

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

**Ceppi batterici produttori di PHB: studio
preliminare per valutare l'utilizzo di
zuccheri derivati da microalghe come fonti
di carbonio**



Relatore

Prof.ssa Debora Fino

Correlatore

Dott.ssa Fraterrigo Garofalo Silvia

Candidato

Moira Rita Nicosia
s304553

Luglio 2024

Indice

Scopo della tesi	1
1 Introduzione	1
1.1 Problemi della plastica e della bioplastica.....	1
1.2 Bioplastiche: focus su poliidrossialcanoati, proprietà e usi	6
1.2.1 Breve introduzione al polidrossibutirrato (PHB)	11
1.3 Ceppi batterici che producono biopolimeri: <i>C. necator</i> DSM 545 e <i>H. halophila</i> CCM 3662	14
1.4 Sfide per la produzione di PHB: uso di scarti come fonti carboniose	15
1.5 Microalghe come substrato per estrazione di carboidrati: strategia di bioraffineria	17
1.5.1 Focus su <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	23
1.5.2 Analisi pretrattamento della microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	27
1.6 DoE, Design of Experiment	29
2. Materiali e metodi	31
2.1 Ceppi batterici e biomassa microalgale.....	31
2.2 Terreni di coltura.....	31
2.2.1 <i>Cupriavidus necator</i> :.....	31
2.2.2 <i>Halomonas halophila</i>	33
2.3 Strumentazione.....	35
2.3.1 Approfondimento su HPLC	39
2.4 Estrazione degli zuccheri da <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	44
2.4.1 Test di idrolisi acida.....	44
2.4.2 Scale-up dell'idrolisi acida	50
2.5 Metodi analitici	53
2.5.1 Crescita dei batteri.....	53
2.5.2 Consumo degli zuccheri: analisi HPLC.....	55
2.5.3 Estrazione di PHB e analisi	55
2.6 Test di coltivazione di <i>Cupriavidus necator</i>	57
2.7 Test di coltivazione di <i>Halomonas halophila</i>	58
2.7.1 Crescita di <i>H. halophila</i> su glucosio	58
2.7.2 Crescita di <i>H. halophila</i> su glucosio, mannosio e arabinosio.....	59
2.7.3 Crescita di <i>H. halophila</i> su idrolizzato algale	59
3. Risultati	63
3.1 Estrazione zuccheri da <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	63

3.2 Scale up estrazione zuccheri da <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	67
3.3 Crescita di <i>C. necator</i> su glucosio, mannosio ed arabinosio	69
3.4 Crescita di <i>Halomonas halophila</i> su glucosio	71
3.5 Crescita di <i>Halomonas halophila</i> su glucosio, mannosio ed arabinosio	73
3.6 Crescita di <i>Halomonas halophila</i> su idrolizzato algale.....	76
3.7 Confronto tra crescita di <i>Halomonas halophila</i> su mix di zuccheri puri e su idrolizzato algale.....	82
4 Conclusioni e sviluppi futuri	85
Lista degli acronimi	87
Lista dei simboli	89
Bibliografia.....	91

Scopo della tesi

La presente ricerca mira ad esplorare e sviluppare metodi innovativi per la produzione sostenibile di bioplastiche, focalizzandosi sui poliidrossialcanoati (PHA), utilizzando come fonte carboniosa gli zuccheri estratti dalla microalga *Phaeodactylum tricornerutum*.

Le bioplastiche rappresentano una risposta critica e valida alla crescente preoccupazione ambientale derivante dall'uso diffuso di plastiche tradizionali, le quali hanno dimostrato un impatto significativo sulla salute umana e sulla biosfera.

L'approccio sperimentale si basa sull'ottimizzazione dei processi di idrolisi acida per massimizzare l'estrazione dei carboidrati dalla microalga, seguita dall'impiego di batteri capaci di sintetizzare PHA da questi zuccheri.

Per l'analisi dei parametri ottimali di idrolisi acida volti a massimizzare il quantitativo di zuccheri estratti dalla microalga *P. tricornerutum* è condotto uno studio di Design of Experiments (DoE). Questo approccio statistico ha permesso di valutare simultaneamente la concentrazione di H₂SO₄ e il rapporto biomassa/solvente, con l'obiettivo di aumentare il contenuto di glucosio, mannosio e arabinosio estratto dalla biomassa.

I range analizzati dei parametri per l'estrazione acida sono stati selezionati attraverso un'analisi della letteratura esistente.

La ricerca intende contribuire alla conoscenza delle tecnologie emergenti nel settore delle bioplastiche, con un focus particolare sulla valorizzazione delle microalghe come risorsa sostenibile per la produzione di materiali biodegradabili e compostabili. I risultati attesi potrebbero fornire linee guida cruciali per una produzione più efficiente e competitiva di biopolimeri. In questo modo, si dà un contributo alla transizione verso una produzione di bioplastiche a basso impatto ambientale, mantenendo tuttavia proprietà meccaniche paragonabili a quelle della plastica di origine fossile.

Nel primo capitolo sono esposti tutti gli elementi necessari per comprendere in maniera approfondita le fondamenta del presente elaborato. Sono presentati gli attuali vantaggi e le problematiche legati all'impiego della plastica convenzionale e le cause che favoriscono la diffusione delle microplastiche. Viene presentato lo stato dell'arte sull'uso delle bioplastiche, con particolare focus sui biopolimeri poliidrossialcanoati (PHA). Tra questi, si è posta l'attenzione sul poliidrossibutirrato (PHB), primo polimero tra i PHA ad essere isolato e caratterizzato. Lo studio approfondisce il ruolo dei batteri capaci di produrre biopolimeri, con un dettagliato approfondimento su due diversi ceppi batterici: *Cupriavidus necator* DSM 545 e *Halomonas halophila* CCM 3662.

Successivamente, si analizzano le sfide legate alla diffusione delle bioplastiche, principalmente dovute al costo dei substrati carboniosi. Si esplora la possibilità di rendere la produzione economicamente competitiva mediante l'utilizzo di sottoprodotti industriali o soluzioni carboniose estratte da alghe e microalghe. Si approfondiscono le potenzialità della diatomea *P. tricornerutum*, una delle microalghe più ampiamente studiate in letteratura. Infine, sono presentate le diverse tecniche di pretrattamento di microalghe utilizzate al giorno d'oggi. La trasformazione delle microalghe in bioplastiche richiede, infatti, un pretrattamento efficace per rompere le loro pareti cellulari e facilitare l'estrazione dei composti desiderati.

Il secondo capitolo è dedicato alla descrizione dei materiali, strumenti e metodi utilizzati per la realizzazione dei test sperimentali. Sono presentati i ceppi batterici e la biomassa microalgale scelti per le prove; descritti i terreni di coltura preparati per la crescita dei microorganismi; elencata la strumentazione impiegata. Inoltre, è presente una sezione dedicata alla colonna cromatografica liquida ad alta prestazione (HPLC) utilizzata per

l'analisi degli zuccheri presenti nella microalga, consumo di questi da parte dei batteri e per l'analisi della produzione di poliidrossibutirrato (PHB).

È illustrata la ricerca bibliografica condotta per la definizione dei parametri di idrolisi acida, descritta nel sottocapitolo successivo. Sono presentati e descritti i diversi metodi analitici utilizzati per l'analisi dei risultati ottenuti nelle varie prove sperimentali.

In seguito, sono descritte le procedure adottate per la fermentazione aerobica dei due ceppi batterici e per l'estrazione di PHB con acido solforico. In particolare, sono eseguite delle prove di crescita e fermentazione in beuta su glucosio e mix di zuccheri puri contenente glucosio-mannosio-arabinosio in modalità batch, e prove sugli zuccheri glucosio-mannosio-arabinosio estratti dalla *P. tricornutum* con tecnica fed-batch.

Nella terza parte della tesi sono presentati e discussi in maniera critica i risultati delle varie prove sperimentali. La prima sezione è dedicata ai risultati ottenuti nei test di idrolisi acida, attraverso i quali sono definiti i parametri ottimali di estrazione zuccherina dalla *P. tricornutum*. La seconda sezione si concentra sulle prove di crescita e fermentazione dei ceppi batterici. Di queste sono riportati gli andamenti di crescita in batterica in termini di densità ottica con lunghezza d'onda pari a 600 [nm] e concentrazione di biomassa secca, oltre che la variazione nel tempo delle concentrazioni degli zuccheri consumati e del PHB prodotto. Sono presentati gli esiti delle prove di fermentazione aerobica di *C. necator* su mix zuccherino e i risultati ottenuti dalle prove di *H. halomonas* su glucosio e su mix di zuccheri. Successivamente sono confrontati i risultati di crescita sul mix di zuccheri per analizzare quale dei due batteri metabolizzi in maniera più efficiente la tipologia di zuccheri testati. Il confronto suggerisce la scelta del batterio alofilo, il quale è impiegato per la prova seguente su idrolizzato algale, i cui risultati sono discussi nella parte finale del capitolo.

Il quarto capitolo riporta sia la conclusione della tesi sperimentale sia suggerimenti per possibili sviluppi futuri.

1 Introduzione

1.1 Problemi della plastica e della bioplastica

I polimeri sono i componenti primari di una vasta varietà di materiali sintetici e semi-sintetici conosciuti come plastiche. La maggior parte delle plastiche contemporanee sono fatte a partire da sostanze chimiche basate su carburanti fossili, come gas naturale o petrolio [1].

I materiali plastici hanno aperto strade significative al progresso umano, rivoluzionando svariati settori come packaging, edilizia, mobilità, trasporti, elettronico, settore sanitario, agricoltura, sport ed intrattenimento [2]. Questi materiali presentano caratteristiche chiave che hanno notevolmente influenzato il modo di vivere e lavorare degli uomini, quali: solidità a temperatura ambiente, isolamento termico, acustico ed elettrico, duttilità e malleabilità, trasportabilità, leggerezza, impermeabilità, resistenza chimica e meccanica, sicurezza dal punto di vista sanitario e basso costo. Per tali ragioni, la plastica cosiddetta convenzionale è indispensabile e fondamentale nell'economia odierna.

Tuttavia, la plastica rappresenta un'importante minaccia per l'umanità e per l'ambiente, a causa dell'impatto sull'ecosistema durante tutto il suo ciclo vita. Le plastiche sono, infatti, estremamente resistenti e scarsamente degradabili. Presentano forti legami Carbonio-Idrogeno che, se da una parte le rendono desiderabili per la loro stabilità, dall'altra rendono estremamente difficoltosa la gestione dei rifiuti derivanti. Trattare questi ultimi, infatti, è diventato un problema sempre più serio: usualmente gli oggetti plastici sono miscelati con altri materiali come metalli, vetro e carta, rendendo difficoltoso il loro trattamento e il loro riciclo. Inoltre, la produzione di plastica coinvolge l'uso di numerose risorse, principalmente non-rinnovabili come petrolio o gas naturale. Circa la metà del petrolio impiegato nel processo di produzione diventa parte integrante delle plastiche stesse, mentre l'altra metà viene utilizzata come combustibile durante la fabbricazione [3].



Figura 1: Plastica sulle spiagge [4].

Le quantità coinvolte sono enormi: come mostrato nella figura 2, dal 1950 al 2018 la produzione di plastica mostra un andamento fortemente crescente, da 1.5 milioni di tonnellate nel 1950 a circa 359 milioni di tonnellate nel 2018 [5].

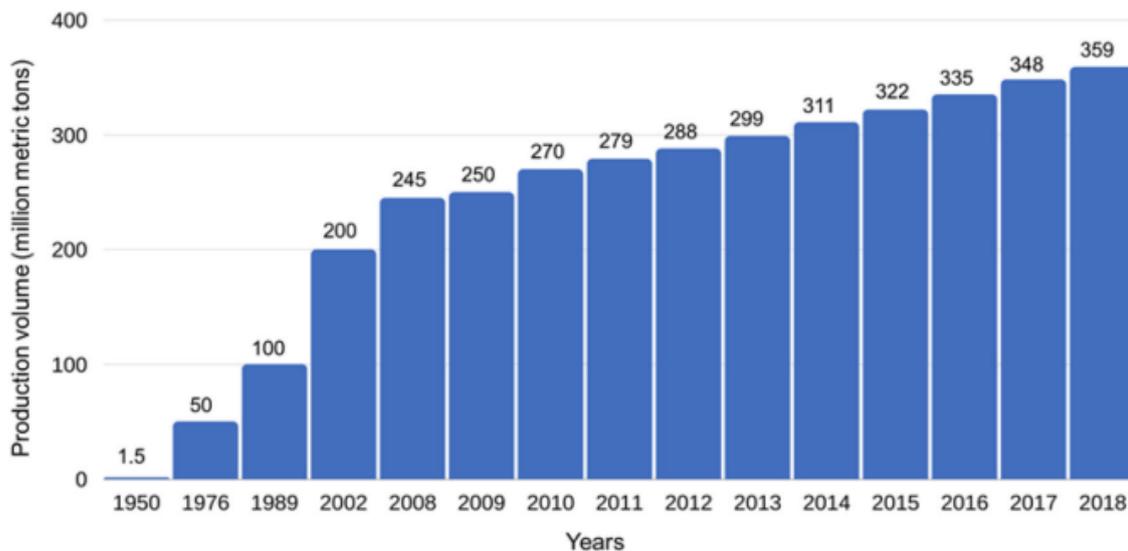


Figura 2: Produzione di plastiche dal 1950 al 2018 [5].

Come analizzato da Plastics Europe, la produzione nel 2022 eccede i 400 milioni di tonnellate, di cui 362.3 milioni di tonnellate sono plastiche di origine fossile [6].

Se le attuali tendenze della domanda di plastica rimangono tali, nel 2050 la produzione eccederà 1.1 miliardi di tonnellate [1].

Secondo quanto dichiarato dall'European Environment Agency, agenzia dell'Unione Europea incaricata di fornire informazioni valide e indipendenti sull'ambiente, la media globale dell'uso di plastica si attesta sui 45 kg per persona all'anno. Nell'Europa occidentale (che esclude l'Europa centrale e la Comunità degli Stati Indipendenti), l'uso è tre volte superiore, con circa 136 kg per persona [3]. I dati forniti da svariati studi a riguardo, permettono di caratterizzare gli ultimi 70 anni come "l'era della plastica". Con tempi di degradazione stimati tra diverse centinaia e un migliaio di anni, tutte le plastiche prodotte fino ad oggi sono ancora presenti nell'ambiente. Di conseguenza, la quantità complessiva di plastica nell'ambiente aumenta di anno in anno [7].

