabella 1.2.

Tabella 1.2. Rese di fermentazioni e di produzione di PHA, utilizzando idrolizzati come fonte di carbonio [29] [35]

Tipo di coltura	Ceppo batterico	Substrato	Resa di fermentazione [g/L]	% PHA	PHA [g/L]
Batch, beuta	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bagassa idrolizzata	4.4	53	2.3
Batch, beuta	<i>Burkholderia cepacia</i>	Xilosio	2.6	60	1.6
Batch, beuta	<i>Burkholderia cepacia</i>	Fondi di caffè idrolizzati	5.5	56	3.1
Betch, beuta	<i>Halomonas boliviensis</i>	Crusca di grano e buccia di patate idrolizzati	8	50	4
Batch, beuta	<i>Bacillus firmus</i>	Paglia di riso idrolizzata	1.9	89	1.7
Batch, bioreattore	<i>Ralstonia eutropha</i>	Giacinto d'acqua idrolizzato	12	58.3	7
Batch, beuta	<i>rEscherichia coli</i>	Soia idrolizzata	5.95	73.9	4.4
Batch, beuta	<i>Cupriavidos necator</i>	Bagassa idrolizzata	6	65	1.7
Feed-batch, bioreattore	<i>Burkholderia cepacia</i>	Legno dolce idrolizzato	16.9	51.4	8.7
Batch, beuta	<i>Brevundimona vesicularis</i>	Segatura idrolizzata	0.34	78	0.3

Le biomasse lignocellulosiche prese in esame vengono principalmente idrolizzate con un trattamento chimico in acido diluito, le temperature tipiche sono dell'ordine dei 100 - 150 °C, protratte per tempi di 1 - 4 ore. Come riportato nel paragrafo precedente, con l'utilizzo delle microonde questo tempo di reazione può essere diminuito dalle ore ai minuti.

In seguito, per diminuire la tossicità dell'idrolizzato e rendere il medium disponibile al metabolismo batterico, vengono svolti vari pre-trattamenti, che si possono dividere in tre categorie: fisici, chimici e biologici [35].

Tra i pre-trattamenti fisici citiamo l'evaporazione dei composti volatili e l'applicazione di membrane che legano gli inibitori della crescita [36].

I trattamenti chimici sono quelli più utilizzati e sono: l'"over-liming", una neutralizzazione con idrossido di calcio accompagnata da una precipitazione del solfato di calcio che assorbe le eventuali tossine; trattamenti su carboni attivi; passaggi su resine a scambio ionico.

I trattamenti biologici prevedono l'applicazione di un agente biologico all'idrolizzato, prima della fermentazione per la produzione di PHA, per rimuovere gli eventuali inibitori della crescita; il pre-trattamento può essere microbico o enzimatico. In alternativa il ceppo batterico PHA-produttore può essere lasciato adattare alle condizioni presenti nell'idrolizzato, la fase di adattamento può essere più o meno lunga; questa modalità è stata utilizzata con *Cupriavidos necator*, lasciata adattare in idrolizzato di bagassa [37].



## Capitolo 2

# Scopo del lavoro

In questo lavoro di tesi abbiamo valutato la possibilità di utilizzare dei monosaccaridi, provenienti da una biomassa lignocellulosica di scarto, come substrato per la produzione di poliidrossialcanoati attraverso una fermentazione microbica. L'utilizzo di una fonte di carbonio di recupero è interessante per la riduzione dei costi di produzione dei PHA, con l'obiettivo di rendere il polimero competitivo nel mercato della plastica. Nello specifico sono stati utilizzati sfalci di piante di pomodoro post-raccolto.

La prima parte del lavoro si è concentrata nell'ottimizzazione della reazione di idrolisi acida con tecnologia microonde e del successivo processo di neutralizzazione della soluzione di monosaccaridi. A tale scopo abbiamo svolto delle prove di reazione, così da valutare l'utilizzo di una resina basica debole per ottenere un prodotto neutro, utilizzabile in fase di fermentazione.

Con le prime aliquote di monosaccaridi abbiamo allestito delle fermentazioni in coltura pura di *Leuconostoc sp*, batterio lattico PHA produttore, in provetta, per valutare la crescita microbica.

Infine, con i risultati ottenuti dalle prove preliminari abbiamo previsto uno scale-up dei due processi. La produzione dei monosaccaridi è avvenuta sfruttando tutta la capacità del reattore a microonde (5 volte il volume delle precedenti reazioni). Una volta ottenuta la quantità necessaria di monosaccaridi abbiamo allestito una prova di fermentazione, sempre in coltura pura di *Leuconostoc*, valutando l'accumulo di PHA con una fermentazione in beuta agitata da 500 ml.



# Capitolo 3

## Materiali e metodi

### 3.1 Produzione monosaccaridi (MSC)

#### 3.1.1 Reazione di idrolisi acida in reattore a microonde

La biomassa lignocellulosica residuale da cui sono stati ottenuti i monosaccaridi è costituita da piante di pomodoro dopo la raccolta (PHTP, *post harvest tomato plant*). Prima di essere utilizzata, la biomassa è stata crio-macinata con un mulino a lame (mulino SF75, Cimma Spa, Pavia).

La reazione avviene in acido cloridrico (HCl 1M) e condotta sotto pressione di azoto (N<sub>2</sub>). Le condizioni ottimali per la produzione di monosaccaridi sono: temperatura di 150 °C, concentrazione HCl 1 mol/L, pressione 40 bar e tempo di reazione di 2 minuti. Il rapporto solido/liquido è di 1:10 w/v [33].

Al termine della reazione il grezzo viene filtrato sotto vuoto su carta in un imbuto Buchner. Il residuo inconvertito viene sciacquato con acqua deionizzata, per recuperare tutti i prodotti di reazione, in seguito essiccato e pesato così da valutare la conversione totale.

#### 3.1.2 Neutralizzazione con resina basica debole

Il filtrato contiene ancora l'HCl in cui si è svolta la reazione e necessita di essere neutralizzato. In fase di fermentazione, i batteri sono sensibili al cloro, da qui la necessità di eliminare i composti clorurati con una resina a scambio ionico.

Si è optato per una resina a scambio anionico basica debole, in grado di trattenere gli acidi. Il gruppo funzionale di questa resina è una base, un'ammina terziaria, che rimuove gli acidi organici dalla soluzione, neutralizzandola, senza rilasciare sali nella stessa. Una resina di questo tipo oltre agli acidi minerali, trattiene anche gli acidi organici che si formano durante la reazione. Una volta neutralizzata, la soluzione contiene una parte organica, i monosaccaridi, e una inorganica salina, idrosolubile, propria della biomassa di partenza.

La resina utilizzata è Dow Amberlite™IRA96 impaccata in una colonna dotata di setto poroso. Tale resina ha una capacità di scambio di 1.25 eq/L e un flusso di servizio di 5-40 volumi di letto all'ora. Prima dell'utilizzo è necessario lasciare la resina in acqua deionizzata per permetterne il rigonfiamento e l'apertura delle macroporosità. Nelle neutralizzazioni effettuate si è deciso di mantenere il flusso di servizio a circa 5-8 volumi di letto all'ora così da assicurare uno scambio completo. Come rigenerante è stata utilizzata una soluzione di NaOH 1M, assicurando un tempo di contatto minimo con la resina di 30 minuti. I volumi di resina e di rigenerante utilizzati sono calcolati e aumentati del 25% cautelativamente. In seguito alla rigenerazione con soda si fa passare in colonna acqua deionizzata, per eliminare il rigenerante in eccesso, nelle seguenti modalità: 2 volumi di letto con lo stesso flusso della soluzione rigenerante e 4-8 volumi di letto al flusso di servizio.

### 3.1.3 Liofilizzazione

La soluzione è stata quindi liofilizzata così da ottenere un prodotto solido. La liofilizzazione consta in una prima fase di congelamento rapido in azoto liquido e in una successiva fase di sublimazione del solvente sottovuoto, con l'ausilio di una pompa che genera un vuoto spinto (Liofilizzatore Telstar Lyotest).

L'ottenimento di un prodotto solido permette di pesarlo e di calcolare quindi una resa di reazione totale, nonché di svolgere analisi di caratterizzazione e il suo successivo utilizzo nella preparazione del medium di fermentazione.

## 3.2 Allestimento fermentazioni

### 3.2.1 Ceppo batterico

Il batterio PHA produttore è *Leuconostoc sp.*, isolato da un consorzio microbico arricchito proveniente da un impianto a fanghi attivi per il trattamento delle acque reflue dell'industria casearia [28]. I batteri del genere *Leuconostoc* appartengono alla classe dei LAB (Lactic Acid Bacteria), sono Gram+, non mobili, non sporigeni, anaerobi facoltativi. La temperatura ottimale di crescita è 20 - 30 °C (mesofili), il pH ottimale è 5.5 - 6.5, sono organismi GRAS (*generally regarded as safe*) [38]. Il ceppo è propagato in terreno MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) e stoccato a -20 °C in glicerolo (50% MRS 50% glicerolo).

### 3.2.2 Terreni di coltura

#### MRS - Terreno di espansione/precoltura

La precoltura è effettuata in terreno MRS, elettivo per *Leuconostoc* [38], la cui composizione viene riportata in tabella 3.1. Tale terreno è specifico per i lattobacilli.

Tabella 3.1. Composizione terreno MRS

Componente	Concentrazione [g/L]
Peptone	10
Estratto di lievito	5
Estratto di carne	10
Glucosio	20
Fosfato di potassio	2
Acetato di sodio	5
Solfato di magnesio	0.2
Solfato di manganese	0.05
Tween 80	1.08
Citrato di ammonio	2
pH = 6.4 ± 0.2	

La precoltura in MRS è allestita in bottiglie di vetro da 100 ml con il tappo a vite contenente 50 ml di MRS, agitate in termostato a 200 rpm e 30 °C. L'inoculo della precoltura è avvenuto sia da colonie su piastre di MRS agarizzato cresciute per 24 ore, sia da aliquote di colture cresciute in MRS stoccate a -20 °C in glicerolo (1:1 v/v), con risultati analoghi.

### Khardenavis - Terreno di coltura

Il terreno utilizzato per l'allestimento delle colture è composto dalla parte salina del terreno Khardenavis addizionato dei monosaccaridi, alla medesima concentrazione (20 g/L) della fonte di carbonio originale, così da rispettare il rapporto C/N. Nella formulazione originale del Khardenavis [39], riportata in tabella 3.2, la fonte di carbonio è acido acetico. Questo medium è selettivo nei confronti dei batteri PHA-produttori e presenta un rapporto C/N pari a 50, indicato in letteratura [40] come ottimale per l'accumulo di PHA.

Inoltre, è stato addizionato un sistema tampone  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  a pH 7, poiché si è notato che durante la crescita si ha una rapida diminuzione del pH che inibisce la stessa, dovuta al fatto che *Leuconostoc* produce acidi organici quali il lattato e l'acetato. La composizione del terreno finale è riportata in tabella 3.3 e in rosso sono evidenziate le modifiche rispetto alla formulazione originale.