La produzione delle plastiche nel mondo, come mostrato nella figura 3, è ripartita tra:

- Asia, lo stato che produce la maggior parte di polimeri sintetici (circa 50-56%);
- Europa (14-19%);
- Nord America (17-18%);
- Oriente e Africa (7-9%);
- America Latina (4%) [6].



Figura 3: Produzione di plastiche nel mondo [7].

Le tecniche utilizzate al giorno d'oggi per trattare il fine vita dei materiali plastici sono molteplici: discarica, incenerimento, polverizzazione meccanica, decomposizione microbica o termica, riuso con modifiche. Ogni processo porta con sé dei punti critici:

- 1) Discarica: a causa dei grandi volumi e bassa densità della plastica, l'occupazione del suolo, a discapito della filiera alimentare, rimane troppo alto; inoltre, si ha un alto rischio di contaminazione delle falde acquifere;
- 2) Incenerimento: richiede un costoso sistema di trattamento degli inquinanti per contrastare la presenza di residui dannosi come metalli pesanti e fuliggine;
- 3) Polverizzazione meccanica: i composti ottenuti con questa tecnica hanno un valore di mercato basso con prestazioni mediocri;
- 4) Decomposizione microbica o termica: la prima alternativa richiede un tempo di circa nove anni per una degradazione completa, la seconda necessita di un'attrezzatura costosa;
- 5) Riuso con modifiche: richiede processi operativi molto complessi e dispendiosi [8].

Considerando le attuali tendenze di crescita demografica e aumento dei redditi, si stima un incremento del 70% nell'uso annuale di plastica e conseguente produzione di rifiuti entro il 2040 rispetto al 2020. Il ruolo predominante delle discariche e dell'incenerimento nel trattamento a fine vita dei rifiuti di plastica rimarrà preponderante portando ad un aumento delle emissioni di gas serra del 60% nel 2040 rispetto al 2020 (1.8 gigatonnellate di CO₂ equivalente) [9].

A peggiorare un quadro già drammatico, vi è la pandemia da coronavirus 2019, la quale ha causato significativi cambiamenti nella produzione, consumo e spreco di plastica. La pandemia ha generato una rapida crescita della richiesta globale di dispositivi di protezione individuale realizzati in plastica, come mascherine, guanti, camici e disinfettanti per le mani confezionati. Durante le prime fasi di contenimento della diffusione del virus, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che fossero necessari a livello mondiale 89 milioni di mascherine mediche al mese, oltre a 76 milioni di guanti e 1,6 milioni di paia di occhiali protettivi in plastica (OMS, 2020) [3].

Gli effetti dei rifiuti plastici sull'ambiente variano dall'aumento della mortalità in alcune specie marine all'alterazione dell'habitat fisico stesso, come evidenziato dalle figure 4 e 5.



Figura 4: 'Plastic river, Bangladesh'. Un tempo, importante via d'acqua commerciale, il fiume Buriganga, nella periferia sud-ovest di Dhaka, Bangladesh, si è ora trasformato in un fiume di plastica. Photo ©BRS / Shahriar Hossain (Bangladesh) [10].



Figura 5: Plastica nei mari [11].

I suoi impatti sulle persone includono danni alla salute, alla navigazione oltre a una riduzione dei ricavi turistici.

Oltre agli effetti sulla biota, la presenza di rifiuti riduce, infatti, il valore degli habitat per i residenti locali e i turisti. Sull'isola di Geoje, in Corea del Sud, un evento di spiaggiamento di massa ha causato una riduzione del 63% nel numero di visitatori, con una perdita economica stimata tra 29 e 37 milioni di dollari [12].

A complicare ulteriormente la situazione, si osserva il fenomeno di formazione di microplastiche. A causa di fenomeni come usura, degradazione, rottura, frantumazione, sfregamento, frammenti di plastica vengono continuamente rilasciati nell'ambiente, e assumono connotazioni diverse a seconda delle dimensioni che assumono. Si parla di microplastiche se i frammenti presentano diametro tra 1 micrometro e 5 millimetri, nanoparticelle se quest'ultimo raggiunge dimensioni minori di 1 micrometro [13].

Il 15-31% delle microplastiche presenti nell'oceano rientra nella categoria delle microplastiche primarie, rilasciate direttamente nell'ambiente sotto forma di particelle.

Queste microplastiche provengono da fonti quali il lavaggio di capi sintetici, l'abrasione degli pneumatici e l'aggiunta intenzionale in prodotti per la cura della pelle.

Al contrario, il 68-81% delle microplastiche oceaniche sono microplastiche secondarie, generate dalla degradazione di oggetti di plastica come buste, bottiglie e reti da pesca [14]. Le fonti di microplastiche sono, dunque, svariate: dai granuli di plastica vergine che sfuggono durante la modellazione di oggetti plastici, microsferi presenti nei prodotti di cura personale, dall'usura di pneumatici e segnali stradali, bottiglie e rifiuti più in generale, fino ad arrivare alle fibre sintetiche che si distaccano dai tessuti durante il loro lavaggio, come riportato dalla figura 6 [15], [16].

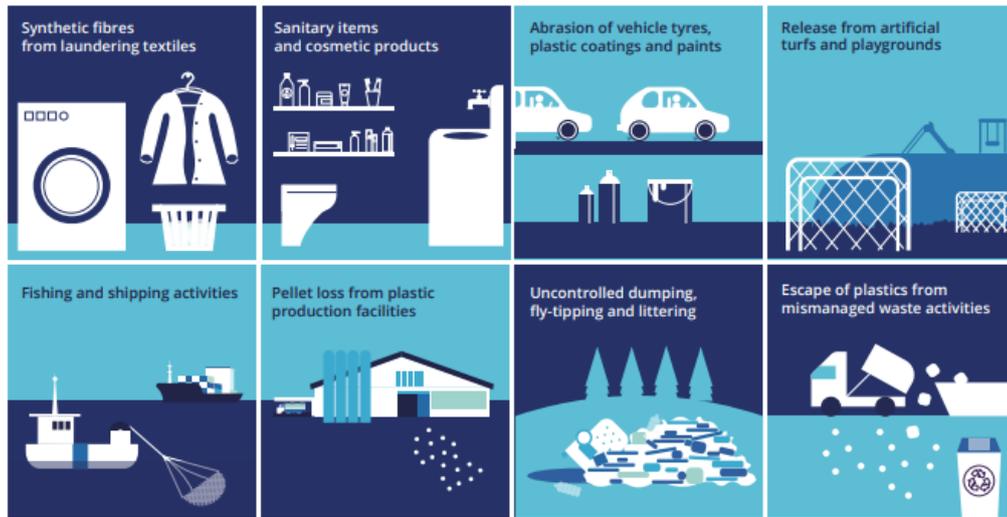


Figura 6: Fonti di plastica e microplastica nell'ambiente [3].

Tutti questi fattori contribuiscono ad una diffusione smisurata di microplastiche. Gli studiosi hanno, infatti, osservato la presenza diffusa di microplastiche in vari ecosistemi: dalle profondità degli oceani alle nevi artiche e ai ghiacci antartici, dai molluschi al sale da tavola, dall'acqua potabile alla birra, fino all'aria o nella pioggia con la quale arriva sulle montagne e nelle città [15].

Si evidenzia una presenza massiccia in fiumi e oceani: nel 2015, gli oceanografi hanno stimato che vi fossero tra i 15 trilioni e i 51 trilioni di particelle di microplastica fluttuanti nelle acque superficiali di tutto il mondo [15].

Preoccupanti sono anche i rischi legati alla salute umana: additivi e monomeri emessi dalle microplastiche possono essere molto dannosi, con alcuni che possiedono proprietà cancerogene o interferenti endocrini. Inoltre, le microplastiche fungono da veicoli per microrganismi patogeni o batteri resistenti agli antibiotici, rappresentando un rischio per la salute umana e altri organismi presenti nel suolo [16]. La consapevolezza sugli effettivi rischi sanitari legati alla microplastica è ancora oggi purtroppo fonte di incertezza [12].

Da analisi di microplastiche presenti nell'aria, nell'acqua, nel sale e nei prodotti ittici, sia i bambini che gli adulti potrebbero ingerire da alcune decine a più di 100.000 particelle di microplastica al giorno, come riportato da Albert Koelmans, scienziato ambientale dell'Università di Wageningen nei Paesi Bassi. Egli riferisce che nei casi più gravi, le persone potrebbero ingerire circa la massa di una carta di credito in microplastica ogni anno [15].

Esistono varie strategie per un trattamento sostenibile dei rifiuti plastici, partendo principalmente dalla prevenzione e seguendo la gerarchia delle 4 R: ridurre, riusare, riciclare, recuperare [1].

Nel 2018 la Commissione Europea ha istituito l'Alleanza per la Plastica Circolare, come parte della sua strategia per la gestione delle plastiche in Europa, con l'obiettivo di aumentare il mercato dell'UE delle plastiche riciclate da 4.9 milioni di tonnellate a 10 milioni di tonnellate entro il 2025. Le sfide associate a questo obiettivo sono innumerevoli, come la massiccia presenza di elementi tossici nei flussi di riciclo, la mancanza di trasparenza riguardo alla composizione dei polimeri e degli additivi nelle plastiche, l'inevitabile riduzione della qualità durante il processo di riciclo (downcycling), le complessità nel riciclare plastica laminata e termoindurente, la difficoltà delle operazioni di raccolta e separazione e le preoccupazioni per la scarsa domanda di mercato delle plastiche riciclate [3].

1.2 Bioplastiche: focus su poliidrossialcanoati, proprietà e usi

Se da una parte le conseguenze negative legate all'utilizzo della plastica appaiono evidenti, dall'altra il legame tra progresso umano e plastica rimane ancora oggi forte. Per superare tali limitazioni, si possono perseguire diverse strade, ma inevitabilmente legate a delle problematiche:

- Uso e produzione più intelligente: diminuiscono i problemi legati alle perdite e alla tossicità, ma non si attenzionano gli impatti sul cambiamento climatico;
- Aumento della circolarità: si superano i limiti del fine vita, ma permangono le difficoltà legate al crescente livello di consumo e il legame con le risorse fossili,
- Uso di risorse biodegradabili: si disaccoppia la plastica dalle fonti fossili, ma si hanno delle limitazioni sull'impiego di questi materiali.

Non esiste una soluzione miracolosa, ma è necessario trovare una sinergia tra le diverse vie [3].

Una valida alternativa è rappresentata dalle bioplastiche, plastiche biobased e biodegradabili. Le cosiddette "plastiche biobase" sono le plastiche parzialmente o interamente derivate da biomassa, le quali permettono di disaccoppiare la plastica dalle risorse fossili, mentre con biodegradabilità si intende l'abilità di essere decomposte da microorganismi (batteri o funghi) in acqua, gas naturali e biomassa [17]. La degradazione avviene sotto specifiche condizioni, la temperatura oscilla tra i 20 [°C] e 60 [°C], il pH tra i 5 e 8, è necessaria la presenza di ossigeno, umidità e minerali [18]. Un esempio di biodegradazione di una bioplastica a contatto con il suolo è riportato nella figura 7:



Figura 7: Biodegradazione dell'acido polilattico (PLA) a contatto con il suolo [19].

L'utilizzo di materie prime rinnovabili per la fabbricazione di plastica biodegradabile si pone in linea con i propositi emanati dall'Unione Europea su cambiamento climatico e bioeconomia. Nell'aprile 2023, i Ministri del Clima, dell'Energia e dell'Ambiente del G7 hanno, infatti, stabilito l'obiettivo ambizioso di ridurre l'inquinamento plastico aggiuntivo a zero entro il 2040 [9].

I biopolimeri possono essere divisi in tre macrocategorie in base ai processi di produzione e al tipo di polimero:

- 1) Biopolimeri sintetizzati direttamente da microrganismi, come i poliidrossialcanoati (PHA);
- 2) Biopolimeri derivanti dalla polimerizzazione chimica di monomeri di origine biologica, come l'acido polilattico (PLA);
- 3) Modifica di polimeri naturali, come cellulosa o amido [20].

Nella figura 8 è riportata una classificazione delle plastiche e bioplastiche in base alla loro natura e alle loro proprietà:

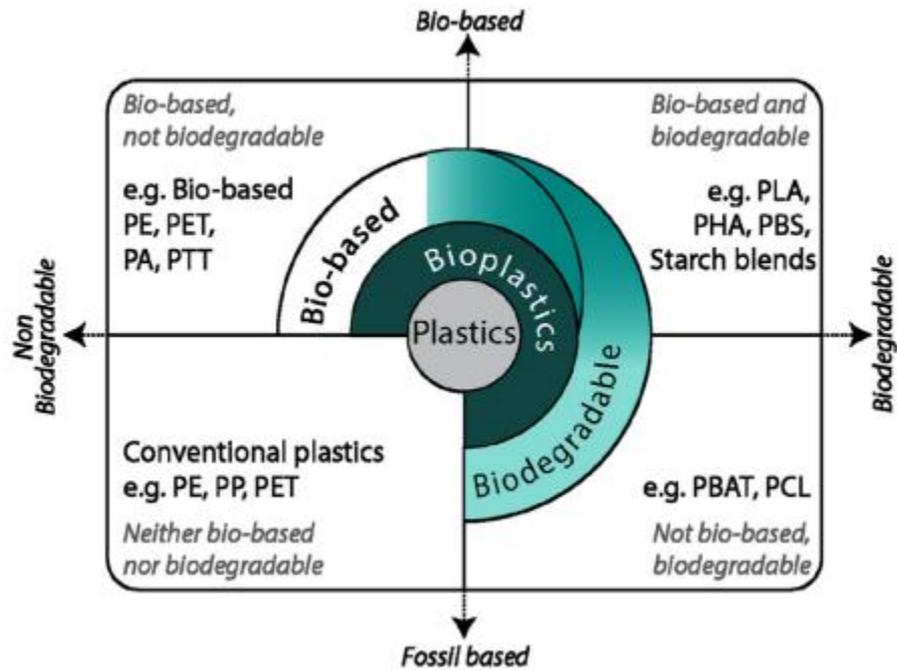


Figura 8: Classificazione e comparazione plastiche e bioplastiche [21].

I PHA sono gli unici poliesteri sintetizzati biologicamente e completamente biodegradabili a presentare caratteristiche termoplastiche, resistenza all'acqua e ai raggi UV paragonabili alla plastica di origine fossile [18], [22], [23]. Si tratta di poliesteri naturali di acidi 3-,4-,5-,6- idrossialcanoici [24]. Il loro peso molecolare rientra nel range tra 5×10^5 e 2×10^6 [Da] [25]. I PHA vengono sintetizzati ed accumulati come fonte di energia all'interno del citoplasma cellulare in forma di inclusioni (granulosomi) che hanno diametri di 0.2-0.5 [μm] (come mostrato nella figura 9) [26].

Le inclusioni possiedono un nucleo amorfo di PHA, circondato da proteine associate, quali sintasi del PHA, depolimerasi, proteine regolatorie e strutturali [27].

Essi presentano bassa solubilità e alto peso molecolare [26].

In condizioni di fermentazione ottimali, la percentuale di PHA nel peso secco delle cellule può superare il 90% del peso totale [27], [28]. Tuttavia, alcuni studi suggeriscono una regolazione delle dimensioni cellulari eseguita proprio dai batteri affinché il volume dei granuli non superi circa il 40% del totale, asserendo che fattori geometrici siano determinanti nel controllo di tali accumuli intracellulari [27].

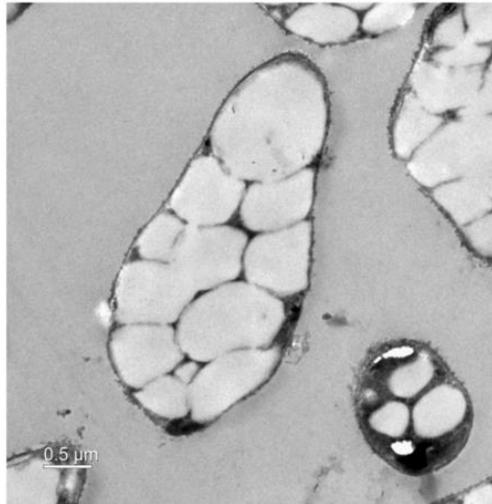


Figura 9: Granuli di PHB (un particolare PHA) accumulati nella cellula batterica [29].

I microrganismi che si distinguono per la produzione di PHA includono *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas sp.* (in particolare *Pseudomonas putida*), *Alcaligenes sp.* (soprattutto *Azohydromonas australica*), *Bacillus megaterium*, *Aeromonas sp.* e *Burkholderia sp.* Tra questi, *Cupriavidus necator* e *Azohydromonas lata* spiccano come i più idonei per la produzione di PHA, con una capacità produttiva eccezionalmente elevata (10.000 t/a di poliidrossibutirrato per *C. necator*) [30].

La formula generale dei PHA è riportata nella figura 10:

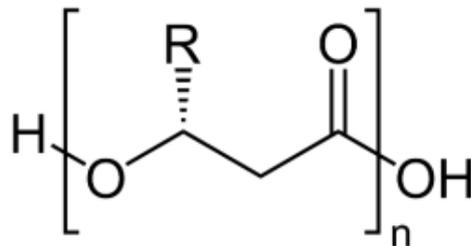


Figura 10: Formula generale dei PHA [19].

I monomeri del PHA sono legati da legami esteri, in base al numero di carboni presenti si ha:

- PHA a catena corta con numero di carboni pari a 3-5;
- PHA a catena media se il numero va da 6 a 14;
- PHA a catena lunga se i carboni sono più di 14 [23].

I PHA esistono come omopolimeri o copolimeri, in base al numero di tipi di monomeri presenti [23].

Dalla figura 10, si nota nella formula generale la presenza di un gruppo laterale R, il quale denota la possibilità di ottenere diversi polimeri [23]. I più comuni sono riassunti nella figura 11:

N value	R group	Name	Abbreviation
1	Methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)	P(3HB)
	Ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)	P(3HV)
	Propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)	P(3HH)
	Pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)	P(3HO)
	Nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)	P(3HD)
2	Hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)	P(4HB)
	Methyl	Poly(4-hydroxyvalerate)	P(4HV)
3	Hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerate)	P(5HV)
	Methyl	Poly(5-hydroxyhexanoate)	P(5HH)
4	Hexyl	Poly(6-hydroxydodecanoate)	P(6HD)

Figura 11: Nomenclatura, gruppi sostitutivi e abbreviazioni dei PHA più comuni [23].

I PHA rappresentano una valida alternativa all'uso delle plastiche tradizionali nei settori packaging, tessile, biomedico ed in misura minore anche nel campo automobilistico, edile, elettronico, nell'agricoltura e nei rivestimenti [20], [31], [32].

La degradazione può avvenire per via aerobica con produzione di CO₂ o anaerobica con rilascio di CO₂ e CH₄ [33]. I tempi di degradazione del PHA sono molto celeri: la degradazione totale avviene in un tempo di soli 2-6 mesi [33]. Già in soli 122 giorni si verifica una perdita in peso del 60% se il PHA è a contatto con il suolo, mentre in 100 giorni si ha una riduzione di peso del 90% se la degradazione avviene in ambiente marino [23].

Inoltre, i PHA rispettano i requisiti per essere classificati come materiali compostabili industrialmente. Il compostaggio è un processo naturale in cui il materiale organico si decompone trasformandosi in humus, una sostanza simile al suolo che funge da ammendante [34]. Il compost può essere di tipo domestico o industriale. Nel compostaggio domestico, i rifiuti organici come scarti alimentari, ritagli di erba e foglie si decompongono lentamente, producendo un compost utile per il giardino. Questo processo può richiedere mesi o addirittura anni, poiché le condizioni non sono controllabili. In Europa, i criteri per la compostabilità domestica sono definiti dalla norma francese NF T 51-800. Il compostaggio industriale, invece, si svolge in diverse fasi mirate a una rapida biodegradazione in condizioni attentamente controllate, ottenendo un compost di alta qualità. Questo metodo consente di trattare una gamma più ampia di materiali, comprese le bioplastiche. In questo caso, i criteri sono stabiliti dalla norma europea EN 13432 [35]. Un materiale plastico compostabile è in grado di degradarsi attraverso processi biologici durante il compostaggio, generando anidride carbonica, acqua, composti inorganici e biomassa. Questo processo non lascia residui visibili o tossici. Di conseguenza, tutte le plastiche compostabili sono biodegradabili, ma non tutte le plastiche biodegradabili sono compostabili [34].

Un altro grande vantaggio legato all'uso delle bioplastiche è l'assenza del fenomeno di rilascio di microplastiche, al contrario delle plastiche di origine fossile.

I problemi principali legati alle plastiche biodegradabili sono le condizioni stringenti sotto le quali avviene la decomposizione ed il rilascio di gas metano durante i processi di biodegradazione [8]. Nonostante ciò, vari studi di Life Cycle Analysis dimostrano che la produzione di biopolimeri generici porta ad una riduzione di gas serra rispetto alla plastica di origine fossile, con il PHA tale riduzione arriva fino al 50% in base a feedstock e al processo di lavorazione utilizzato [32]. Produrre 1 Kg di PHA salva 2.9 Kg di CO₂ rispetto alla produzione della stessa quantità di polietilene [23].

La produzione su larga scala dei PHA è ostacolata fortemente dal costo, il quale dipende dalla fonte di carbonio utilizzata (più del 50%), dalla complessità e grado di sviluppo del processo di lavorazione [24], [36].

Utilizzando risorse carboniose economicamente vantaggiose, che costituiscono oltre il 50% del costo finale, si potrebbe ottenere una significativa riduzione dei costi complessivi, favorendo così una produzione su larga scala [22], [24], [36], [37]. Dunque, anziché affidarsi a fonti nobili come carboidrati puri, alcani e acidi grassi, sono state esplorate fonti di carbonio economiche come sottoprodotti industriali, tra cui glicerolo di scarto, siero di latte, o residui agricoli come la bagassa di canna da zucchero, la segatura o la biomassa forestale [25].

I vantaggi derivanti dalla sostituzione dei polimeri con i biopolimeri sono svariati: cambio nell'uso del suolo prevenendo l'abbandono di terre agricole, riduzione di emissioni di gas serra e di utilizzo di risorse fossili, riduzione dell'impatto ambientale del fine vita della plastica [32].

Grazie ai vantaggi dell'uso di PHA e alle loro ottime proprietà, il mercato di questi poliesteri è in forte espansione: nel 2025 è proiettato ad avere un mercato di 27.9 miliardi di dollari [30], la domanda di produzione potrebbe raggiungere i 7.5 milioni di tonnellate nel 2029 [33].

1.2.1 Breve introduzione al polidrossibutirrato (PHB)

Il primo polimero tra i PHA ad essere isolato e caratterizzato è stato il PHB, precisamente negli anni 20 del '900. Si tratta del biopolimero più largamente studiato, sintetizzato da alcuni microorganismi come fonte di risorsa carboniosa quando soggetti a condizioni di stress [28], [38]. Tali condizioni si presentano quando la crescita microbica avviene con bassi livelli di ossigeno, azoto, ioni come fosfati o solfati [22].

I microorganismi capaci di sintetizzare PHB sono più di 300 [22] tra cui *Azotobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, and *Rhodospirillum* [38].

La biosintesi di PHB coinvolge tre passaggi principali e tre enzimi chiave: la 3-chetotiolasi, l'acetoacetil-CoA reduttasi e la sintasi di PHB, codificati rispettivamente dai geni phaA, phaB e phaC. Le fonti di carbonio, come i carboidrati, sono convertite nel precursore acetil-CoA, il quale viene integrato nel ciclo di sintesi-depolimerizzazione di PHA. L'inizio della sintesi di PHB coinvolge la condensazione di due molecole di acetil-CoA per formare acetoacetil-CoA, seguita dalla riduzione di acetoacetil-CoA a 3-idrossibutirryl-CoA. Infine, il 3HB-CoA viene polimerizzato per produrre il PHB. La reazione coinvolta in ciascun step è catalizzata dall'azione, in ordine cronologico, di phaA, phaB (dipendente a sua volta da NADH) e phaC [38].

Il processo è riassunto nella figura 12:

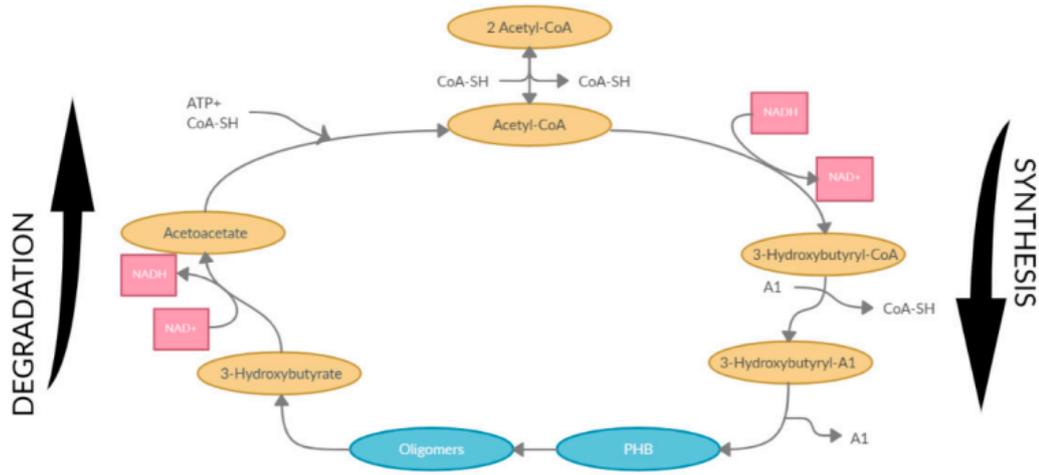


Figura 12: Pathways metabolici di sintesi e degradazione del PHB [28].

La struttura generale del PHB è riportata nella figura 13:

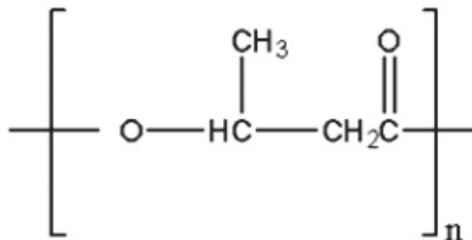


Figura 13: Struttura chimica del poli-3-idrossibutirato [39].

Dal punto di vista delle proprietà meccaniche, i materiali PHB tendono ad essere rigidi e fragili, presentando una stabilità termica ridotta e un'elevata cristallinità [28]. Le proprietà meccaniche del PHB, come il modulo di flessione e la resistenza alla trazione, sono paragonabili a quelle del polipropilene, polimero di origine fossile. Inoltre, il PHB presenta addirittura dei vantaggi rispetto ai polimeri sintetici: la sua permeabilità alla barriera è superiore sia al polietilene (PE) che al polipropilene (PP), risulta essere più rigido e meno flessibile del PP. Inoltre, il PHB mostra buone proprietà di barriera rispetto al tereftalato di polietilene (PET) e al cloruro di polivinile (PVC) [28].

Nel dettaglio, le proprietà meccaniche sono riassunte nella tabella 1:

Tabella 1: Proprietà meccanica del PHB, modificato da [28].

Proprietà meccaniche	P3HB
Modulo di tensione [GPa]	3-3.5
Forza di tensione [MPa]	20-40
Allungamento alla rottura [%]	5-10
Grado di cristallinità [%]	50-60
Temperatura di fusione [°C]	165-175
Temperatura di transizione vetrosa [°C]	5-9

Mantenendo, inoltre, una completa biodegradabilità e biocompatibilità, il PHB è adoperato in una vasta gamma di applicazioni: materiali per imballaggi, sacchetti, contenitori e articoli monouso come tazze e pannolini. In aggiunta, è impiegato in campo medico come materiale chirurgico e come veicolo biocompatibile per il rilascio a lungo termine di farmaci, insetticidi e fertilizzanti [22].

Tuttavia, il costo delle bioplastiche non è ancora competitivo rispetto alle controparti di natura fossile.