**Preparazione terreno:** Il terreno così formulato, come da tabella 3.3, è realizzato seguendo alcuni accorgimenti, dovuti alla scelta di non sterilizzare i monosaccaridi con un trattamento termico per evitarne la degradazione. La frazione salina del terreno Khardenavis viene preparata ad una concentrazione doppia e sterilizzata in autoclave, al termine del ciclo si forma un precipitato (figura 3.1) e la

Tabella 3.2. Composizione del terreno *Khardenavis*

Componente	Concentrazione [g/L]
Monosaccaridi	20
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	0.754
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20.201
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.821
MgSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	0.1
Elementi in tracce	1 ml/L

pH = 7.0 - 7.2

Composizione elementi in tracce

Componente	Concentrazione [g/L]
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	25
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4.06
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.40
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.79
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	73.4

soluzione viene prelevata facendo attenzione a non smuovere il corpo di fondo. I monosaccaridi sono sciolti in acqua deionizzata ad una concentrazione di 50 g/L e sterilizzati per filtrazione su filtri, per siringhe, a membrana in acetato di cellulosa (porosità 0.20 µm). Quando si pesano i monosaccaridi bisogna considerare solo la frazione organica della miscela dopo la liofilizzazione. Successivamente le due soluzioni vengono unite in rapporto 1:1 e si nota un corposo precipitato che viene eliminato centrifugando in provette Falcon sterili da 50 ml, a 4000 rpm per 10 minuti, e raccogliendo il surnatante (figura 3.2). In questa maniera, una volta che viene aggiunto l'inoculo (10 % del volume) le componenti del terreno raggiungono la concentrazione voluta.

### 3.2.3 Fermentazioni in coltura pura

Queste prove sono condotte in modalità *batch* alla temperatura di 30 °C in agitato (su piastra oscillante a 180 rpm), in coltura pura di *Leuconostoc*; quest'ultima condizione comporta uno step aggiuntivo di sterilizzazione dei terreni e dei materiali utilizzati. La coltura è avvenuta in terreno sintetico *Khardenavis* opportunamente modificato per introdurre come fonte di carbonio i monosaccaridi. L'inoculo è stato prelevato da una precoltura cresciuta in terreno liquido MRS per 7 ore e standardizzato (10 % v/v e 0.8 < O.D.<sub>620</sub> < 1).

Tabella 3.3. Composizione del terreno Khardenavis con monosaccaridi e sistema tampone 0,2 M

Componente	Concentrazione [g/L]
Monosaccaridi	20
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	0.754
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20.201
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.821
MgSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	0.1
Elementi in tracce (tabella 3.2)	1 ml/L

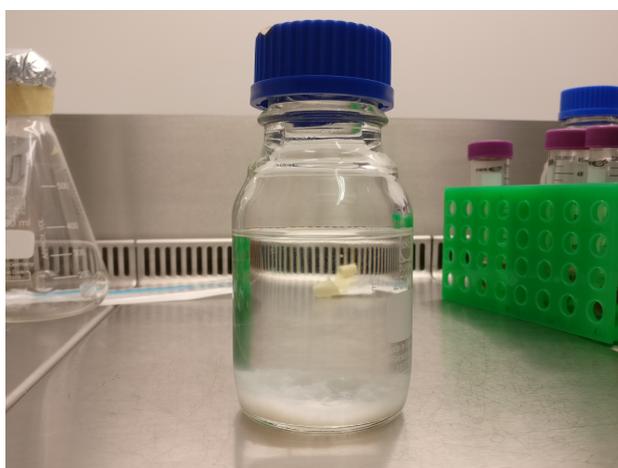


Figura 3.1. Componente salina di Khardenavis con precipitato dopo sterilizzazione

Prima di valutare l'accumulo di PHA nella coltura batterica con monosaccaridi si sono svolte varie prove di fermentazione, utilizzando come fonte di carbonio saccarosio, alla medesima concentrazione di 20 g/L. Lo scopo di queste prove è stato duplice: migliorare il terreno di coltura per limitare le variazioni di pH e valutare quale sia il volume minimo migliore per la crescita, in modo da poter testare il medium con i monosaccaridi. Tali prove sono effettuate in diverse configurazioni sperimentali:

1. Beuta Erlenmeyer con frangiflutti da 500 ml con 200 ml di terreno, agitata in piastra orbitale (180 rpm).
2. Beuta Erlenmeyer da 50 ml con 10 ml di terreno, agitata in piastra orbitale (180 rpm).
3. Provetta da 12 ml con 5 ml di terreno, agitata in piastra orbitale (180 rpm).



Figura 3.2. Terreno Khardenavis con monosaccaridi prima (destra) e dopo centrifugazione

4. Provetta da 12 ml con 5 ml di terreno, agitata su ruota.
5. Multiwell a 6 pozzetti da 1.5 ml, agitata in piastra orbitale (180 rpm).

In seguito, si è scelta la modalità di fermentazione migliore e si è valutata la crescita di *Leuconostoc* nel terreno con i monosaccaridi prima con la provetta da 12 ml agitata su ruota, in seguito nella beuta da 500 ml dotata di frangiflutti. Al termine della prova si è anche stimata la quantità di PHA dopo un tempo di fermentazione di 48 ore.

### 3.2.4 Strumentazione

#### Autoclave

I terreni colturali e la strumentazione impiegata necessitano di essere sterilizzati quando le fermentazioni sono svolte in coltura pura. La sterilizzazione avviene in un autoclave Fedegari Autoklaven AG FVG3, con un ciclo di 20 minuti a 121 °C e 2 bar.

#### Termostato

Le colture liquide sono incubate alle condizioni di 30 °C in agitazione (180 rpm) in un termostato, dotato di piastra orbitale, Thermo Scientific MaxQ 6000. Le colture

solide in piastre Petri sono poste nel termostato alle stesse condizioni, senza però agitazione.

### 3.3 Analisi e caratterizzazioni chimico-fisiche

#### 3.3.1 Caratterizzazione monosaccaridi

##### Analisi gascromatografica-spettrometrica di massa (GC-MS)

La caratterizzazione dei monosaccaridi avviene attraverso l'analisi qualitativa dello spettro GC-MS. Le analisi sono state condotte con GC Agilent 6890 (Agilent Technologies - USA), collegato ad un detector di massa Agilent Network 5973, utilizzando una colonna HP-5 (lunghezza colonna capillare 30 m, diametro interno 0,25 mm e spessore film 0.25  $\mu\text{m}$ ). Prima dell'iniezione del campione nello strumento è necessaria una derivatizzazione dei monosaccaridi, così da aumentarne la volatilità. La derivatizzazione avviene in piridina con un agente sililante, il BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) nelle seguenti condizioni: 10 mg di campione vengono solubilizzati in 1 ml di piridina con 300  $\mu\text{L}$  di BSTFA, la soluzione è lasciata a reagire per 45 minuti a 60 °C in agitazione [33]. Terminata la reazione il composto viene filtrato con un filtro a membrana per siringhe (porosità 0,45  $\mu\text{m}$ ) e inniettato nel GC-MS. Il programma di temperatura prevede una rampa di 50 °C gradi al minuto fino alla temperatura di 300 °C gradi, con temperatura di iniezione di 50 °C e temperatura del detector di 280 °C

##### Analisi ponderale

Per valutare la frazione di organico della miscela solida di monosaccaridi, vengono effettuate analisi gravimetriche sul campione disidratato e dopo aver bruciato la frazione organica.

La prova consiste in una prima pesata di un'aliquota di campione che in seguito viene posta in muffola a 100 °C, all'interno di un crogiolo di ceramica, e lasciata per una notte. Una volta valutata la quantità di acqua nel campione, questo viene mantenuto ad una temperatura di 650 °C per 4 ore. Il crogiolo è fatto raffreddare in essiccatore e al termine si può valutare la quantità di inorganico, per differenza con il peso del campione secco. Così, rapportando i valori al peso del campione, otteniamo la percentuale di acqua, inorganico e organico.

#### 3.3.2 Determinazione densità ottica e pH delle colture

La densità ottica dei campioni estratti dalle colture di fermentazione serve per valutare l'andamento della crescita batterica. La lettura dell'assorbanza viene effettuata ad una lunghezza d'onda di 620 nm (OD 620), in cui si ha il valore massimo di assorbimento delle cellule.

La densità ottica è stata valutata tramite uno spettrofotometro PerkinElmer Photodiode Array Lambda 465.

Il pH è stato misurato con un pHmetro WTW inoLab pH730

### 3.3.3 Determinazione concentrazione biomassa

Per quantificare la biomassa ottenuta in fermentazione è stato determinato il peso secco; a tale scopo, il brodo di coltura è centrifugato a 15000 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 4 °C (Centrifuga Centrikon T-24k (Kontron Instruments)).

Dopodiché il surnatante viene rimosso e la biomassa risospesa in acqua deionizzata con successiva fase di centrifugazione nelle condizioni precedenti, il lavaggio del precipitato viene ripetuto una seconda volta per eliminare i residui del substrato di crescita e dei metaboliti.

Successivamente la biomassa è posta in stufa all'interno di una beuta da 50 ml alla temperatura di 65 °C fino alla completa evaporazione dell'acqua in eccesso. La temperatura relativamente bassa garantisce una rapida evaporazione dell'acqua senza degradazione dei PHA prodotti.

### 3.3.4 Estrazione dei poliidrossialcanoati (PHA)

I PHA vengono estratti dalla biomassa e recuperati tramite un'estrazione classica con solventi immiscibili, quali ipoclorito di sodio (NaOCl) e cloroformio (CHCl<sub>3</sub>) [41] [42].

La procedura per l'estrazione prevede l'utilizzo di una soluzione 1:1 (v/v) dei due solventi e si svolge nelle seguenti fasi:

1. Introduzione di 10 ml di ipoclorito di sodio in una beuta da 50 ml, contenente la biomassa, facendo in modo di staccarla dalle pareti della beuta.
2. Introduzione di 10 ml di cloroformio.
3. La beuta è posta sull'agitatore magnetico, previa chiusura con tappo di vetro, per 90 minuti a 30 °C. Questa è la fase di estrazione principale in cui i reagenti e l'agitazione permettono la lisi delle cellule e il passaggio dei PHA nella fase organica.
4. Al termine della fase di estrazione, il contenuto della beuta viene trasferito in una provetta Falcon da 50 ml per permetterne la centrifugazione a 3600 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Si formeranno 3 fasi distinguibili: nel fondo si troverà il cloroformio, a maggiore densità, con disciolti i PHA e nella parte superiore la fase di ipoclorito, a dividere le due fasi un disco di materiale cellulare (figura 3.3).

5. Con una pipetta Pasteur di vetro si recupera la fase cloroformio, facendo attenzione a inserirla vicino alla parete del tubo, così da evitare di prelevare del materiale cellulare quando si perfora il disco all'interfaccia tra le fasi.
6. La soluzione di cloroformio viene filtrata in un filtro in teflon con porosità 0,45  $\mu\text{m}$ , con l'ausilio di una siringa di vetro.
7. Il filtrato è messo ad evaporare in una provetta. Per velocizzare l'evaporazione del  $\text{CHCl}_3$  si utilizza un flusso di azoto canalizzato all'interno della provetta.
8. Nella provetta Falcon, contenente il residuo cellulare e l'ipoclorito, si introducono 10 ml di  $\text{CHCl}_3$  e si miscelano le due fasi con l'aiuto di un vortex.
9. Le fasi 4-7 vengono ripetute altre due volte per garantire un recupero completo dei PHA.
10. La quantità di polimero viene determinata gravimetricamente.