Una panoramica dei costi ne evidenzia le differenze, come riportato nella tabella 2:

Tabella 2: Confronto prezzi tra bioplastiche e plastiche di origine fossile.

MATERIALE	COSTO	RIFERIMENTO
PHB	3 €/Kg	[40]
BIOPOL™	14.73 €/Kg	[41]
PLA	4.60- 11.05€/Kg	[41]
Polimeri a base di amido	4.60- 11.05 €/Kg	[41]
PP	1 €/Kg	[40]

Anche in questo caso, un utilizzo di fonti carboniose economicamente convenienti porterebbe il PHB a godere di maggiore diffusione [40]. I costi di produzione potrebbero essere ridotti utilizzando scarti vegetali e animali come substrato carbonioso, che, a prezzi contenuti, fornirebbero i carboidrati necessari per la sintesi del PHB. Gli zuccheri potrebbero anche essere estratti da alghe o microalghe integrando un modello di bioraffineria, in cui dalla biomassa si ricavano diverse molecole per la produzione di una vasta gamma di prodotti, tra cui le bioplastiche. Questo approccio consente di coinvolgere vari settori industriali, rendendo il modello economicamente vantaggioso. Un'altra strategia per ridurre i costi di produzione è l'impiego di batteri che non richiedono processi di sterilizzazione. Ad esempio, i batteri alofili, vivendo in ambienti ad alta concentrazione salina, prevenendo la contaminazione batterica, permettendo la produzione di PHB senza i costi associati alla sterilizzazione.

1.3 Ceppi batterici che producono biopolimeri: *C. necator* DSM 545 e *H. halophila* CCM 3662

Uno dei batteri maggiormente utilizzati per l'ottenimento di biopolimeri è *Cupriavidus necator*, noto anche in letteratura come *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Hydrogenomonas eutropha* e *Wautersia eutropha* [38]. Si tratta di un batterio gram-negativo isolato per la prima volta nel 1960 vicino Gottingen [30]. Questo batterio dimostra una notevole versatilità poiché è in grado di crescere sia in condizioni autotrofe che eterotrofe. Quando non sono disponibili composti organici, il batterio attiva la fissazione autotrofa del CO₂ attraverso il ciclo di Calvin-Benson-Bassham (CBB) e utilizza le idrogenasi NiFe per ossidare l'idrogeno (H₂) [30]. Durante la crescita eterotrofa, le fonti di carbonio organico utilizzabili da *C. necator* sono svariate, tra cui zuccheri, amminoacidi, acidi grassi, alcoli e composti aromatici, nonché intermedi del ciclo di Krebs [30], [42].

Si tratta di uno dei batteri più ampiamente studiati e il primo batterio ad essere commercializzato per la produzione di PHB da 'Imperial Chemical Industries' [38].

I monomeri del PHB sintetizzato da *C. necator* sono monomeri a catena corta con 3-5 carboni [38].

C. necator mostra la notevole capacità di accumulare fino al 90% del peso secco delle sue cellule in PHB, garantendo nel contempo consistenti rese di biomassa [30].

Il processo di biosintesi del biopolimero è stato compreso tramite approfonditi studi del genoma del batterio *C. necator*. Nello specifico, i suoi enzimi biosintetici a tre fasi sono stati individuati negli anni 80 e successivamente clonati dal ceppo selvatico, cosiddetto "wild type", *C. necator* H16 in tre distinte istanze di ricerca [30].

Studi genetici e metabolici hanno ricevuto una spinta positiva dopo che il genoma del batterio wild-type è stato sequenziato e pubblicato incoraggiando modifiche genetiche per ampliare lo spettro di applicazioni possibili [30].

C. necator H16 è in grado di crescere solo su fruttosio o N-acetilglucosammina. Il ceppo wild type manifesta una limitata capacità di utilizzare fonti di carbonio diversificate come saccarosio, xilosio, lattosio, mannosio, glucosio [43].

Dunque, non essendo il ceppo wild type in grado di assimilare glucosio [40], mannosio e arabinosio, in questo lavoro di tesi è stato utilizzato il ceppo adattato *C. necator* DSM 545. Questo batterio è in grado di utilizzare il glucosio grazie al gene che codifica per l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Questo enzima facilita la trasformazione del glucosio-6-fosfato in 6-fosfogluconato, concomitante alla riduzione di una molecola di NADP⁺ a NADPH, un cofattore fondamentale per la sintesi di PHB [42].

Un altro batterio capace di sintetizzare biopolimeri con elevata efficienza è *Halomonas halophila*, in passato conosciuto come *Deleya halophila*. Si tratta di un batterio strettamente aerobico Gram-negativo alofilo, isolato per la prima volta ad Alicante [44].

Essendo parte della categoria alofila, *H. halophila* è in grado di crescere in ambienti con alte concentrazioni di sale [44]. Essi vengono classificati, in base alla loro tolleranza alla salinità ottimale per la crescita, in alofili lievi, moderati ed estremi. Mentre gli alofili lievi prosperano in concentrazioni di sale dell'1-6% (p/v), quelli moderati ed estremi possono sopravvivere in soluzioni salmastre con concentrazioni del 7-15% (p/v) e superiori al 15% (p/v) rispettivamente. Come adattamento all'ambiente ipersalino circostante, gli alofili adottano una strategia di sopravvivenza che prevede l'accumulo di elevate concentrazioni di sali di potassio o di soluti organici solubili all'interno della cellula batterica [45]. Questi composti permettono il mantenimento di valori ottimali di volume della cellula, concentrazione di elettroliti e pressione di turgore, contrastando l'effetto osmotico che potrebbe causare l'elevata concentrazione di sale nel terreno di crescita, con conseguente lisi cellulare [46].

Questa proprietà rende questa categoria molto interessante dal punto di vista industriale: la crescita in condizioni di elevata concentrazione di sale riduce, infatti, il rischio di contaminazione batterica permettendo di risparmiare sugli ingenti costi in termini energetici dei processi di sterilizzazione [44], [47].

Tuttavia, l'uso di materiali delle attrezzature è limitato a causa della corrosione dovuta alla presenza dei sali, è necessario utilizzare plastica, ceramica, acciaio al carbonio, oppure trattare frequentemente la strumentazione al fine di prevenire la corrosione [45].

Inoltre, gli alofili permettono l'uso di acqua marina, la quale è economica, per la loro crescita e i composti accumulati per fronteggiare l'alta osmolarità come ectoina o trealosio rappresentano interessanti potenziali sottoprodotti commercializzabili [45], [47].

Questo batterio presenta un'estrema versatilità nell'utilizzo di diverse fonti di carbonio, rendendolo un valido candidato per la produzione di PHB tramite uso di substrati economici [47].

Alcuni studi riportano una produzione di PHA pari al 79% del proprio peso secco da parte del ceppo wild-type *Halomonas sp* SF2003 utilizzando sia fonti carboniose convenzionali che alternative [45], [48].

L'attività di biosintesi di PHA da parte di *Halomonas sp*. SF2003 è legata ai geni *phaA*, *phaB*, *phaC1*, *phaC2* e *phaR*, i quali codificano gli enzimi che partecipano al metabolismo del PHA. I geni responsabili dell'acetil-CoA acetiltransferasi (*phaA*), dell'acetoacetil-CoA reductasi (*phaB*) e delle sintasi di PHA (*phaC1* e *phaC2*) non sono disposti in un unico operone [45], [48]. Inoltre, i geni *phaC1* e *phaC2* presentano dimensioni atipiche, incoraggiando ulteriori studi su entrambi i geni [48].

Gli *Halomonas* accumulano PHA a catena corta [45].

Le caratteristiche morfologiche, molecolari, cinetiche e biotecnologiche della biosintesi di PHA da parte di questo ceppo sono ancora oggi oggetto di studi [44].

1.4 Sfide per la produzione di PHB: uso di scarti come fonti carboniose

Vari studi riportano l'utilizzo di scarti industriali per la produzione di biopolimeri al fine di abbattere i costi e rendere la filiera della bioplastica competitiva con quella della plastica di origine fossile.

In questo assortimento di substrati di scarto, si trovano numerosi sottoprodotti industriali: residui come il glicerolo, materiali ad alto contenuto di zuccheri come la melassa, l'amido e la lignocellulosa, sostanze con un elevato contenuto di carbonio, come oli di soia, palma e mais [30].

Alcuni esempi di applicazione dei principi di economia circolare sono illustrati nella tabella 3:

Tabella 3: Esempi di uso di scarti per la produzione di biopolimeri.

Scarto utilizzato	Provenienza	Alcuni vantaggi	Alcuni svantaggi	Riferimento
Scarti lignocellulosici	Industria agricola, cartaria, birrifici	Abbondanza, basso costo della biomassa	Elevati costi di pretrattamento, presenza di composti inibitori	[29], [38], [40]
Scarti lipidici	Industria alimentare (olio esausto) e produzione di biodiesel	Alto contenuto di glicerolo e acidi grassi	Presenza di composti inibitori	[38], [40]
Emissioni di gas C1: CO ₂ , CO, CH ₄	Industrie agricole, estrattive, petrolifere e del gas	Mitigazione emissioni in atmosfera, riduzione costi tasse sulle emissioni	Basso coefficiente di trasferimento di gas nella coltura, esplosività della miscela, ciclo di Calvin energeticamente inefficiente	[38], [40]
Melasse	Industria dolciaria	Alta concentrazione di saccarosio (40%)	Elevati costi di idrolisi (la maggior parte dei batteri non hanno gli enzimi idrolasici necessari per metabolizzare il saccarosio), presenza di impurità	[38], [40]
Macro e micro-alghe	Alghicoltura	Crescita in poco spazio, evita la competizione con filiera alimentare, utilizzo di acqua dolce o marina	Complessi processi di pretrattamento, poca disponibilità di biomassa	[33]

Sciroppo di glucosio e fruttosio	Industria cerealicola	Basso costo dello scarto, alte rese di crescita e produzione di PHB	Non riportati	[42]
Sciroppo di glucosio e fruttosio+Acetato da fermentazione di CO ₂ -H ₂	Industria cerealicola	Mitigazione emissioni in atmosfera, alte rese di crescita e produzione di PHB, si evita esplosività	Tempi di processo lunghi	[42]

Altri studi riportano anche le potenzialità date dall'uso di altri scarti quali: amido da patate di scarto, borlanda di canna da zucchero, paglia di risaia, paglia di grano, biomassa di Kenaf, crusca di frumento, scarti di barbabietola, fondi di caffè esausti, fecce di vino, siero di formaggio, segatura [30], [38], [45], [47]. Nella figura 14 sono rappresentati alcuni dei sottoprodotti utilizzati al giorno d'oggi per la produzione di bioplastica:



Figura 14: Esempi di scarti utilizzati per la produzione di biopolimeri [19].

1.5 Microalghe come substrato per estrazione di carboidrati: strategia di bioraffineria

Attualmente l'industria delle bioplastiche derivate da colture terrestri si trova in competizione con la filiera alimentare, richiedendo terreni fertili, acqua e fertilizzanti, e subendo l'impatto delle condizioni meteorologiche. Tale approccio non risulta sostenibile per la produzione a lungo termine, nonostante i vari sforzi commerciali per la produzione su larga scala di plastiche biologiche. A tal proposito, le alghe emergono come una promettente alternativa per la produzione di biopolimeri con l'attuazione di un modello di bioraffineria in quanto non colliderebbero con le problematiche analizzate precedentemente.

In una bioraffineria, attraverso tecnologie complesse per la lavorazione della biomassa, è possibile ottenere un ampio spettro di prodotti commerciabili [49]. Questo renderebbe la coltivazione delle alghe economicamente interessante.

Il settore delle alghe offre, infatti, numerosi vantaggi: crescono in poco spazio e su terreni di coltura poveri, evitando la competizione con la filiera alimentare, tollerano sia acqua dolce che marina [33], necessitano di poche sostanze nutritive per la loro crescita [45]. Inoltre, le alghe, essendo organismi fotosintetici, sono in grado di fissare la CO₂, che viene utilizzata insieme ad acqua e luce solare per la produzione di varie sostanze organiche [50], [51]. Questo le rende una promettente tecnologia di cattura e utilizzo di anidride carbonica, mitigando il suo impatto ambientale.

Sono state identificate più di 30000 specie diverse di alghe, alcune delle quali sono state commercializzate su larga scala per la produzione di cibo, mangime, probiotici, medicinali, cosmetici [33]. Esse sono costituite da carboidrati (sopra il 20%), proteine (25-60%), lipidi (25%) e minerali [51], rendendole una valida alternativa per la produzione di energia e prodotti ad alto valore aggiunto.

In base a morfologia e dimensioni, le alghe si suddividono in microalghe e macroalghe, le prime unicellulari, le seconde multicellulari [50].

Le macroalghe, che crescono rapidamente e producono voluminose biomasse, contengono una varietà di carboidrati, tra cui cellulosa, laminarina, carragenina, mannano, mannitolo, alginato e ulvano, assenti nella biomassa lignocellulosica [50]. La precisa composizione chimica dipende fortemente dalla distribuzione geografica e dalla stagione di raccolta; difatti acqua, temperatura, salinità, luce, nutrienti, minerali influenzano le percentuali con cui macromolecole sono presenti [52].

Le macroalghe si suddividono in tre categorie al variare dei pigmenti: *Rhodophyta* (alghe rosse), *Phaeophyta* (alghe brune) e *Chlorophyta* (alghe verdi) [50]. Nella figura 15 è possibile apprezzare la differenza di colore:

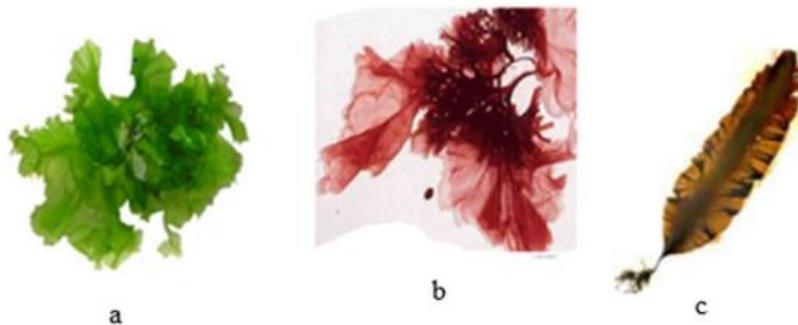


Figura 15: Macroalghe: a) *Ulva* verde, b) *Porphyra* rossa, c) *Saccharina latissima* marrone [52].