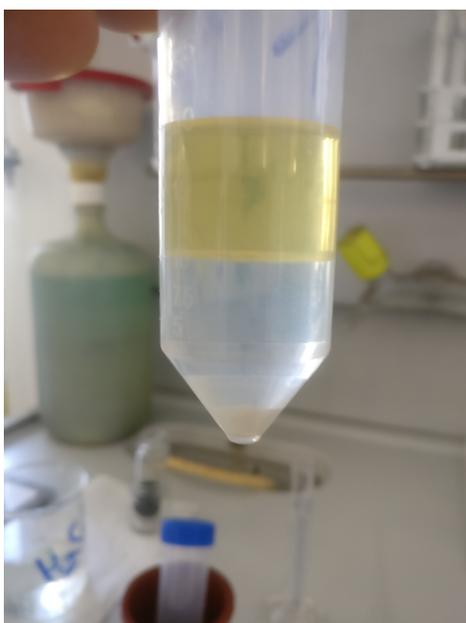


Figura 3.3. Provetta Falcon contenente le tre fasi separate

### 3.3.5 Caratterizzazione dei PHA

Per valutare la qualità del polimero estratto si sono svolte due analisi: una di spettroscopia a risonanza magnetica nucleare e l'altra di spettroscopia infrarossa. Gli spettri ottenuti sono poi stati confrontati con gli spettri dei campioni commerciali e di quelli trovati in letteratura.

### **Analisi $^1\text{H-NMR}$ (Proton Nuclear Magnetic Resonance)**

L'analisi NMR è svolta con uno strumento Jeol, 600MHz. Il campione di polimero è stato disciolto in cloroformio deuterato ( $\text{CDCl}_3$ ) e analizzato (1200 scansioni).

### **Analisi FT-IR (Fourier Transformation-InfraRed)**

L'analisi IR è avvenuta tramite il metodo del *film casting*, in cui il polimero sciolto nel cloroformio viene depositato su di una lamina di silicio trasparente all'infrarosso. Evaporato il solvente, l'analisi è condotta con uno spettrometro Perkin Elmer BX FT-IR System.

# Capitolo 4

## Risultati e discussione

### 4.1 Curva di crescita di *Leuconostoc* in MRS

Prima di effettuare le prove di fermentazione è stata misurata la curva di crescita di *Leuconostoc* in MRS, terreno in cui è stata effettuata la precoltura. La misura serve per poter standardizzare l'inoculo e per prendere la precoltura in fase esponenziale di crescita così da evitare che ci sia un allungamento della fase di latenza una volta effettuato l'inoculo nel terreno di fermentazione.

La prova è stata svolta in bottiglie con tappo a vite da 100 ml, nelle condizioni operative descritte in Materiali e metodi. In figura 4.1 sono rappresentate le curve di assorbanza e pH in MRS. La crescita è piuttosto rapida, altresì evidenziata da una diminuzione del pH, infatti già ad un tempo di 15 ore viene raggiunta la fase stazionaria, con un OD 620 di 2.72 e un pH di 4.4.

La fase di precoltura viene interrotta dopo 7 ore, quando si trova in fase esponenziale, il campione viene quindi standardizzato ( $0.8 < O.D20 < 1$ ) e usato come inoculo per le fermentazioni (10 % v/v).

### 4.2 Prove di fermentazione di *Leuconostoc* in *Khardenavis* con saccarosio

#### 4.2.1 Ottimizzazione terreno

Prima di allestire la fermentazione con i monosaccaridi è stato necessario ottimizzare il terreno *Khardenavis*, in quanto si è notato che nelle prime fasi di crescita si ha una rapida diminuzione del pH che inibisce un'ulteriore crescita. Per questo motivo è stato testato un sistema tampone composto da  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , scegliendo una concentrazione del tampone 0.2 molare, per non aumentare troppo il contenuto di sali nel terreno. Come fonte di carbonio si è scelto di utilizzare saccarosio invece dell'acido acetico, componente carbonioso del terreno originale, perché più simile ai

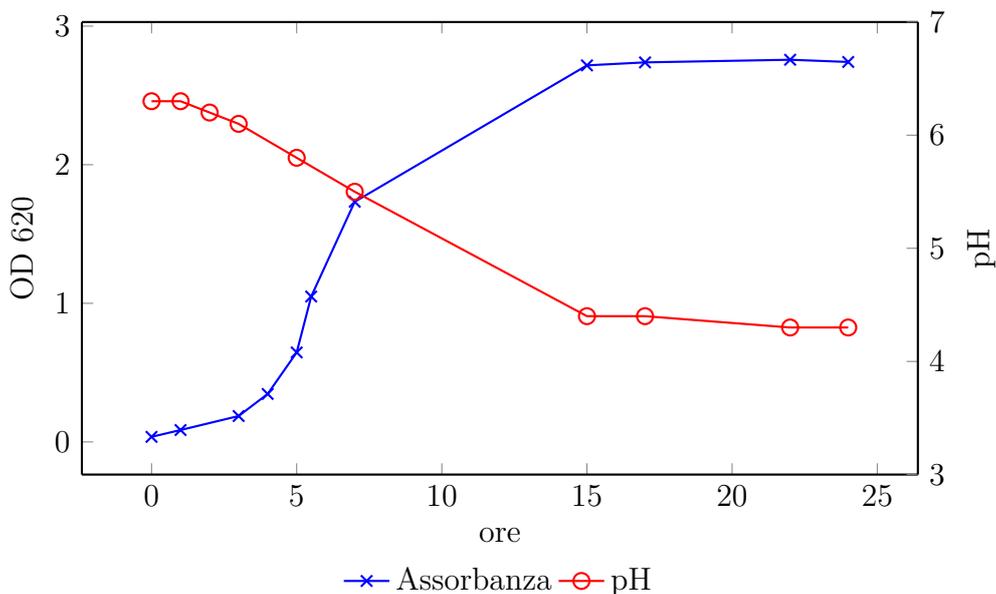


Figura 4.1. Curva di assorbanza e pH di *Leuconostoc* su MRS

monosaccaridi; inoltre *Leuconostoc* presenta una buona crescita con vari tipologie di mono e disaccaridi [43] [44].

Le prove per il confronto tra i terreni, con e senza sistema tampone, si sono svolte in beute con frangiflutti da 500 ml (200 ml di terreno). Come si nota in figura 4.2, l'aggiunta di un sistema tampone migliora la crescita, confrontabile con quella in MRS, terreno di precoltura usato come confronto. Ad evidenziare ciò si veda come il pH, pur diminuendo, indice di crescita di *Leuconostoc*, rimanga al di sopra di una soglia di inibizione, grazie all'utilizzo del sistema tampone. Nella coltura con saccarosio senza il tampone si nota che il pH diminuisce più rapidamente, rallentando la crescita; infatti la fase stazionaria viene raggiunta a circa 40 ore, valore ben maggiore rispetto al tempo che impiega a raggiungere la fase stazionaria l'altra coltura (15 ore). Anche i valore di assorbanza evidenziano che la diminuzione del pH influisce sulla crescita: al termine della prova (65 ore) la beuta con il sistema tampone presenta un valore di OD 620 di 2.31 e un pH di 6.4, invece la beuta senza tampone presenta un OD 620 di 1.19 con un pH di 3.7.

#### 4.2.2 Prove di crescita preliminari

Una volta trovata la composizione del terreno Khardenavis ottimale per la crescita di *Leuconostoc*, si è passati a testare diverse modalità di fermentazione. In particolare si aveva la necessità di usare piccoli volumi di coltura, dato che i primi quantitativi di monosaccaridi prodotti erano ridotti (circa 1.5 g).

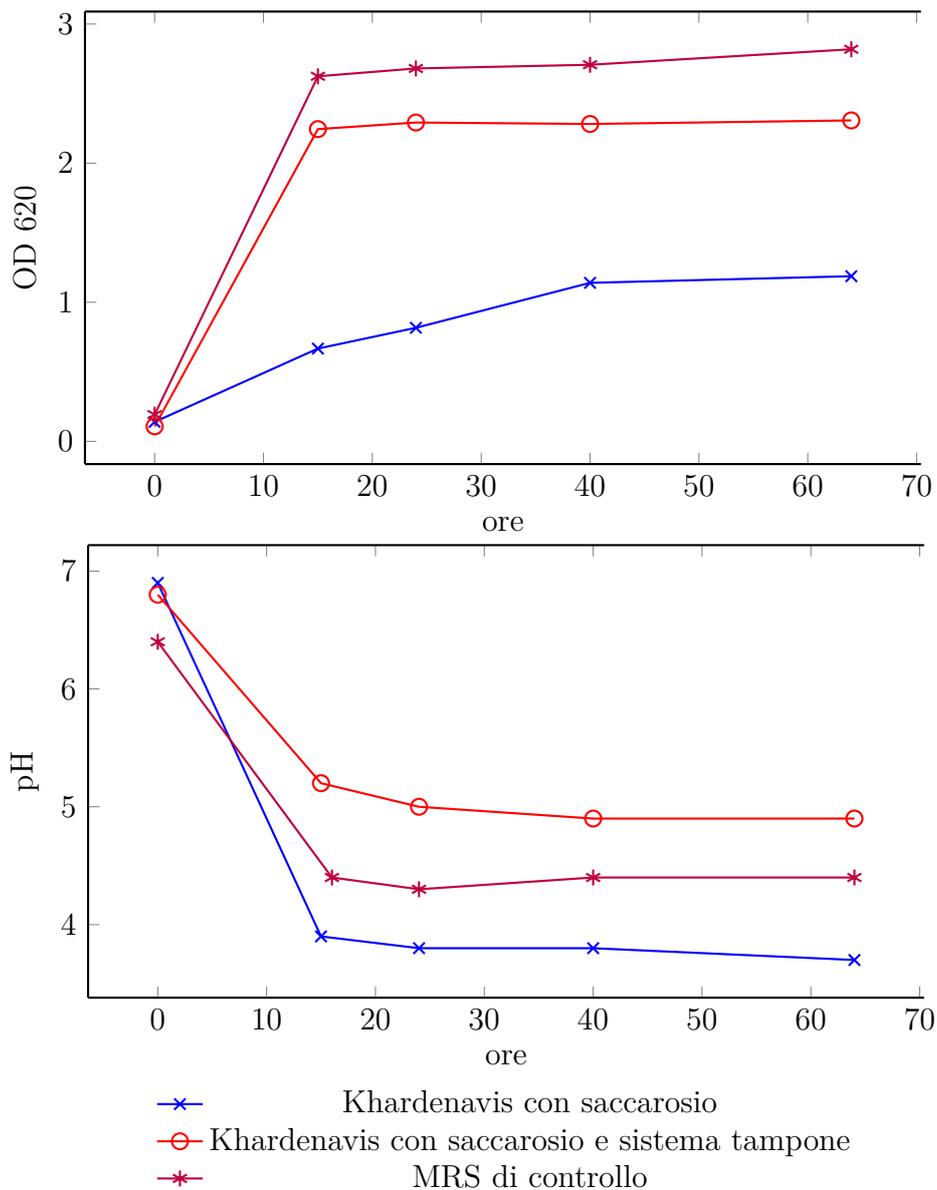


Figura 4.2. Confronto delle curve di assorbanza e pH delle colture di *Leuconostoc* su *Khardenavis* con saccarosio con e senza sistema tampone

Nella figura 4.3 si mostra come variano assorbanza e pH in terreno *Khardenavis* utilizzando come fonte di carbonio saccarosio. La beuta da 500 ml con i frangiflutti presenta una crescita migliore degli altri sistemi, la fase esponenziale termina a circa 15 ore con un valore di OD 620 di 2.31. Nelle configurazioni con volumi più piccoli, di interesse per testare i monosaccaridi, si evidenzia una crescita simile tra i vari sistemi, il valore di OD 620 raggiunto nella fase stazionaria (circa 1.6) è minore

di quello ottenuto nella beuta da 500 ml dotata di frangiflutti, questo a evidenziare quanto un'opportuna agitazione sia un fattore importante per la crescita. Solo per la coltura nelle provette da 12 ml poste in agitazione sulla piastra orbitale del termostato si riscontra una crescita più lenta, il valore di OD 620 raggiunto nella fase stazionaria è di 1.4 ad un tempo di 40 ore, anche il pH subisce una variazione minore, rimanendo sopra il valore di 6 anche a 64 ore, cioè al termine della prova.

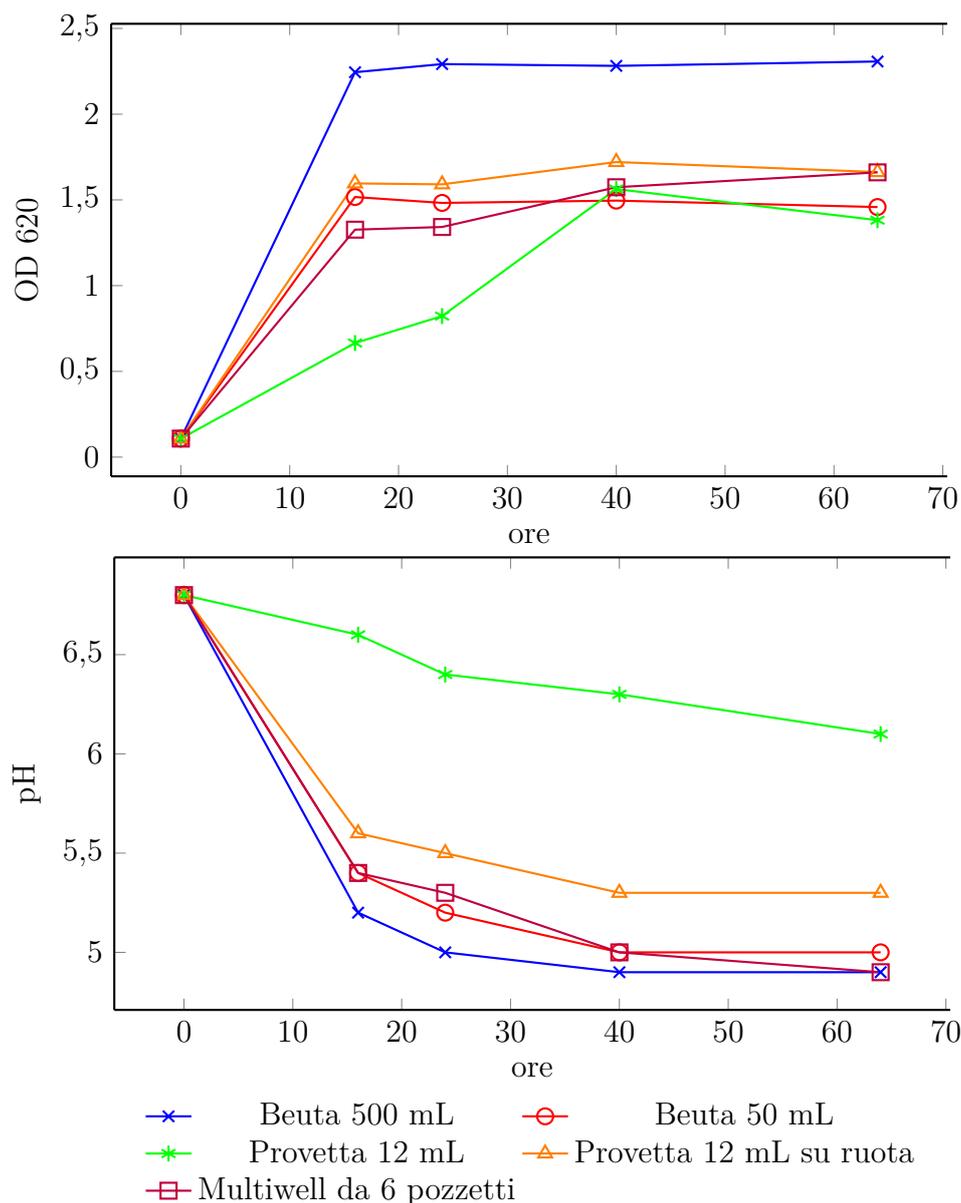


Figura 4.3. Curva di assorbanza e pH delle colture di *Leuconostoc* su Khardenavis con saccarosio e sistema tampone in diverse configurazioni

I risultati presentati evidenziano come uno dei fattori più importanti, a parità di condizioni, è l'agitazione. Le provette da 12 ml sono strette e lunghe e quando sono poste nella piastra orbitale a 180 rpm, sia in piedi che sdraiate, non permettono una buona agitazione. Un discorso analogo si può effettuare con la beuta da 50 ml e la multiwell, il volume esiguo e le dimensioni ridotte del sistema non permettono un'agitazione ottimale a 180 rpm, nella piastra orbitale del termostato. Invece per quanto riguarda le provette agitate su ruota (circa 30 rpm), l'agitazione è garantita dal capovolgimento della provetta stessa, per questo per testare le prime aliquote di monosaccaridi si è scelto di allestire la fermentazione in provette da 12 ml agitate su ruota e mantenute a temperatura ambiente.

### 4.3 Ottimizzazione della neutralizzazione del grezzo di reazione su resina

In questa fase si è analizzato quale fosse il migliore work up per il trattamento del grezzo di reazione con l'utilizzo della resina anionica. Le configurazioni sono due: neutralizzazione in beker agitato o in colonna impaccata. Di seguito sono riportate le prove di reazione e i risultati nelle varie modalità di neutralizzazione: i valori di conversione, la resa dei monosaccaridi, i dati ottenuti dall'analisi ponderale, e il cromatogramma GC (I monosaccaridi individuati nel cromatogramma sono riportati solo per la prima reazione, in Tabella 4.2. Poiché si sono ottenuti risultati del tutto analoghi nelle altre reazioni, le relative tabelle non sono state riportate). Per il calcolo della conversione, al termine della reazione, il residuo viene lasciato una notte in essiccatore e pesato.

$$Conversione = \frac{Residuo[g] - PHTP[g]}{PHTP[g]}$$

$$Resa = \frac{MSC[g]}{PHTP[g]}$$

Le reazioni sono state svolte nelle modalità indicate in Materiali e metodi e la quantità di PHTP utilizzata è di 3 g con 30 ml di HCl (1 vial di reattore SynthWave). La quantità di resina necessaria per neutralizzare è di 30 ml (coefficiente cautelativo di 1.25).

#### 4.3.1 Prima reazione - neutralizzazione in beker agitato

In questa configurazione il grezzo di reazione è posto in un beker insieme alla resina e agitato con un ancoretta magnetica per 30 minuti. La problematica principale di questo passaggio è la perdita di efficienza della resina dovuta al degrado strutturale della macroporosità della stessa. Questo impedisce il riutilizzo della resina rendendo il processo sconveniente, per quanto la neutralizzazione sia efficace.

Tabella 4.1. Conversione e resa della prima reazione e analisi ponderale monosaccaridi

Conversione	MSC	Resa	Analisi ponderale		
47.7 %	1.32 g	44 %	H <sub>2</sub> O	Ceneri	Organico
			12.7 %	26 %	61.3 %

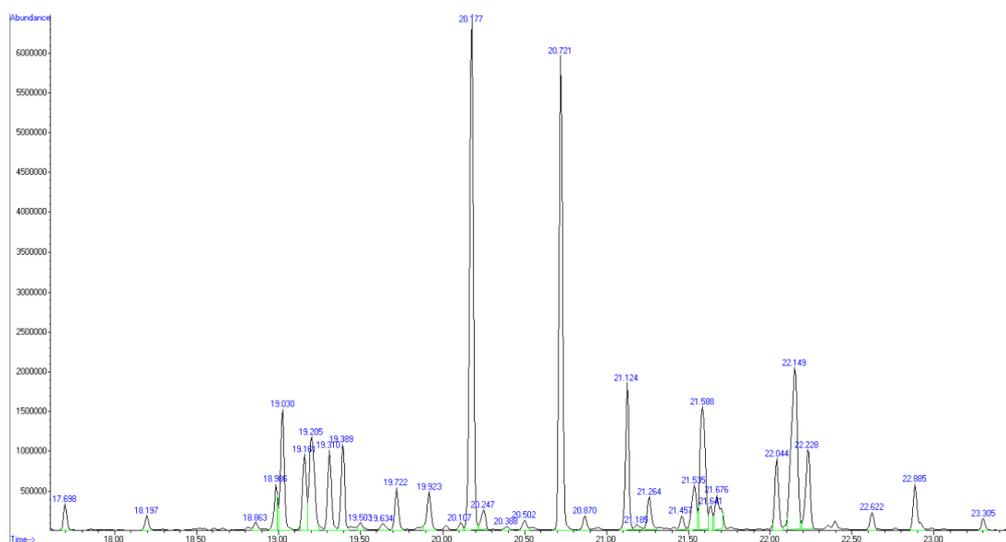


Figura 4.4. Cromatogramma GC dei monosaccaridi della prima reazione

Tabella 4.2. Monosaccaridi individuati nel cromatogramma di Figura 4.4

Tempo	Molecola	Tempo	Molecola
18.197	Fucopiranosio	20.87	Xilopiranosio
18.863	Lixosio	21.124	Arabinofuranosio
18.986	Ribofuranosio	21.264	Allofuranosio
19.03	Arabinopiranosio	21.535	Galctofuranosio
19.161	Mannosio	21.588	Lixopiranosio
19.25	Arabinofuranosio	21.676	Lixofuranosio
19.31	Lixofuranosio	22.044	Glucopiranosio
19.389	Arabinosio	22.149	Arabinopiranosio
19.722	Ribofuranosio	22.28	Xilopiranosio
19.923	Rhamnopiranosio	22.622	Talofuranosio
20.177	Xilosio	22.885	Glucosio
20.721	Lixopiranosio		

### 4.3.2 Seconda reazione - neutralizzazione con singolo passaggio in colonna impaccata

Per sfruttare al meglio le capacità della resina, essa viene utilizzata impaccata in colonna. Il grezzo di reazione, dopo la filtrazione, viene fatto eluire attraverso la resina, previa rigenerazione e risciacquo della stessa, con le modalità descritte nel capitolo Materiali e metodi. Al termine del passaggio in colonna si fanno passare ancora 1-2 volumi di letto di acqua deionizzata, così da recuperare tutti i monosaccaridi.