Per quanto concerne la classificazione delle microalghe, queste si distinguono in mobili, grazie alla presenza di flagelli, o immobili [52].

Le microalghe, sia autotrofe che eterotrofe, manifestano differenti requisiti nutrizionali per il loro sviluppo cellulare. Le autotrofe dipendono esclusivamente da componenti inorganici come CO₂, sali e dalla luce solare, mentre le eterotrofe necessitano di un substrato organico come fonte di energia e assenza di luce [53].

Esistono anche alcune specie di microalghe che possono utilizzare una fonte di carbonio organico in presenza di luce, chiamate mixotrofe.

Le microalghe sono categorizzate come procarioti ed eucarioti in base alla presenza o assenza degli organelli. I procarioti non sono dotati di cloroplasti, mitocondri e nuclei, ma presentano clorofilla ed un elevato contenuto proteico.

Le microalghe sono ulteriormente divise in diverse categorie in base alla loro tassonomia, tra cui alghe blu-verdi, verdi, giallo-verdi, rosse, brune e dorate [54].

Uno dei vantaggi dell'uso delle alghe unicellulari è dato dalla loro capacità di crescere in tempi brevi, difatti usualmente raddoppiano la loro biomassa entro 24 ore, durante la crescita esponenziale il tempo di raddoppio può arrivare a sole 3.5 ore.

In linea generale, la composizione prevede un contenuto di proteine pari a 40-60%, carboidrati 8-30%, lipidi 5-60% e un quantitativo variabile di composti come pigmenti, antiossidanti, acidi grassi, vitamine [52].

I carboidrati presenti nelle microalghe si trovano prevalentemente sotto forma di cellulosa e amido, i quali sono legati alla parete cellulare. Quest'ultima è composta da uno strato esterno e uno strato interno: il primo formato da pectina, agar o alginato, mentre il secondo comprende emicellulosa, cellulosa e glicoproteine [50]. Nella figura 16 è possibile apprezzare la struttura della parete cellulare delle microalghe:

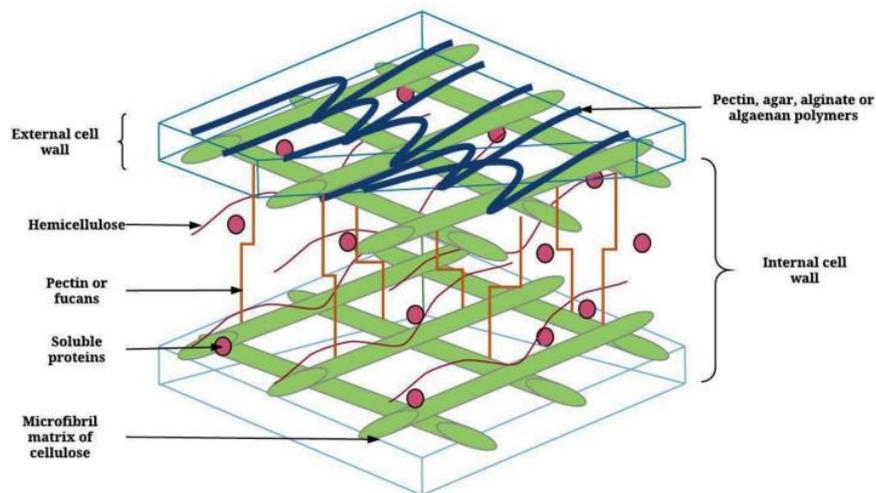


Figura 16: Struttura della parete cellulare delle microalghe [55].

Esse hanno l'abilità di produrre un grande quantitativo di lipidi, valori comuni arrivano al 20-50% del loro peso secco, superiori di 10-20 volte rispetto a quelli delle colture comuni come le palme da olio [52], [56].

Il grande apporto lipidico le rende dei perfetti candidati per la produzione di numerosi biocarburanti, come biodiesel, bioidrogeno, biometano, i quali potrebbero rimpiazzare i combustibili fossili garantendo sicurezza energetica e contrastando il cambiamento climatico [52].

Le microalghe presentano un alto rapporto superficie su volume corporeo, questa proporzione permette l'assorbimento di ingenti quantitativi di nutrienti. Il loro meccanismo di fotosintesi è simile a quello delle piante superiori, ma l'efficienza è 10-50 volte superiore a quella delle piante terrestri [56].

Nella figura 17 un esempio di microalga:



Figura 17: Microalga: *Anabaena spiroides* [52].

Le microalghe possono essere coltivate in sistemi aperti chiamati ‘vasche aperte’ o in sistemi chiusi conosciuti come fotobioreattori.

Le vasche aperte consistono in laghetti di tipo naturale o artificiale; in questo ultimo caso si costruiscono delle vasche di profondità pari a 0.2-0.5 [m] configurate a circuito (raceways) dotate di sistema di agitazione. Hanno il vantaggio di avere un basso costo di capitale, ma presentano un rischio alto di contaminazione da altri microorganismi. Inoltre, la produttività della biomassa di microalghe è bassa. Un ulteriore svantaggio di questo sistema è dato dall’ evaporazione dell’acqua; infatti, l’acqua esposta all’atmosfera è soggetta a riscaldamento dall’ambiente circostante con conseguente passaggio di stato [53]. Fattori come temperatura elevata, bassa umidità relativa, vento, agitazione accelerano il processo di evaporazione, causando un’ingente perdita di acqua. Nelle figure 18 e 19, un esempio di impianto di microalghe su vasche aperte, nello specifico impianto Cyanotech ubicato alle Hawaii:



Figura 18: Impianto Cyanotech, Hawaii [57].



Figura 19: Dettaglio dell'impianto Cyanotech, Hawaii [57].

I fotobioreattori sono reattori dove avvengono reazioni fotobiologiche, sono costituiti da un tubo in plastica o vetro trasparente disposto in posizione orizzontale, verticale, inclinato o può assumere una forma elicoidale. Economicamente il sistema chiuso è molto più costoso di quello aperto; tuttavia, necessita di meno spazio per la coltivazione, la produttività è elevata e il rischio di contaminazione rimane estremamente basso, è possibile infatti condurre una crescita fortemente controllata [53].

I costi a confronto prevedono €3-10 al kg di peso secco nei fotobioreattori contro €0.3-1.8 al kg nelle vasche aperte [58].

Il reattore è raffigurato nella figura 20, mentre un esempio di impianto industriale è rappresentato in una delle foto presenti al 'WORLD PRESS PHOTO CONTEST 2023' (figura 21):



Figura 20: Fotobioreattore [59].



Figura 21: Un operatore esegue un controllo di routine di un fotobioreattore in un impianto di microalghe a Reykjanesbær in Islanda, il 13 luglio 2020 [60].

Per superare i limiti di entrambi i sistemi, le aziende stanno esplorando la possibilità di usare un sistema ibrido: in prima battuta viene utilizzato il fotobioreattore chiuso per controllare la contaminazione da altri microorganismi e per ottenere una produzione continua. Successivamente, le microalghe raggiungono le vasche aperte per spingere la riproduzione cellulare ed ottenere una quantità ingente di biomassa [53].

La bioplastica, in questo caso, può essere prodotta in maniera diretta o indiretta. Nel primo caso si ottiene una plastica ibrida data da un mix di biomassa algale fusa insieme a plastica di origine fossile. In questo modo, diminuisce il quantitativo di risorse fossili necessario, diminuendo sia costi che impatto ambientale. Le proprietà meccaniche dipendono dal rapporto alga/ plastica, al diminuire di questo aumenta la resistenza alla trazione.

Nel secondo caso, sono estratti i carboidrati dalla biomassa algale per permettere la fermentazione batterica al fine di produrre PHA e PHB [33].

L'approccio indiretto rappresenta un'ottima possibilità di attuare una strategia di bioraffineria.

In questo caso l'abbattimento dei costi della produzione di bioplastiche non deriva dall'uso di uno scarto o sottoprodotto, ma dalla possibilità di produrre svariati composti da una biomassa comune che trovano diverse applicazioni industriali.

Questo rappresenta un approccio importante di combinazione di sostenibilità ed economia circolare.

Sia le macro che le microalghe per la loro crescita necessitano di elementi essenziali (macronutrienti) quali C, N, O e di trace elements (micronutrienti). Durante la crescita, questi microorganismi sono in grado di produrre macromolecole economicamente interessanti come carboidrati, lipidi, proteine. Dunque, si potrebbero abbracciare diversi settori industriali, evitando spreco di biomassa e rendendo l'industria economicamente interessante.

In quest'ottica, i polisaccaridi con concentrazioni pari a 5-23 % possono essere utilizzati come fonte di carbonio per la produzione di biopolimeri [45]; la parte lipidica potrebbe essere utilizzata per la produzione di biocarburanti; la parte vitaminica e proteica per la produzione di molecole ad alto valore aggiunto.

Rahman et al. propongono uno schema di potenziale bioraffineria partendo da microalga con l'intento di produrre diversi flussi di prodotti [61], come riassunto nella figura 22:

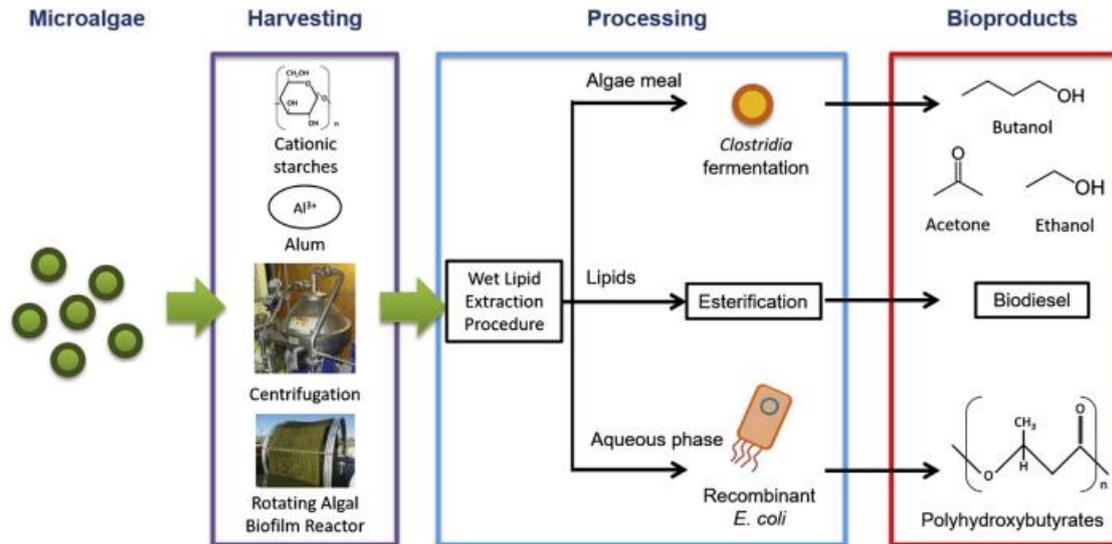


Figura 22: Proposta di bioraffineria [61].

In questo studio, le microalghe (*Scenedesmus obliquus*) sono coltivate in bioreattori e raccolte tramite flocculanti cationici. Il fulcro del modello è la Procedura di Estrazione dei Lipidi a Umido (WLEP), che trasforma la biomassa delle microalghe in tre prodotti distinti. Nella prima fase, l'74-77% dei lipidi transesterificabili viene estratto e convertito in biodiesel. La seconda fase utilizza la biomassa idrolizzata per produrre acetone, butanolo ed etanolo tramite fermentazione anaerobica. Infine, la fase acquosa rimanente viene impiegata per la coltivazione di *E. coli* ricombinante con lo scopo di produrre PHB [61].

1.5.1 Focus su *Phaeodactylum tricornutum*

Una delle più importanti classi di microalghe in ambiente marino e di acqua dolce sono le diatomee, alghe unicellulari del fitoplancton eucariotico, le quali esistono da oltre 180 milioni di anni, con dimensioni che variano da 1 [µm] a 200 [µm] [62].

Si stima che il numero di specie di diatomee sia compreso tra 1800 e 200000, rendendole una delle classi di alghe più diversificate e abbondanti [62], [63].

Si trovano diffusamente in tutti gli habitat acquatici, inclusi quelli lenticoli (come laghi e stagni), lotici (come fiumi e torrenti) e nelle aree sabbiose [63].

Una caratteristica distintiva delle diatomee è data dalla loro parete cellulare principalmente costituita da silice e altri composti organici, che conferisce loro forme e dimensioni diverse [62], [63]. La parete cellulare, conosciuta con il nome di frustulo, è dotata di una combinazione di macro e mesoporosità data dalla presenza di diversi pori (areole) e spine [64], [65], come mostrato nella figura 23.

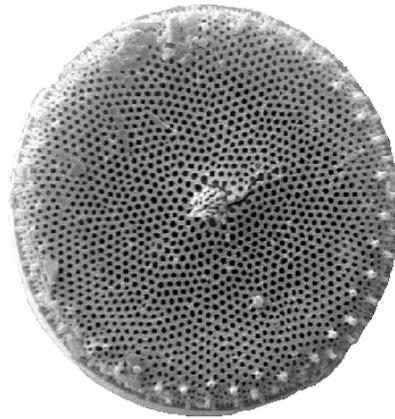


Figura 23: Parete cellulare di una diatomea [64].

Il frustulo svolge diverse importanti funzioni:

1. Protezione dalla fotoinibizione: protegge le diatomee dai danni causati da una luce troppo intensa;
2. Assorbimento dei nutrienti: facilita la raccolta e l'utilizzo dei nutrienti necessari;
3. Gestione del tasso di affondamento: regola quanto velocemente le diatomee affondano nell'acqua e gestisce la loro posizione nella colonna d'acqua, fattori importanti per il loro movimento;
4. Barriera contro i predatori: ha la funzione di proteggerle fisicamente contro gli attacchi dei predatori [63].

La struttura del frustulo delle diatomee è simile ad una scatola con coperchio. Comprende una parte superiore più ampia, chiamata epiteca, ed una parte inferiore più piccola, chiamata ipoteca. Il bordo verticale della parte superiore, chiamato epicingolo, si sovrappone leggermente al bordo della parte inferiore, conosciuto come ipocingolo. L'epicingolo e l'ipocingolo, insieme a una o più bande che le connettono, formano il cingolo, ovvero la struttura che tiene insieme le due metà del frustulo. Una sua rappresentazione è riportata nella figura 24.