La soluzione così ottenuta risulta basica (pH circa 10), nonostante il passaggio su resina dovrebbe portare ad una soluzione neutra. Una spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere dovuta al fatto che durante la fase di rigenerazione e la successiva di risciacquo si creino dei percorsi preferenziali in cui l'NaOH rimane intrappolato; in seguito, quando la soluzione da neutralizzare viene iniettata in colonna, la soda intrappolata viene rilasciata. A sostenere questa ipotesi si evidenzia che soltanto il primo eluato (circa il 30 % del volume) che esce dalla colonna risulta basico, il restante è neutro. I risultati riportati di seguito fanno riferimento a l'eluato totale, complessivamente basico.

Tabella 4.3. Conversione e resa della seconda reazione e analisi ponderale monosaccaridi

Conversione	MSC	Resa	Analisi ponderale		
40 %	1.41 g	47 %	H <sub>2</sub> O	Ceneri	Organico
			13.5 %	22.6 %	63.8 %

### 4.3.3 Terza reazione - neutralizzazione con doppio passaggio in colonna impaccata

Il prodotto ottenuto dalla terza reazione è neutralizzato nelle stesse modalità della seconda reazione, con la sola differenza che dopo il primo passaggio in colonna, il primo eluito basico è subito ripassato sulla resina. Alla fine del processo la colonna viene lavata con acqua deionizzata (1 - 2 volumi di colonna), sempre per recuperare tutti i monosaccaridi. In questa maniera si ottiene una soluzione completamente neutra.

### 4.3.4 Confronto tra le metodologie di neutralizzazione

Come si evince dalle Tabelle 4.1, 4.3 e 4.4 i valori di conversione e resa sono simili tra loro; anche le analisi ponderali mostrano valori di ceneri e organico comparabili. Non si riscontrano sostanziali differenze nemmeno nel confronto dei tre

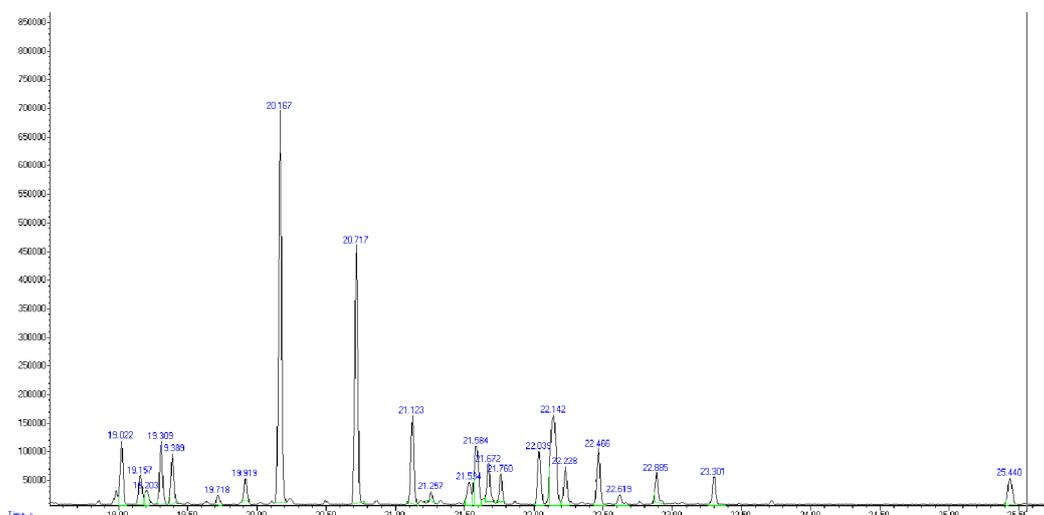


Figura 4.5. Cromatogramma GC dei monosaccaridi della seconda reazione

Tabella 4.4. Conversione e resa della terza reazione e analisi ponderale monosaccaridi

Conversione	MSC	Resa	Analisi ponderale		
40 %	1.33 g	44 %	H <sub>2</sub> O	Ceneri	Organico
			14.2 %	29.2 %	56.6 %

cromatogrammi nelle Figure 4.4, 4.5 e 4.6.

La quantità di monosaccaridi prodotti in questa prima fase sono sufficienti per la preparazione di terreno, così da allestire le prove di fermentazione nelle provette da 12 ml, agitate su ruota a temperatura ambiente.

Data la somiglianza dei campioni di monosaccaridi ottenuti dalla seconda e dalla terza reazione, per scegliere quale sia il work-up migliore si è andati a valutare la crescita di *Leuconostoc* in un medium costituito da monosaccaridi, ottenuti nelle varie prove, come fonte di carbonio.

#### 4.4 Prova di fermentazione di *Leuconostoc* in Khar-denavis con monosaccaridi in provetta

Con i quantitativi di monosaccaridi prodotti nelle prime tre reazioni si sono svolte le prove di fermentazione nelle provette da 12 ml agitate su ruota (5 ml di terreno) che, come detto in precedenza, presentavano una crescita migliore rispetto alle altre configurazioni di simile volume. La preparazione del terreno e le condizioni di crescita sono descritte in Materiali e metodi.

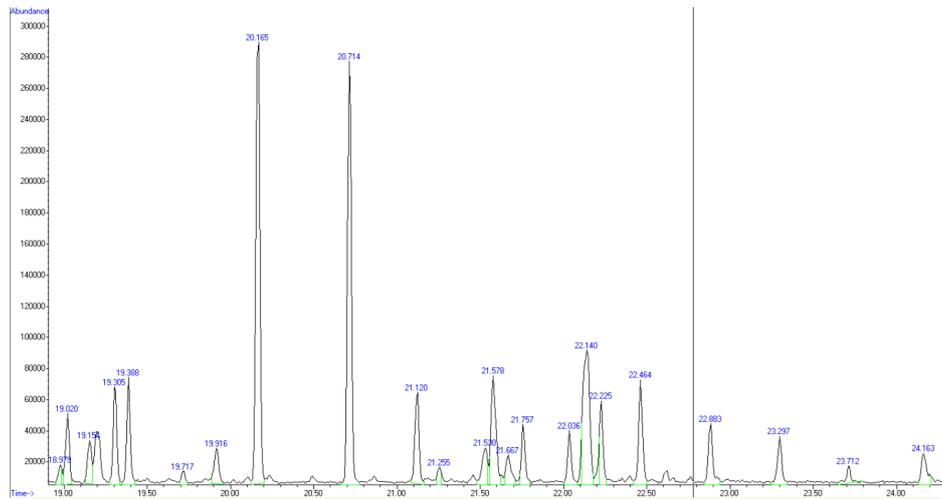


Figura 4.6. Cromatogramma GC dei monosaccaridi della terza reazione

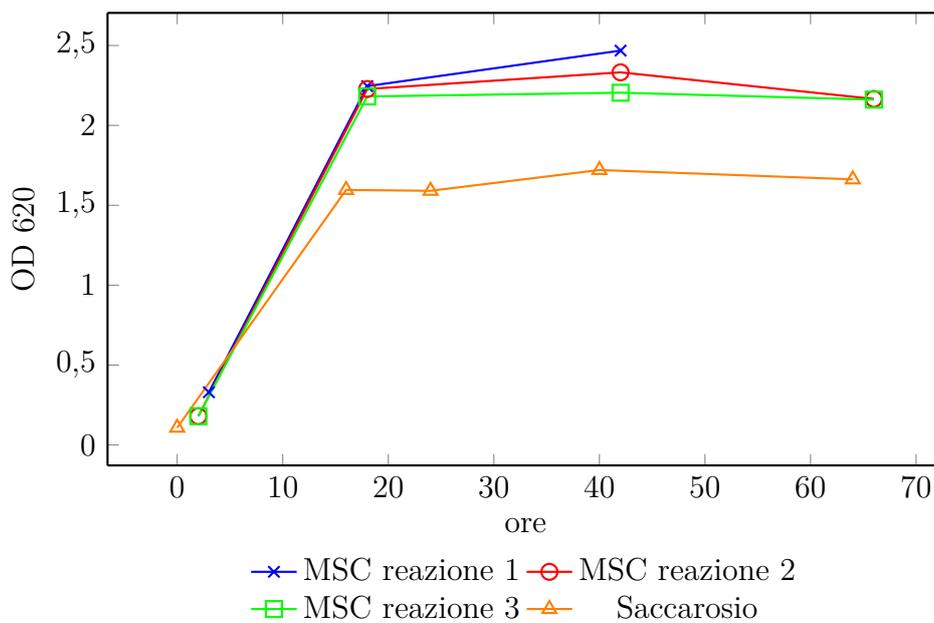


Figura 4.7. Curva di assorbanza di *Leuconostoc* su *Khardenavis* con monosaccaridi, prodotti con diversi *work-up* di neutralizzazione.

In Figura 4.7 si mostrano i valori di assorbanza delle colture, fino a circa 70 ore. Come si evince dal grafico, le colture con i monosaccaridi come fonte di carbonio presentano una buona crescita, superiore anche di quella sul terreno con saccarosio (curva arancione, ripresa da Figura 4.3). La coltura con i monosaccaridi provenienti dalla prima reazione presenta valori di OD 620 e pH simili alle altre colture con

monosaccaridi. Tuttavia si è deciso di non produrre ulteriori monosaccaridi con il work-up della prima reazione, in quanto la neutralizzazione in beker agitato non permette il riutilizzo della resina. Per questo si è deciso di non proseguire con la caratterizzazione del prodotto di fermentazione proveniente dalla coltura con i monosaccaridi provenienti dalla reazione uno.

Al termine della prova, si è valutata la concentrazione della biomassa e la quantità di PHA prodotti dalle colture, con i monosaccaridi provenienti dalla seconda e dalla terza reazione (risultati presentati in tabella 4.5). Dati gli esigui volumi, sia la quantità di biomassa che la quantità di PHA prodotti è molto piccola e non ne ha permesso una precisa caratterizzazione; inoltre tali valori sono affetti da errore e sono poco rappresentativi.

Da questa prova evinciamo che *Leuconostoc* cresce nel terreno formulato con i monosaccaridi, per valutare l'accumulo di PHA si è svolta una prova di crescita con volumi più grandi, in beuta da 500 ml (200 ml di terreno). Come detto in precedenza, la modalità di neutralizzazione della reazione 1 è svantaggiosa; dal confronto della crescita sui monosaccaridi prodotti dalla reazione 2 e 3, non notiamo una differenza nelle curve di assorbanza. Tuttavia si ricorda che dalla reazione 2 i monosaccaridi non sono totalmente neutralizzati e in fase di preparazione del terreno si ha la necessità di controllare il pH, il quale deve essere nel range di crescita di *Leuconostoc*. Per questo motivo la configurazione di neutralizzazione usata nella reazione 3, doppio passaggio su resina in colonna impaccata, è preferita e utilizzata per le successive prove.

Tabella 4.5. Quantità biomassa e PHA ottenuti dalle colture in provetta con monosaccaridi

	Quantità biomassa [g]	Concentrazione biomassa [g/L]	Quantità PHA [g]
Coltura MSC (reazione 2)	0.0176	0.35	0.0095
Coltura MSC (reazione 3)	0.0055	0.11	0.0013

## 4.5 Scale-up produzione monosaccaridi

Data la necessità di valutare l'accumulo di PHA da parte di *Leuconostoc* con i monosaccaridi in beuta, su un volume di coltura 200 ml, è stato effettuato uno scale-up nella produzione dei monosaccaridi. Il reattore a microonde SynthWave permette di lavorare con 5 vial in parallelo, in questa maniera la quantità di PHTP trattabili diventa di 15 g, con 150 ml di HCl totali. La quantità di resina utilizzata per neutralizzare ogni reazione è di 150 ml.

Nella prima reazione svolta in questa modalità si è notato che al termine del primo passaggio in colonna, la soluzione presenta un precipitato che si deposita sulla resina durante il secondo passaggio. Tale precipitato può essere dovuto al cambio di pH che avviene durante la neutralizzazione, dato l'alto contenuto di inorganico presente nel grezzo di reazione; inoltre si è ipotizzato che il precipitato di formasse anche nelle prove precedenti ma che non fosse notato a causa dei volumi minori.

Di seguito sono riportati i valori di resa, le analisi ponderali (Tabella 4.6) e il cromatogramma-GC (Figura 4.8) dei monosaccaridi ottenuti.

Tabella 4.6. Resa della quarta reazione e analisi ponderale monosaccaridi

MSC	Resa	Analisi ponderale		
6.04 g	40.2 %	H <sub>2</sub> O	Ceneri	Organico
		13.5 %	36.5 %	50 %

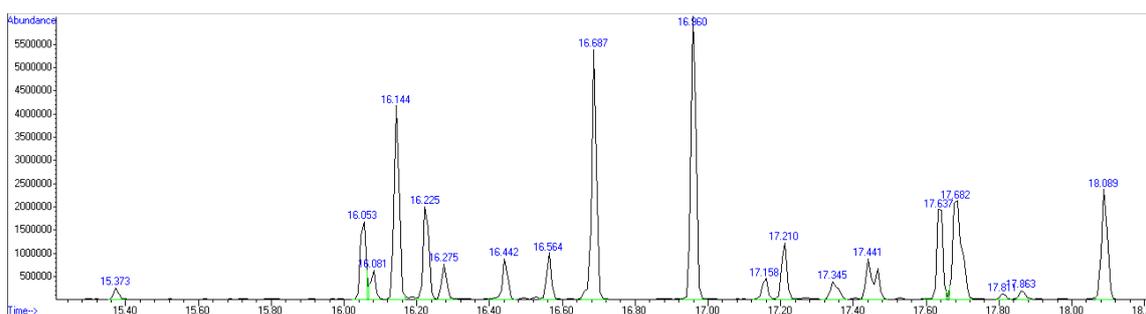


Figura 4.8. Cromatogramma GC dei monosaccaridi della quarta reazione

Una seconda reazione, sempre con 15 g di PHTP, è stata effettuata per valutare se fosse possibile eliminare il precipitato con una filtrazione su carta, tra il primo e il secondo passaggio in colonna. Una volta ottenuti, i monosaccaridi sono stati analizzati: dall'analisi del cromatogramma-GC (Figura 4.9) non notiamo una differenza in composizione, invece, per quanto riguarda la resa (Tabella 4.7) notiamo che essa è diminuita, probabilmente perché parte dei monosaccaridi sono rimasti intrappolati nel filtro di carta.

Poiché il precipitato non può essere eliminato per filtrazione, durante il secondo passaggio in colonna esso si deposita sulla resina e dopo il ciclo di rigenerazione con successivo risciacquo, permane sulla testa della colonna. Quindi per evitare che la colonna si intasi o che la resina perda di efficienza si provvede a eliminare il deposito manualmente e a reintegrare la quantità di resina scartata.

Tabella 4.7. Resa della quinta reazione e analisi ponderale monosaccaridi

MSC	Resa	Analisi ponderale		
4.33 g	29 %	H <sub>2</sub> O	Ceneri	Organico
		8.5 %	34.4 %	57.1 %

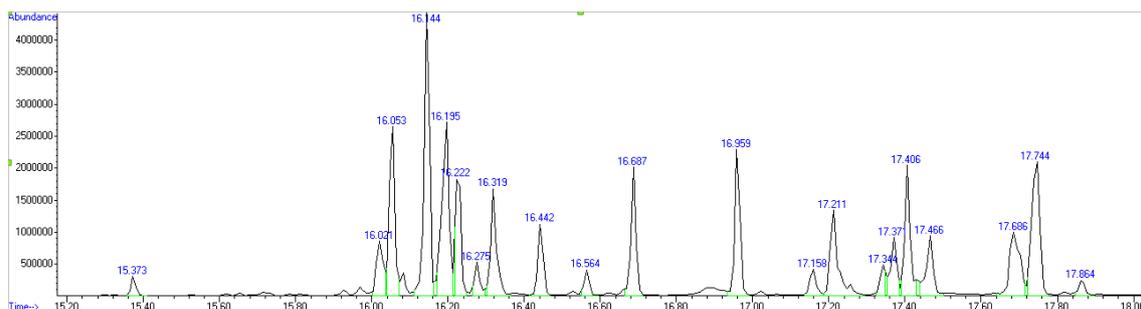


Figura 4.9. Cromatogramma GC dei monosaccaridi della quinta reazione

## 4.6 Fermentazione di *Leuconostoc* in *Khardenavis* con monosaccaridi in beuta

La quantità di monosaccaridi ottenuti nelle due ultime reazioni è sufficiente per l'allestimento di una beuta dal 500 ml, con 200 ml di terreno. La fermentazione è stata protratta per 48 ore, periodo nel quale si sono valutati pH e assorbanza (Figura 4.10). In fase di preparazione del terreno, la presenza del sistema tampone ha causato la formazione di precipitato, nonostante questo la crescita è avvenuta e il pH è rimasto al di sopra della soglia di inibizione (pH finale di 5.3). La fase stazionaria è stata raggiunta a circa 20 ore con un valore di OD 620 di 2.57. Al termine è stata valutata la concentrazione della biomassa ed è stata eseguita l'estrazione dei PHA con ipoclorito di sodio e cloroformio, risultati riportati in Tabella 4.8. La quantità di PHA ottenuti, rapportata al peso secco della biomassa, è del 9.6 %. Sul polimero ottenuto si sono svolte analisi FT-IR (Figura 4.11) e NMR (Figura 4.13).

Dal confronto con spettro IR riportato in letteratura (Figura 4.12) [45], nel campione evidenziamo la presenza della banda a  $1731\text{ cm}^{-1}$ , caratteristico del legame estereo, proprio dei PHA. Altre bande caratteristiche sono quelle intorno a  $2922\text{ cm}^{-1}$ , relative alla vibrazione del legame C—H, in particolare potrebbero evidenziare la presenza di valerato e butirato ( $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  laterale). La banda a  $3302\text{ cm}^{-1}$ , tipica del legame OH potrebbe essere dovuta alla presenza di acidi carbossilici (e quindi monomeri liberi come l'acido idrossibutirrico o l'idrossivalerico). Altre bande caratteristiche dei PHA sono quelle a  $1373\text{ cm}^{-1}$  del gruppo  $-\text{CH}_3$  terminale, a  $1255\text{ cm}^{-1}$  del legame C—O—C. Il picco a  $2361\text{ cm}^{-1}$  è dovuto alla  $\text{CO}_2$  nell'ambiente di

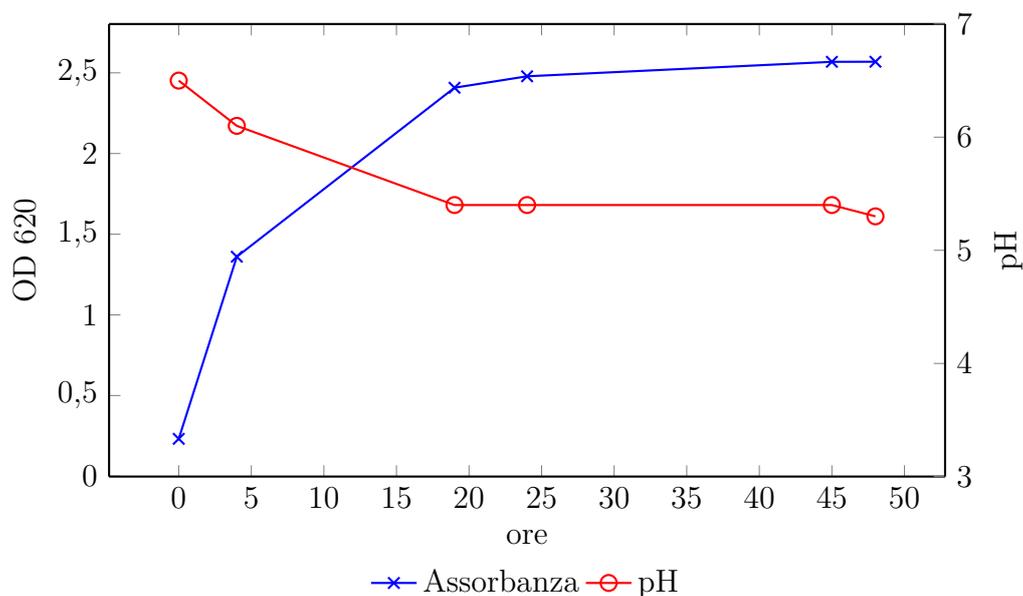


Figura 4.10. Curva di assorbanza e pH di *Leuconostoc* su *Khardenavis* con monosaccaridi

Tabella 4.8. Quantità biomassa e PHA ottenuti da fermentazione in beuta con monosaccaridi

Quantità biomassa (peso secco) [g]	Concentrazione biomassa [g/L]	Quantità PHA [g]
0.135	0.77	0.013

misura.

In Figura 4.13 viene spettro NMR ottenuto sul campione di PHA estratto da *Leuconostoc*. Da una analisi preliminare notiamo la presenza di impurità (per esempio il segnale a 2.17 ppm è acetone); dal confronto con lo spettro trovato in letteratura (Figura 4.14) [46] possiamo riconoscere la banda relativa al segnale degli H del carbonio in posizione (4) del valerato e del butirato, rispettivamente a 1.57 e 1.25 ppm. Altre bande caratteristiche che ritroviamo possono essere quelle degli H dei carboni in posizione (2), a circa 2.3 ppm. A indicare la presenza di valerato nel campione si evidenzia la presenza di bande a circa 0.9 ppm, caratteristiche degli H del carbonio in posizione (5).