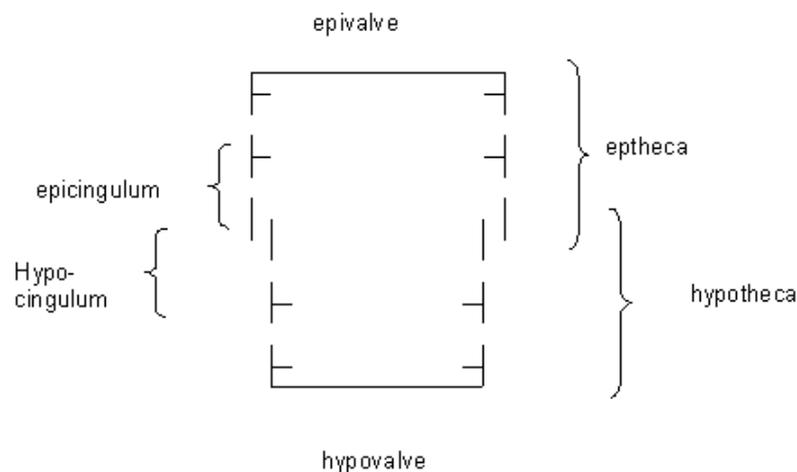


Figura 24: Struttura dei frustuli delle diatomee.

L'interno del frustulo è composto da uno strato di citoplasma che avvolge un grande vacuolo centrale: vescicola contenente una soluzione acquosa chiamata succo vacuolare. All'interno del citoplasma si trova un nucleo diploide (con due set di cromosomi) e diversi plastidi pigmentati: organelli coinvolti nei processi di fotosintesi (cloroplasti) e in quelli di accumulo (leucoplasto) [64].

I cloroplasti delle diatomee, organuli all'interno dei quali si svolge la fotosintesi clorofilliana, contengono una varietà di pigmenti, tra cui la clorofilla, c1 e c2, e xantofille e carotenoidi. Tra i carotenoidi, spicca la presenza di fucoxantina: le diatomee marine sono in grado di accumularne una quantità fino a dieci volte superiori rispetto ad altre alghe.

Tra i possibili composti organici presenti nei leucoplasti compaiono carboidrati e lipidi [62]. Essi sono i metaboliti adoperati per lo stoccaggio di energia, con i primi che includono una varietà di acidi grassi e lipidi, mentre i secondi possono essere insolubili o solubili [62].

I frustuli delle diatomee, con la loro particolare architettura e ampia area superficiale, possono fungere potenzialmente da modelli per la realizzazione di elettrodi. La superficie delle diatomee può presentare, infatti, diverse funzionalità, come gruppi -COOH, -NH₂, -OH e -SiOH, consentendo l'immobilizzazione di vari composti attraverso interazioni con questi gruppi funzionali [65].

La loro composizione biochimica e la capacità di prosperare in diversi ambienti acquatici senza necessità di terreni fertili rendono le diatomee un grande potenziale biotecnologico e industriale [62].

Tra le diatomee marine, *Phaeodactylum tricornutum* emerge come una delle specie maggiormente studiate, con il suo genoma completamente sequenziato nel 2008. Questa diatomea pennata marina appartiene alla divisione delle alghe brune, Bacillariophyceae di Heterokontophyta [62].

Al giorno d'oggi, questa diatomea è prodotta da 8 aziende con una produzione annua di 4 tonnellate e una produttività di 0.03-1.7 [g/L*d].

Nelle colture miste domina sulle altre specie di microalghe poiché in grado di tollerare alte intensità di pH e luce, oltre a poter crescere anche in condizioni di luce ridotta [58]. Numerosi studi indicano una composizione chimica, sotto condizioni ordinarie di coltivazione, di circa il 36,4% proteine, il 26,1% carboidrati, il 18,0% lipidi e il 15,9% ceneri sul peso secco. *P. tricornutum* presenta tre morfotipi principali: ovale, triradiato e fusiforme [62], raffigurate nella figura 25:



Figura 25: Morfotipi di *Phaeodactylum tricornutum*: triradiata, fusiforme e ovale [62].

P. tricornutum è nota per essere utilizzata industrialmente per la produzione di fucoxantina da parte di AlgaTechnologies in Israele, e per la produzione di acido eicosapentaenoico (EPA) da parte di Simris in Svezia [58], [62]. Inoltre, estratti di *P. tricornutum* ed estratti oleosi ricchi di EPA sono stati proposti per l'autorizzazione come

nuovi alimenti presso l'Unione Europea, con le relative valutazioni attualmente in corso [62].

La *P. tricornutum* sembra apprestarsi molto bene al concetto di bioraffineria. Branco-Vieira et al. propongono la produzione di una vasta gamma di prodotti quali, fucoxantina a scopo nutraceutico e farmaceutico, proteine per il settore dei mangimi, biodiesel e bioetanolo per scopi energetici, biosilicati per il settore edile [49]. Questa proposta è riassunta nella figura 26:

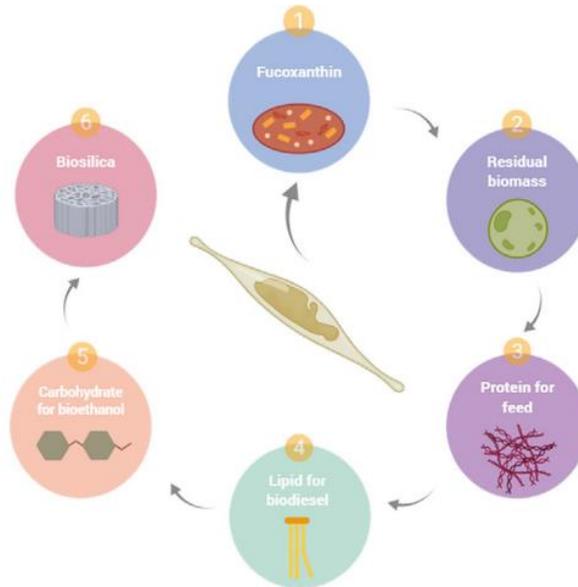


Figura 26: Strategia di bioraffineria partendo da *P. tricornutum* [49].

Lo studio descrive tutti i passaggi per la realizzazione della bioraffineria: dalla coltivazione in bioreattori, alla raccolta tramite centrifugazione sino ai processi di pretrattamento. In seguito, dalla microalga è estratta la fucoxantina e dal residuo la componente proteica. Successivamente, dal residuo di biomassa ottenuto dopo le prime due estrazioni, si ottengono lipidi, carboidrati e silicati.

Infine, i lipidi sono trasformati in biodiesel tramite transesterificazione, i carboidrati in bioetanolo mediante fermentazione [49].

Un altro modello di bioraffineria per la produzione di diverse biomolecole a partire da *P. tricornutum* propone uno schema di procedure di estrazione multistadio. Dopo un primo step di pretrattamento, la microalga è sottoposta ad un'estrazione acquosa con la quale si ottengono proteine, carboidrati e pigmenti solubili in acqua. Il terzo step prevede un'estrazione in etanolo per il recupero della restante parte dei pigmenti. Infine, è eseguita un'estrazione in presenza di una miscela cloroformio/ metanolo per l'estrazione dei lipidi [66].

Nella figura 27 sono descritti i metodi utilizzati da Zhang et al. per l'estrazione, isolamento, purificazione e identificazione di 3 biomolecole a partire da *P. tricornutum*. Mediante una sequenza di estrazioni selettive che prevedono utilizzo di etanolo e n-esano, dalla microalga si ottengono il carotenoide fucoxantina, il polisaccaride crisolaminarina, l'acido grasso eicosapentaenoico [67].

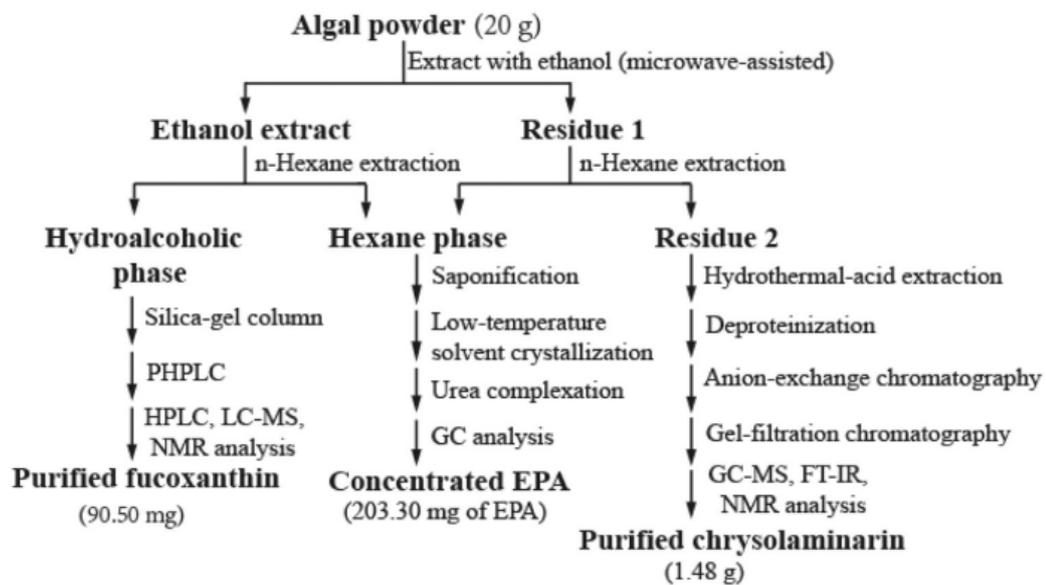


Figura 27: Strategia di bioraffineria partendo da *P. tricornutum* [67].

1.5.2 Analisi pretrattamento della microalga *Phaeodactylum tricornutum*

Le microalghe sono una risorsa promettente per la produzione di bioplastiche, in quanto non competono con le fonti alimentari, possono crescere utilizzando risorse di scarto e accumulare elevate quantità di lipidi. Tuttavia, la trasformazione delle microalghe in bioplastiche richiede un pretrattamento efficace per rompere le loro pareti cellulari resistenti e facilitare l'estrazione dei composti desiderati.

La presenza di pectina e cellulosa, se da una parte conferisce robustezza alla parete, dall'altra inibisce l'idrolisi degli enzimi ostacolando le successive lavorazioni.

È necessario uno studio accurato e mirato poiché la selezione della migliore tecnica di pretrattamento varia tra le varie specie di microalga [51].

Ci sono diverse tecniche di pretrattamento disponibili, ciascuna con i propri vantaggi e limitazioni, suddividendosi in processi chimici, fisici, chimicofisici, enzimatici o metodi innovativi.

Un resoconto dei diversi processi che possono essere utilizzati per il pretrattamento delle microalghe è riportato nella figura 28:

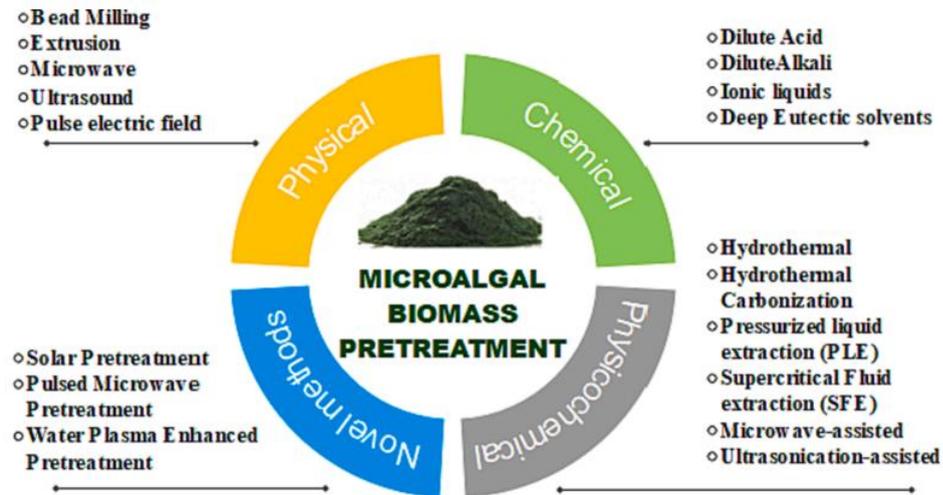


Figura 28: Pretrattamenti per le microalghe [51].

Il pretrattamento con materiali abrasivi, come vetro o perline ceramiche, sfrutta la collisione ad alta velocità di queste particelle con la biomassa microalgale per disgregare le pareti cellulari. Tuttavia, questa tecnica può richiedere elevate quantità di energia e può causare danni alla biomassa.

Il pretrattamento con estrusione presenta limitazioni legate ai costi di manutenzione.

Gli ultrasuoni utilizzano onde sonore ad alta frequenza per rompere le pareti cellulari. Anche se questa tecnica è efficiente, la scalabilità senza compromettere le prestazioni rimane una sfida.

Il pretrattamento chimico con acidi diluiti o alcali può essere utilizzato per disgregare le pareti cellulari e facilitare l'estrazione dei composti desiderati. Tuttavia, è necessario prestare attenzione alla scelta del reagente e alle condizioni di trattamento per evitare danni alla biomassa o alla formazione di sottoprodotti indesiderati.

I solventi eutettici profondi (DES) e i liquidi ionici (ILs) sono stati proposti come alternative ecocompatibili per il pretrattamento delle microalghe. Questi solventi possono rompere le pareti cellulari e facilitare l'estrazione dei composti desiderati, ma sono necessarie ulteriori ricerche per valutarne l'efficacia e la sostenibilità su larga scala [51].

Con l'idrolisi enzimatica è possibile raggiungere elevati rendimenti, ma il loro uso su larga scala è ostacolato dagli elevati costi e tempi di estrazione lenti. [68]

Il trattamento termico o idrotermico provoca la denaturazione delle pareti cellulari ad alte temperature (80–160 [°C]). Tuttavia, tale processo non è in grado di estrarre pigmenti, proteine e antiossidanti a causa della loro termosensibilità.