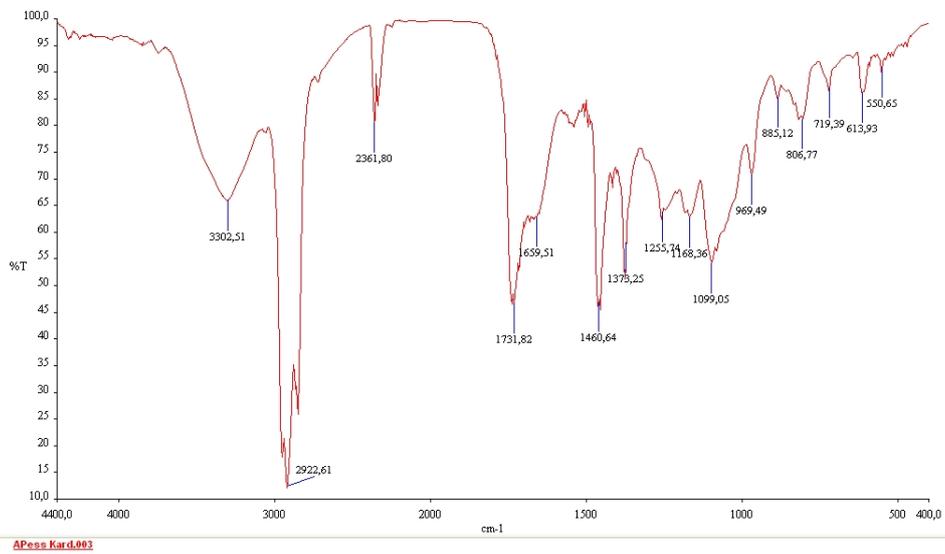


Figura 4.11. Cromatogramma IR dei PHA ottenuti

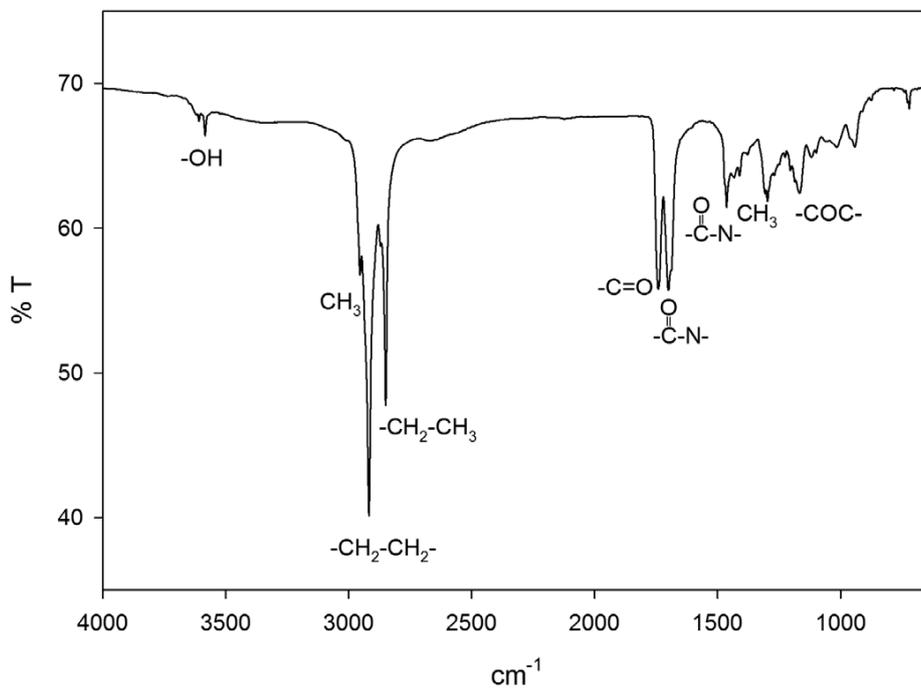


Figura 4.12. Cromatogramma IR dei PHA estratti da *P. putida* [45]

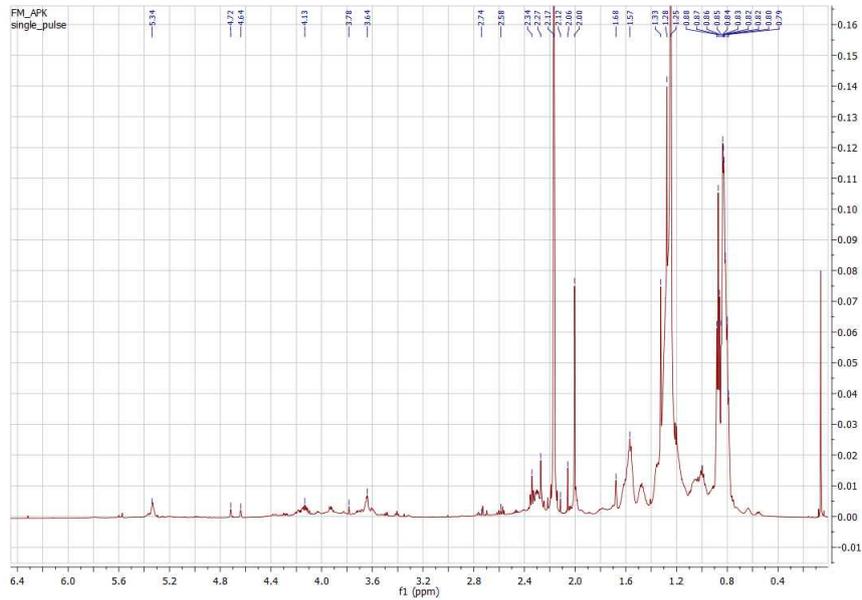


Figura 4.13. Cromatogramma NMR dei PHA ottenuti

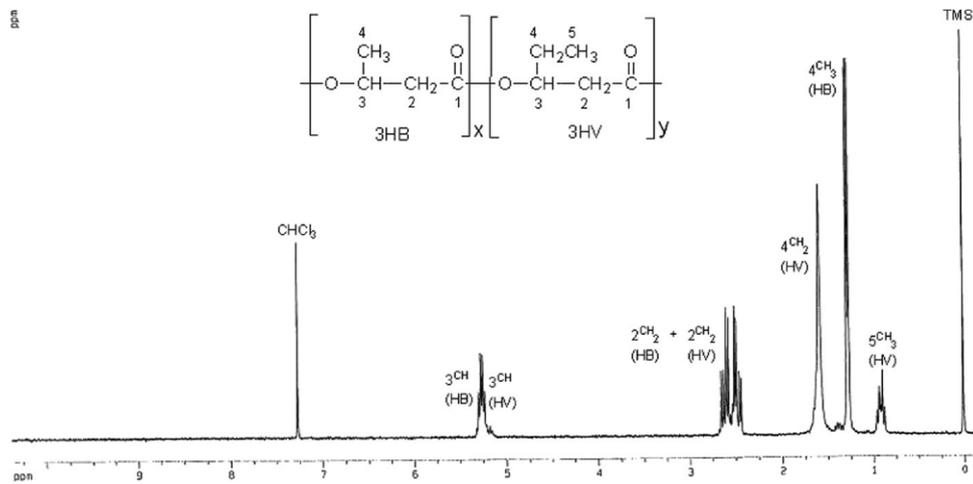


Figura 4.14. Cromatogramma NMR dei PHA ottenuti con *Haloferax mediterranei* in vinaccia al 25 % [46]



## Capitolo 5

# Conclusione e prospettive future

In questo studio si è investigata la possibilità di utilizzare una fonte di carbonio proveniente da una biomassa di scarto per la produzione di poliidrossialcanoati (PHA) microbici. La ricerca si è focalizzata su due aspetti:

1. L'ottimizzazione della reazione di idrolisi della biomassa lignocellulosica e della successiva neutralizzazione dei monosaccaridi ottenuti.
2. La formulazione di un medium di fermentazione, con i monosaccaridi come fonte di carbonio, adatto all'accumulo di PHA, utilizzando *Leuconostoc sp* come ceppo batterico.

Nella prima parte, la neutralizzazione dei prodotti della reazione è avvenuta su una resina basica debole. L'idrolizzato così ottenuto è composto, nella parte organica, esclusivamente da monosaccaridi. Il quantitativo di organico ottenuto nelle varie prove si attesta a 50 - 60 %, denotando una quantità e una variabilità rilevanti nel contenuto di ceneri.

Le fermentazioni sono avvenute tutte in modalità "batch" in condizioni di agitazione, in coltura pura di *Leuconostoc*. Il terreno liquido di fermentazione è stato formulato così da favorire l'accumulo di PHA (eccesso di carbonio e limitazione di azoto, in particolare con un rapporto C/N di 50) e da impedire che il pH scenda a valori che inibiscono la crescita (sistema tampone). Dalle prove preliminari di fermentazione, avvenute in provetta, si è visto che si ha una veloce crescita, la fase esponenziale termina a circa 20 ore. Le prove sono state protratte fino a circa 70 ore per valutare l'accumulo di PHA, però i quantitativi ottenuti di biomassa e di polimero non sono stati sufficienti per svolgere delle caratterizzazioni adeguate (quantità di PHA ottenuti rispetto al peso secco della biomassa, analisi NMR e FT-IR del polimero).

Una seconda prova di fermentazione in beuta ha portato a risultati più esaurienti. La prova è stata protratta per un tempo di 48 ore, al termine del quale si è ottenuta una concentrazione di biomassa di 0.77 g/L e una percentuale di PHA del 9.6 %. I valori ottenuti sono più bassi rispetto a studi simili, condotti con fonte di carbonio proveniente da idrolizzati. Un altro aspetto da tenere in conto è la difficoltà nella formulazione di un terreno colturale con i monosaccaridi ottenuti, in quanto il quantitativo elevato di inorganico porta alla formazione di un precipitato in fase di preparazione del terreno. La precipitazione non è controllata e potrebbe influenzare i parametri messi a punto per favorire l'accumulo dei PHA, come il rapporto C/N o la funzionalità del tampone.

In futuro, si potrebbe ripetere la prova di fermentazione in coltura pura e prostrarla per tempi più lunghi per vedere se *Leuconostoc* è in grado di accumulare PHA. Inoltre sarebbe auspicabile la messa appunto di un work-up, in seguito alla reazione di idrolisi, di purificazione del prodotto, in modo da controllare la composizione salina del terreno in fase di fermentazione.

Un ultimo possibile sviluppo proposto è quello che prevede l'utilizzo di una coltura mista per la produzione di PHA. Il ceppo batterico *Leuconostoc* è stato isolato da un consorzio microbico già utilizzato per la produzione del biopolimero in scotta di latte [28], con buoni risultati. Si potrebbe ripetere l'esperimento in coltura mista in un terreno contenente i monosaccaridi per valutare se la produttività di PHA raggiunge valori più elevati.

# Bibliografia

- [1] *Dati di mercato :: PlasticsEurope*. URL: <https://www.plasticseurope.org/it/resources/market-data> (visitato il 27/06/2019).
- [2] European Bioplastics. *Market Drivers*. URL: <https://www.european-bioplastics.org/market/market-drivers/> (visitato il 27/06/2019).
- [3] Bio-based News. *Strong growth in bio-based building blocks and moderate growth in bio-based polymers - Bio-based News* -. 22 Mag. 2018. URL: <http://news.bio-based.eu/strong-growth-in-bio-based-building-blocks-and-moderate-growth-in-bio-based-polymers-2/> (visitato il 27/06/2019).
- [4] Kumar Sudesh e Tadahisa Iwata. “Sustainability of Biobased and Biodegradable Plastics”. In: *CLEAN - Soil, Air, Water* 36.5 (giu. 2008), pp. 433–442. ISSN: 18630650, 18630669. DOI: [10.1002/clen.200700183](https://doi.org/10.1002/clen.200700183). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/clen.200700183>.
- [5] Jeffrey J. Kolstad et al. “Assessment of anaerobic degradation of Ingeo™ polylactides under accelerated landfill conditions”. In: *Polymer Degradation and Stability* 97.7 (lug. 2012), pp. 1131–1141. ISSN: 01413910. DOI: [10.1016/j.polymdegradstab.2012.04.003](https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.04.003). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391012001413> (visitato il 04/07/2019).
- [6] Zulfiqar Ali Raza, Sharjeel Abid e Ibrahim M. Banat. “Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications”. In: *International Biodeterioration & Biodegradation* 126 (gen. 2018), pp. 45–56. ISSN: 09648305. DOI: [10.1016/j.ibiod.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>.
- [7] Lemoigne M. “Produits de dehydration et de polymerisation de l’acide  $\beta$ -oxobutyrique”. In: *Biochimie* 8 (1962), pp. 770–782.
- [8] Steven C Slater, William H Voige e Douglas E Dennis’. “Cloning and Expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthetic Pathway”. In: 170 (1988), p. 6.