Nel sistema di estrazione con fluido supercritico, un solvente specifico viene sottoposto a pressioni e temperature superiori al suo punto critico, trasformandolo in un fluido supercritico con proprietà simili a un gas. Ciò consente alterazioni fisiche e chimiche che favoriscono l'estrazione di sostanze desiderate dalla biomassa microalgale.

L'estrazione liquido-pressurizzata è una tecnica che utilizza temperature e pressioni elevate per aumentare la solubilità e la diffusione dei soluti all'interno di una matrice solida. Questo processo sfrutta le caratteristiche dei solventi vicino alla regione supercritica, garantendo una maggiore efficacia nell'estrazione dei composti desiderati. La carbonizzazione idrotermica (HTC) trasforma biomasse ricche di carboidrati in biocarbone (hydro-char) ed un residuo acquoso ricco dei nutrienti presenti nella materia prima, attraverso un processo condotto in un ambiente acquoso ad alte temperature (180–

260 [°C]). Tuttavia, il riscaldamento provoca il rilascio di acidi e inibitori che possono interferire con le fasi successive del processo di lavorazione.

Il pretrattamento a microonde pulsate è una tecnica innovativa che sfrutta l'effetto delle microonde per la rottura delle pareti cellulari. Questo metodo è ampiamente riconosciuto per la sua efficacia nel settore industriale e scientifico, anche se presenta sfide legate al consumo energetico. Questa domanda di energia esterna potrebbe essere ridotta utilizzando un pretrattamento termico solare, che presenta un grande potenziale in alcune nazioni.

Il plasma non termico è una tecnologia all'avanguardia che utilizza una combinazione di gas ionizzati per trattare le biomasse a temperature inferiori rispetto ai metodi convenzionali. Nonostante i suoi vantaggi in termini di rapidità ed efficacia, la commercializzazione di questa tecnologia richiede ulteriori sviluppi e approfondimenti tecnologici [51].

Il pretrattamento efficace delle microalghe è fondamentale per la produzione sostenibile di bioplastiche e richiede un approccio integrato che tenga conto delle caratteristiche specifiche della biomassa e delle esigenze del processo di trasformazione.

Tra le diverse tecniche di pretrattamento, i processi chimici sono oggi tra le poche ad essere state esplorate su larga scala. Tra questi, il pretrattamento con acidi diluiti è considerato una forma di pretrattamento efficace e conveniente, poiché a basse temperature e con tempi di permanenza brevi si possono ottenere elevati rendimenti di proteine, lipidi e carboidrati. Tale trattamento favorisce il deterioramento della matrice cellulare nella parete cellulare e la depolimerizzazione delle emicellulose, inclusa l'idrolisi delle molecole di amido in molecole più semplici da parte di una sostanza chimica acida. L'acido solforico (H_2SO_4) e l'acido cloridrico (HCl) risultano essere gli acidi più frequentemente utilizzati per l'elevata efficacia e al basso costo. Concentrazioni più elevate di tali composti permettono di ridurre i tempi di reazione, mentre concentrazioni più basse richiedono valori di temperatura e pressione più elevati per ottenere rendimenti ottimali [51], [55].

L'ottimizzazione dell'idrolisi acida è uno step fondamentale per massimizzare resa e selettività verso i carboidrati, limitare la degradazione degli zuccheri e la produzione di agenti inibitori [68].

1.6 DoE, Design of Experiment

Il Design of Experiments (DoE) è un approccio statistico utilizzato in vari settori della scienza e industriali come supporto nelle fasi di design, sviluppo, processo e ottimizzazione di un processo o progetto [69]. È uno strumento in grado di rilevare interazioni tra i vari fattori considerati, migliorando la precisione delle stime degli effetti e riducendo il numero di test necessari pur ottenendo un'approfondita conoscenza del problema trattato.

Usualmente, molti ricercatori utilizzano l'approccio OFAT (One-Factor-At-A-Time) per esaminare o sviluppare prodotti e processi. Tuttavia, questo metodo può essere inefficiente e poco affidabile, portando a condizioni ottimali erronee. Il Design of Experiments (DoE) offre un'alternativa più efficace, consentendo di analizzare i fattori che influenzano la risposta e prevedere i loro effetti sulla risposta in modo matematicamente robusto. Attraverso il DoE, è possibile studiare un gran numero di variabili con un numero limitato di prove sperimentali, il che lo rende uno strumento prezioso per la ricerca e lo sviluppo industriale. La valutazione statistica dei dati può essere effettuata in modo efficiente grazie all'utilizzo di software specializzati per l'analisi come Minitab, Design Expert e JUMP [70].

Nell'ambito della progettazione degli esperimenti, si distinguono due categorie di variabili: variabili indipendenti e dipendenti. La variabile dipendente è la risposta che si intende studiare. I fattori rappresentano, invece, le variabili indipendenti, determinate in base alle premesse del problema, e che sono in grado di influenzare la risposta. Ogni fattore può assumere diversi livelli, corrispondenti ai vari valori che possono essere attribuiti alle variabili. Stabilite le variabili e i loro livelli, si definisce il piano sperimentale, che include tutte le combinazioni possibili dei livelli dei fattori da considerare in ciascun esperimento. Successivamente, si procede con l'esecuzione dei test, ripetendo gli esperimenti per migliorare l'affidabilità dei risultati (replicati).

Il processo del Design of Experiment (DoE) segue diversi passaggi: definizione dell'obiettivo dello studio, selezione dei fattori da investigare e dei loro valori, scelta delle risposte da analizzare, definizione del modello matematico, selezione del piano sperimentale, esecuzione dei test sperimentali, analisi dei dati, validazione e valutazione del modello matematico per verificarne la capacità predittiva.

L'obiettivo principale è sviluppare un modello matematico che descriva come la risposta varia in funzione dei fattori studiati. I coefficienti di questo modello sono stimati tramite i dati sperimentali e aiutano a identificare le condizioni operative ottimali per raggiungere gli obiettivi prefissati [70].

La determinazione del numero di esperimenti da effettuare, una volta definiti la risposta, i fattori e i loro livelli, avviene utilizzando la seguente equazione (*formula 1*):

$$N_{test} = (\text{numero livelli})^{\text{numero fattori}} \quad (\text{formula 1})$$

Ipotizzando di studiare 3 fattori a 2 livelli, denominati livello basso (-) e livello alto (+), il numero di test corrispondenti è $2^3=8$ test. La combinazione di ciascun test, invece, si ottiene compilando il modello della matrice sperimentale (figura 29):

Combinazione	Test	Fattori		
		A	B	C
(1)	1	-	-	-
<i>a</i>	2	+	-	-
<i>b</i>	3	-	+	-
<i>ab</i>	4	+	+	-
<i>c</i>	5	-	-	+
<i>ac</i>	6	+	-	+
<i>bc</i>	7	-	+	+
<i>abc</i>	8	+	+	+

Figura 29: Modello matrice sperimentale.

2. Materiali e metodi

Nel secondo capitolo del presente lavoro sono compendiate gli approfondimenti relativi ai composti chimici, ai ceppi batterici, ai terreni di coltura e fermentazione, biomassa microalgale, alla strumentazione, alle metodologie impiegati per la conduzione delle prove sperimentali.

2.1 Ceppi batterici e biomassa microalgale

Nel seguente lavoro di tesi sono testati due diversi ceppi batterici: *Cupriavidus necator* DSM 545 e *Halomonas halophila* CCM 3662.

Ambedue gli stock batterici sono conservati a -80° in una soluzione di glicerolo al 50% (Sigma-Aldrich); gli stock sono conservati partendo da OD₆₀₀ pari a 2

La biomassa microalgale utilizzata in questo studio è la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, acquistata presso l'azienda Phytobloom, Necton (Portogallo). La composizione del ceppo utilizzato comprende: minimo contenuto proteico pari al 35% in peso secco, minimo contenuto di grassi pari all'8% in peso secco, massimo contenuto di ceneri uguale al 30% in peso secco.

Le specifiche fisiche della microalga utilizzata prevedono: massima umidità pari al 5%, solubilità in acqua e insolubilità di olio.

La microalga è stata spedita in forma liofilizzata.

2.2 Terreni di coltura

Di seguito sono descritti dettagliatamente i terreni di coltura utilizzati per la crescita dei microrganismi testati nel presente studio.

2.2.1 *Cupriavidus necator*:

Per quanto concerne il batterio *C. necator*, sono adoperati 3 diversi terreni di coltura: terreno di precoltura I, terreno di precoltura II, terreno di fermentazione.

Il terreno di precoltura I, 'Liquid Broth', ha la seguente composizione: NaCl 10 [g/L], Triptone 10 [g/L], Estratto di lievito 5 [g/L], tabella 4.

Tabella 4: Composizione Liquid Broth utilizzato per *C. necator*.

Composto	Concentrazione [g/L]
NaCl	10
Triptone	10
Estratto di lievito	5

Nello specifico, sono stati utilizzati cloruro di sodio NaCl ($\geq 99.5\%$) Sigma-Aldrich, Triptone Sigma-Aldrich ed estratto di lievito Sigma-Aldrich. I composti sono pesati e disciolti in acqua deionizzata Milli-Q.

Dopo la sua preparazione, il terreno è autoclavato a 120 [°C], 1 [bar] per un tempo pari a 20 [minuti].

Il terreno di precoltura, anche detto qui terreno di precoltura II, è composto da: C₆H₁₂O₆ 10 [g/L], (NH₄)₂SO₄ 3 [g/L], KH₂PO₄ 1.5 [g/L], Na₂HPO₄ 3.74 [g/L], MgSO₄*7H₂O 0.2 [g/L], trace element 10 [mL/L], tabella 5.

Tabella 5: Composizione terreno di precoltura utilizzato per *C. necator*.

Composto	Concentrazione
C ₆ H ₁₂ O ₆	10 [g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 [g/L]
KH ₂ PO ₄	1.5 [g/L]
Na ₂ HPO ₄	3.74 [g/L]
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2 [g/L]
Trace element	10 [mL/L]

I composti sono pesati e disciolti in acqua deionizzata.

Il pH della soluzione è portato ad un valore di 6.8 tramite utilizzo della base idrossido di sodio NaOH 5M.

Il terreno contenente tutti i composti di cui sopra, ad eccezione del trace element e del solfato di magnesio eptaidrato, è sterilizzato tramite autoclave a 120°, 1 [bar] per 20 [minuti].

La soluzione di solfato di magnesio eptaidrato è sterilizzata mediante filtrazione con filtri in polieterosolfone (PES) da 0.2 [µm].

Il trace element contiene FeSO₄*7H₂O 10 [g/L], ZnSO₄ 2.25 [g/L], CuSO₄*5H₂O 1 [g/L], MnSO₄*5H₂O 0.5 [g/L], CaCl₂*2H₂O 2 [g/L], Na₂B₄O₇*10H₂O 0.23 [g/L], (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.1 [g/L], HCl 35% 10 [mL/L], tabella 6.

Tabella 6: Composizione Trace element usato per *C. necator*.

Composto	Concentrazione
FeSO ₄ *7H ₂ O	10 [g/L]
ZnSO ₄	2.25 [g/L]
CuSO ₄ *5H ₂ O	1 [g/L]
MnSO ₄ *5H ₂ O	0.5 [g/L]
CaCl ₂ *2H ₂ O	2 [g/L]

Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O	0.23 [g/L]
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.1 [g/L]
HCl 35%	10 [mL/L]

I composti sono pesati e disciolti in acqua deionizzata, il pH della soluzione ottenuta è regolato ad un valore di 6.8 mediante l'impiego di NaOH 5M.

Successivamente, la soluzione è sterilizzata tramite filtri in polieterosolfone (PES) con luce di passaggio pari a 0.2 [µm].

Il terreno di fermentazione ha la seguente formulazione: C₆H₁₂O₆ 12 [g/L], (NH₄)₂SO₄ 4 [g/L], KH₂PO₄ 13.3 [g/L], MgSO₄*7H₂O 1.2 [g/L], acido citrico 1.87 [g/L], trace element 10 [mL/L], tabella 7.

Tabella 7: Composizione terreno di fermentazione utilizzato per *C. necator*.

Composto	Concentrazione
C ₆ H ₁₂ O ₆	12 [g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 [g/L]
KH ₂ PO ₄	13.3 [g/L]
MgSO ₄ *7H ₂ O	1.2 [g/L]
Acido citrico	1.87 [g/L]
Trace element	10 [mL/L]

I composti sono pesati e disciolti in acqua deionizzata. Il terreno contenente tutti i composti di cui sopra, ad eccezione del trace element, solfato di magnesio eptaidrato e glucosio, è sterilizzato tramite autoclave a 120°, 1 [bar] per 20 [minuti].

La soluzione di solfato di magnesio eptaidrato è sterilizzata mediante filtrazione con filtri in polieterosolfone (PES) da 0.2 [µm].

La soluzione di glucosio è sterilizzata separatamente tramite autoclave a 120 [°C], 1 [bar] per 20 [minuti].

La composizione del trace element ha la medesima composizione del tracciante descritto nell'analisi del terreno di precultura II e segue la stessa preparazione.

2.2.2 *Halomonas halophila*

Per il batterio *H. halophila* sono impiegati due diversi substrati di coltura: complex medium K2 per l'inoculo e mineral medium per la fermentazione.

Il terreno complex medium K2 ha la seguente composizione: peptone 15 [g/L], estratto di lievito 3 [g/L], NaCl 66 [g/L], glucosio 1 [g/L], tabella 8.

Tabella 8: Composizione terreno complex medium K2 usato per *H. halophila*.

Composto	Concentrazione [g/L]
Peptone	15
Estratto di lievito	3
NaCl	66
Glucosio	1

I composti sono pesati e disciolti in acqua deionizzata. Dopo la preparazione, il terreno è autoclavato a 120 [°], 1 [bar] per un tempo pari a 20 [minuti].

Il mineral medium contiene: (NH₄)₂SO₄ 3 [g/L], Na₂HPO₄ 4.4 [g/L], KH₂PO₄ 1.05 [g/L], MgSO₄*7H₂O 0.2 [g/L], NaCl 66 [g/L], C₆H₁₂O₆ 20 [g/L], MES 1 [mL/L], tabella 9.

Tabella 9: Composizione mineral medium utilizzato per *H. halophila*.