- [9] E. Bugnicourt et al. "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging". In: *Express Polymer Letters* 8.11 (2014), pp. 791–808. ISSN: 1788618X. DOI: [10.3144/expresspolymlett.2014.82](https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82). URL: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c>.
- [10] K Sudesh, H Abe e Y Doi. "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters". In: *Progress in Polymer Science* 25.10 (dic. 2000), pp. 1503–1555. ISSN: 00796700. DOI: [10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>.
- [11] Yoshiharu Doi, Shiro Kitamura e Hideki Abe. "Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)". In: *Macromolecules* 28.14 (lug. 1995), pp. 4822–4828. ISSN: 0024-9297, 1520-5835. DOI: [10.1021/ma00118a007](https://doi.org/10.1021/ma00118a007). URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00118a007>.
- [12] Masao Kunioka, Akira Tamaki e Yoshiharu Doi. "Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)". In: *Macromolecules* 22.2 (mar. 1989), pp. 694–697. ISSN: 0024-9297, 1520-5835. DOI: [10.1021/ma00192a031](https://doi.org/10.1021/ma00192a031). URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00192a031>.
- [13] Sang Yup Lee. "Bacterial polyhydroxyalkanoates". In: *Biotechnology and Bioengineering* 49.1 (26 mar. 2000), pp. 1–14. ISSN: 00063592, 10970290. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0290%2819960105%2949%3A1%3C1%3A%3AAID-BIT1%3E3.0.CO%3B2-P>.
- [14] Yves Poirier et al. "Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants". In: *FEMS Microbiology Letters* 103.2 (dic. 1992), pp. 237–246. ISSN: 03781097, 15746968. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1992.tb05843.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05843.x). URL: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05843.x>.
- [15] K. Bohmert et al. "Constitutive Expression of the beta -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants". In: *PLANT PHYSIOLOGY* 128.4 (1 apr. 2002), pp. 1282–1290. ISSN: 0032-0889, 1532-2548. DOI: [10.1104/pp.010615](https://doi.org/10.1104/pp.010615). URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010615>.
- [16] Alistair J Anderson e Edwin A Dawes. "Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates". In: *MICROBIOL. REV.* 54 (1990), p. 23.

- [17] Justyna Możejko-Ciesielska e Robert Kiewisz. “Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?” In: *Microbiological Research* 192 (nov. 2016), pp. 271–282. ISSN: 09445013. DOI: [10.1016/j.micres.2016.07.010](https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>.
- [18] Alexander Steinbüchel e Tina Lütke-Eversloh. “Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms”. In: *Biochemical Engineering Journal* 16.2 (nov. 2003), pp. 81–96. ISSN: 1369703X. DOI: [10.1016/S1369-703X\(03\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00036-6). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366>.
- [19] R.A.J. Verlinden et al. “Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates”. In: *Journal of Applied Microbiology* 102.6 (giu. 2007), pp. 1437–1449. ISSN: 1364-5072, 1365-2672. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x). URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>.
- [20] J. Mergaert et al. “Biodegradation of polyhydroxyalkanoates”. In: *FEMS Microbiology Letters* 103.2 (dic. 1992), pp. 317–321. ISSN: 03781097, 15746968. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1992.tb05853.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05853.x). URL: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05853.x> (visitato il 25/06/2019).
- [21] Lara L Madison e Gjalte W Huisman. “Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic”. In: *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.* 63 (1999), p. 33.
- [22] Tajalli Keshavarz e Ipsita Roy. “Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda”. In: *Current Opinion in Microbiology* 13.3 (giu. 2010), pp. 321–326. ISSN: 13695274. DOI: [10.1016/j.mib.2010.02.006](https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>.
- [23] Guo-Qiang Chen e Qiong Wu. “The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials”. In: *Biomaterials* 26.33 (nov. 2005), pp. 6565–6578. ISSN: 01429612. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2005.04.036](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205003510> (visitato il 05/07/2019).
- [24] S. Philip, T. Keshavarz e I. Roy. “Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications”. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82.3 (mar. 2007), pp. 233–247. ISSN: 02682575, 10974660. DOI: [10.1002/jctb.1667](https://doi.org/10.1002/jctb.1667). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>.
- [25] P A Holmes. “Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic”. In: *Physics in Technology* 16.1 (gen. 1985), pp. 32–36. ISSN: 0305-4624. DOI: [10.1088/0305-4624/16/1/305](https://doi.org/10.1088/0305-4624/16/1/305). URL: <http://stacks.iop.org/0305-4624/16/i=1/a=305?key=crossref.977853460e84699c47cfad6b4f631a34> (visitato il 26/06/2019).

- [26] Suchada Chanprateep. “Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates”. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110.6 (dic. 2010), pp. 621–632. ISSN: 13891723. DOI: [10.1016/j.jbiosc.2010.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172310002525>.
- [27] Sang Yup Lee. “Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria”. In: *Trends in Biotechnology* 14.11 (nov. 1996), pp. 431–438. ISSN: 01677799. DOI: [10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167779996100615>.
- [28] Beatrice Battaglino. “Studio della produzione di poliidrossialcanoati (PHA) da scotta di latte da parte di un consorzio microbico”. Tesi di Laurea Magistrale. Università degli studi di Torino, 2015.
- [29] Leda R. Castilho, David A. Mitchell e Denise M.G. Freire. “Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation”. In: *Bioresource Technology* 100.23 (dic. 2009), pp. 5996–6009. ISSN: 09608524. DOI: [10.1016/j.biortech.2009.03.088](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409006610>.
- [30] Jaciane Lutz Ienczak, Willibaldo Schmidell e Gláucia Maria Falcão de Aragão. “High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review”. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40.3 (apr. 2013), pp. 275–286. ISSN: 1367-5435, 1476-5535. DOI: [10.1007/s10295-013-1236-z](https://doi.org/10.1007/s10295-013-1236-z). URL: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-013-1236-z> (visitato il 05/07/2019).
- [31] Santiago Rodriguez-Perez et al. “Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review”. In: *Journal of Environmental Management* 205 (gen. 2018), pp. 215–230. ISSN: 03014797. DOI: [10.1016/j.jenvman.2017.09.083](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479717309581> (visitato il 26/06/2019).
- [32] J. Choi e S. Y. Lee. “Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation”. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 51.1 (27 gen. 1999), pp. 13–21. ISSN: 0175-7598, 1432-0614. DOI: [10.1007/s002530051357](https://doi.org/10.1007/s002530051357). URL: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051357>.
- [33] Silvia Tabasso et al. “Microwave-assisted flash conversion of non-edible polysaccharides and post-harvest tomato plant waste to levulinic acid”. In: *Green Chem.* 16.1 (2014), pp. 73–76. ISSN: 1463-9262, 1463-9270. DOI: [10.1039/C3GC41103F](https://doi.org/10.1039/C3GC41103F). URL: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3GC41103F>.
- [34] C. Oliver Kappe. “Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis”. In: *Angewandte Chemie International Edition* 43.46 (26 nov. 2004), pp. 6250–6284. ISSN: 1433-7851, 1521-3773. DOI: [10.1002/anie.200400655](https://doi.org/10.1002/anie.200400655). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200400655>.

- [35] S. Obruca. “Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production”. In: *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29.2 (12 lug. 2015), pp. 135–144. ISSN: 03529568, 18465153. DOI: [10 . 15255 / CABEQ . 2014 . 2253](https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2253). URL: [http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29\\_2\\_2015/Cabeq%202015-02-web%20obruca.pdf](http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq%202015-02-web%20obruca.pdf).
- [36] David L. Grzenia, Daniel J. Schell e S. Ranil Wickramasinghe. “Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction”. In: *Journal of Membrane Science* 348.1 (feb. 2010), pp. 6–12. ISSN: 03767388. DOI: [10 . 1016 / j . memsci . 2009 . 10 . 035](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.10.035). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738809007777> (visitato il 05/07/2019).
- [37] Jian Yu e Heiko Stahl. “Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates”. In: *Bioresource Technology* 99.17 (nov. 2008), pp. 8042–8048. ISSN: 09608524. DOI: [10 . 1016 / j . biortech . 2008 . 03 . 071](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.071). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408003088> (visitato il 05/07/2019).
- [38] Denis Hemme e Catherine Foucaud-Scheunemann. “Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods”. In: *International Dairy Journal* 14.6 (giu. 2004), pp. 467–494. ISSN: 09586946. DOI: [10 . 1016 / j . idairyj . 2003 . 10 . 005](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603002413>.
- [39] A Khardenavis et al. “Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly  $\beta$ -hydroxybutyrate”. In: *Bioresource Technology* 98.18 (dic. 2007), pp. 3579–3584. ISSN: 09608524. DOI: [10 . 1016 / j . biortech . 2006 . 11 . 024](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.024). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852406006225>.
- [40] A. Khardenavis et al. “Activated Sludge is a Potential Source for Production of Biodegradable Plastics from Wastewater”. In: *Environmental Technology* 26.5 (mag. 2005), pp. 545–552. ISSN: 0959-3330, 1479-487X. DOI: [10 . 1080 / 09593332608618536](https://doi.org/10.1080/09593332608618536). URL: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593332608618536>.
- [41] Sei Kwang Hahn et al. “Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 44.2 (1994), pp. 256–261. DOI: [10 . 1002 / bit . 260440215](https://doi.org/10.1002/bit.260440215). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260440215>.
- [42] Francesca Bosco e Fulvia Chiampo. “Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge”. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109.4 (apr. 2010), pp. 418–421. ISSN: 13891723. DOI: [10 . 1016 / j . jbiosc . 2009 . 10 . 012](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.012). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172309009748>.

- [43] Yu Jin Kim. “Development of a Chemically Defined Minimal Medium for the Exponential Growth of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293”. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22.11 (28 nov. 2012), pp. 1518–1522. ISSN: 10177825, 17388872. DOI: [10.4014/jmb.1205.05053](https://doi.org/10.4014/jmb.1205.05053). URL: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2012&vol=22&num=11&page=1518>.
- [44] Catherine Foucaud, Alan Francois e Jean Richard. “Development of a Chemically Defined Medium for the Growth of *Leuconostoc mesenteroides*”. In: *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* (), p. 4.
- [45] Ahmad Mohammed Gumel, Mohamad Suffian Mohamad Annuar e Thorsten Heidelberg. “Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent”. In: *PLoS ONE* 7.9 (20 set. 2012). A cura di Melanie R. Mormile, e45214. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0045214](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045214). URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045214> (visitato il 14/06/2019).
- [46] Anirban Bhattacharyya et al. “Production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei* using rice-based ethanol stillage with simultaneous recovery and re-use of medium salts”. In: *Extremophiles* 18.2 (mar. 2014), pp. 463–470. ISSN: 1431-0651, 1433-4909. DOI: [10.1007/s00792-013-0622-9](https://doi.org/10.1007/s00792-013-0622-9). URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-013-0622-9>.