Composto	Concentrazione
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 [g/L]
Na ₂ HPO ₄	4.4 [g/L]
KH ₂ PO ₄	1.95 [g/L]
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2 [g/L]
NaCl	66 [g/L]
C ₆ H ₁₂ O ₆	20 [g/L]
MES	1 [mL/L]

La fonte di azoto e i fosfati sono pesati, disciolti in acqua deionizzata, portati a pH tra 6.5 e 7.5 mediante l'impiego di NaOH 5M. Successivamente alla sua preparazione, la soluzione è sterilizzata tramite autoclave a 120 [°C], 1 [bar] per 20 [minuti].

La soluzione contenente MgSO₄*7H₂O è sterilizzata mediante filtrazione con filtri in polietereosolfone (PES) da 0.2 [µm].

Separatamente, sono state preparate e autoclavate due soluzioni contenenti rispettivamente NaCl 300 [g/L] e glucosio 500 [g/L].

Il MES è una soluzione che comprende: FeSO₄*7H₂O 9.975 [g/L], CaCl₂*2H₂O 7.8 [g/L], CuCl₂*2H₂O 0.08 [g/L], CoCl₂*6H₂O 0.119 [g/L], NiCl₂*6H₂O 0.118 [g/L], CrCl₂ 0.062 [g/L], HCl 0.1M, tabella 10.

Tabella 10: Composizione MES utilizzato per *H. halophila*.

Composto	Concentrazione
FeSO ₄ *7H ₂ O	9.975 [g/L]
CaCl ₂ *2H ₂ O	7.8 [g/L]
CuCl ₂ *2H ₂ O	0.08 [g/L]
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.119 [g/L]
NiCl ₂ *6H ₂ O	0.118 [g/L]
CrCl ₂	0.062 [g/L]
HCl	0.1M

Il MES è sterilizzato con filtrazione sottovuoto mediante l'impiego di pompa da vuoto e filtri in polieterosolfone (PES) con luce di passaggio pari a 0.2 [µm].

2.3 Strumentazione

Gli strumenti impiegati per la realizzazione delle prove sperimentali sono:

- 1) Per la preparazione dei terreni di coltura e fermentazione:
 - Bilancia analitica di precisione digitale XS BALANCE BL 224, in alto a sinistra figura 30;
 - Autoclave sterilizzatore a vapore da banco 760 Savatec, in alto a destra figura 30;
 - Sistema di filtrazione sottovuoto GVS filter technology, in basso a sinistra figura 30;
 - Pompa per vuoto a membrana KNF laboport, in basso a destra figura 30.



Figura 30: A) Bilancia analitica di precisione digitale XS BALANCE BL 224, B) Autoclave sterilizzatore a vapore da banco 760 Savatec, C) Sistema di filtrazione sottovuoto GVS filter technology, D) Pompa per vuoto a membrana KNF laboport.

2) Per la conduzione di idrolisi acida:

- Centrifuga Thermo Scientific SL 16R, in alto a sinistra figura 31;
- Cappa chimica MOMOLINE E220, in alto a destra figura 31;
- Agitatore magnetico digitale a microprocessore con piastra riscaldante ARGOLab M3-D, in basso a sinistra figura 31;
- Phmetro da banco XS pH50+ DHS, in basso al centro figura 31;
- Bilancia di precisione digitale XS BL 2002, in basso a sinistra figura 31.



Figura 31: A) Centrifuga Thermo Scientific SL 16R, B) Cappa chimica MOMOLINE E220, C) Agitatore magnetico digitale a microprocessore con piastra riscaldante ARGOLab M3-D, D) Phmetro da banco XS pH50+ DHS, E) Bilancia di precisione digitale XS BL 2002.

3) Per l'estrazione del PHB:

- Forno universale a convezione naturale Memmert, a sinistra figura 32;
- Mini centrifuga CAPP Rondo CR-1512, a destra figura 32;
- Colonna SIL-20° HT UFLC Shimadzu, figura 33.



Figura 32: A) Forno universale a convezione naturale Memmert, B) Mini centrifuga CAPP Rondo CR-1512.



Figura 33: Colonna SIL-20° HT UFLC Shimadzu.

4) Per l'analisi degli zuccheri dell'idrolizzato algale:

- Evaporatore rotante Heidolph LaboRota 4000/ HB Efficient, a sinistra figura 34;
- Forno universale a convezione naturale Memmert;
- Colonna SIL-20° HT UFLC Shimadzu;
- Cristallizzatore in vetro borosilicato DURAN, a destra figura 34.



Figura 34: A) Evaporatore rotante Heidolph LaboRota 4000/ HB Efficient,
B) Cristallizzatore in vetro borosilicato DURAN

5) Per la crescita e fermentazione dei batteri:

- Incubatore ES-20/60 Savatec con agitazione orbitale, in alto figura 35;
- Cappa di biosicurezza Labculture classe II tipo A2, in basso a sinistra figura 35;
- Spettrofotometro UV/VIS Hach Lange DR 5000, in basso a destra figura 35.

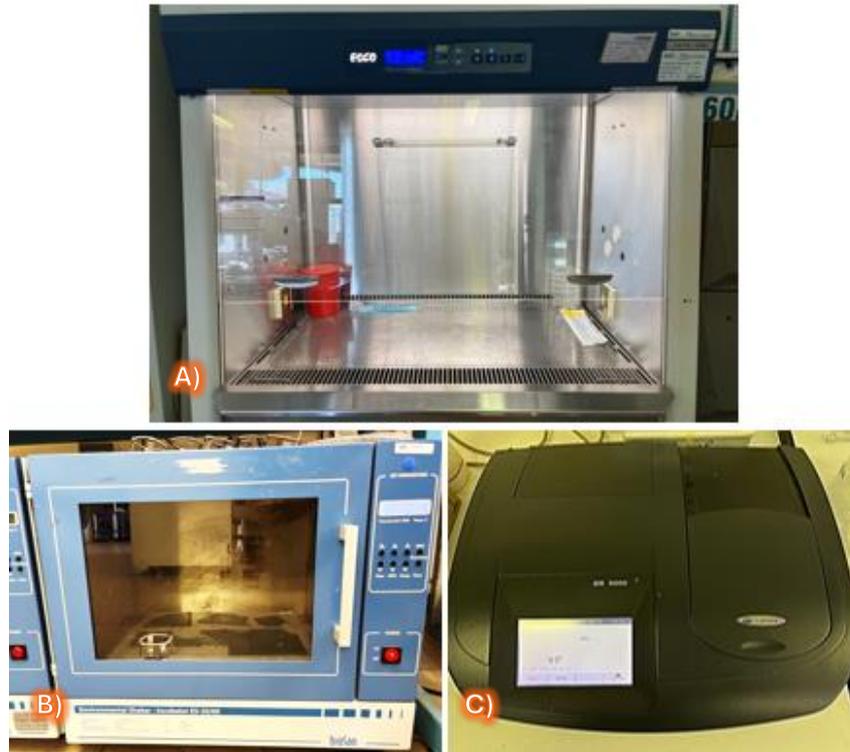


Figura 35: A) Incubatore ES-20/60 Savatec con agitazione orbitale, B) Cappa di biosicurezza Labculture classe II tipo A2, C) Spettrofotometro UV/VIS Hach Lange DR 5000.

- 6) Per l'analisi degli zuccheri e del PHB:
 - Colonna SIL-20° HT UFLC Shimadzu.

2.3.1 Approfondimento su HPLC

Per l'analisi degli zuccheri consumati dai due ceppi batterici, degli zuccheri estratti dalla biomassa *P. tricornutum* e del biopolimero prodotto da *C. necator* e *H. halophila* è stata utilizzata una colonna di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*).

Questa metodologia cromatografica si avvale dell'equilibrio di affinità tra i diversi composti di un solvente e le due fasi distinte presenti all'interno della colonna cromatografica: la fase stazionaria e la fase mobile. Nel momento in cui un composto manifesta una maggiore affinità per la fase stazionaria rispetto alla fase mobile, il suo attraversamento della colonna cromatografica richiederà un tempo prolungato, noto come tempo di ritenzione. Al contrario, un composto caratterizzato da una minore affinità per la fase stazionaria e una maggiore per la fase mobile, attraverserà la colonna in maniera celere.

Nello specifico, nel corso delle prove sperimentali è stata impiegata una colonna che utilizza come fase mobile una soluzione di acido solforico H_2SO_4 5 mM ed è stato settato un flusso pari a 0.700 [mL] al [minuto].

Da un'analisi del cromatogramma ottenuto all'HPLC, si individuano i picchi corrispondenti ai composti cercati. L'area sottesa ad ogni picco risulta proporzionale alla concentrazione della sostanza corrispondente.

Risulta necessario conoscere i tempi di ritenzione dei composti che si stanno indagando. In questo caso, la cromatografia viene utilizzata per l'analisi di glucosio, mannosio, arabinosio, poliidrossibutirrato.

Nel caso degli zuccheri per l'identificazione dei composti è stato utilizzato un rivelatore a Indice di Rifrazione (RID), il quale permette l'analisi di composti privi di cromoforo UV-Vis attivo. Le analisi del biopolimero sono state ottenute, invece, mediante l'impiego di rivelatore a Serie di Fotodiodi (PDA)

Nella tabella 11 sono riassunti i tempi di ritenzione dei composti analizzati nelle varie prove sperimentali:

Tabella 11: Tempi di ritenzione.

Composto	Tempo di ritenzione [min]
Glucosio	8.690
Mannosio	9.200
Arabinosio	10.058
PHB	23.2

Per il glucosio i dati impiegati volti alla costruzione della retta di taratura e la corrispettiva retta sono:

Tabella 12: Dati retta di taratura glucosio.

Concentrazione [g/L]	Area picco
4	423451
2	210341
1	106073
0.5	54222
0.25	27341
0.125	13809
0.05	5147

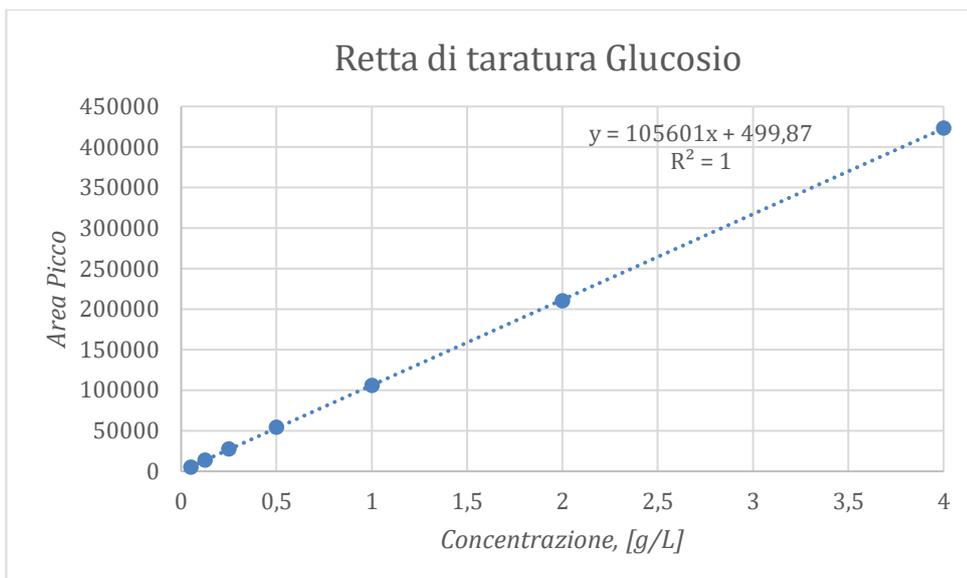


Figura 36: Retta di taratura Glucosio realizzata mediante analisi all'HPLC.

La retta di taratura trovata è:

$$y = 10501x + 499.87$$

con $y = \text{area picco}$ e $x = \text{concentrazione [g/L]}$

Per il mannosio:

Tabella 13: Dati per la retta di taratura del mannosio.

Concentrazione [g/L]	Area picco
4	429570
2	213432
1	108956
0.5	54426
0.25	27092
0.125	13362
0.05	5248

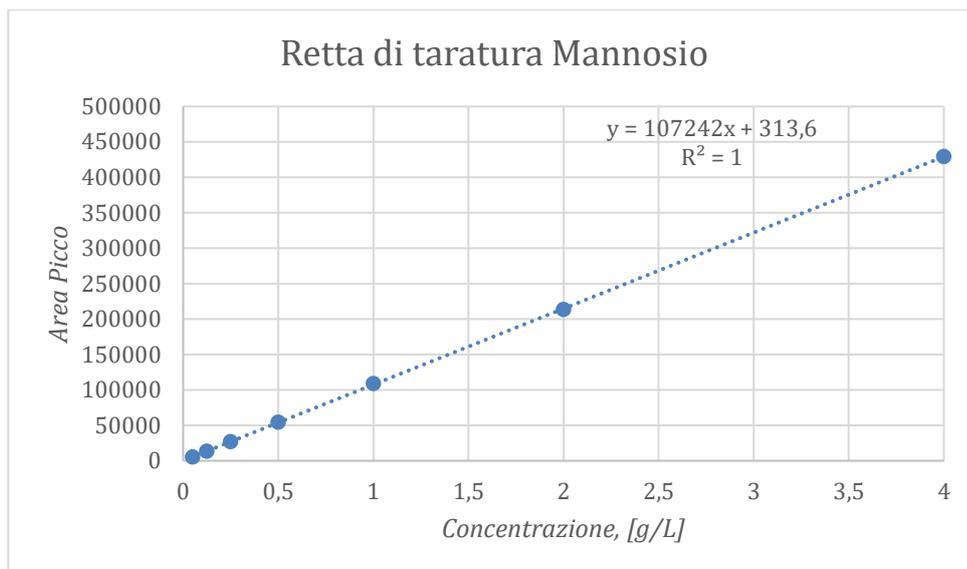


Figura 37: Retta di taratura Mannosio realizzata mediante analisi all'HPLC.

La retta di taratura ottenuta per lo zucchero mannosio è:

$$y = 107242x + 313,6$$

con $y = \text{area picco}$ e $x = \text{concentrazione [g/L]}$

Per l'arabinosio:

Tabella 14: Dati per retta di taratura dell'arabinosio

Concentrazione [g/L]	Area picco
4	428370
2	213032
1	106440
0.5	53660
0.25	26572
0.125	13603
0.05	4876

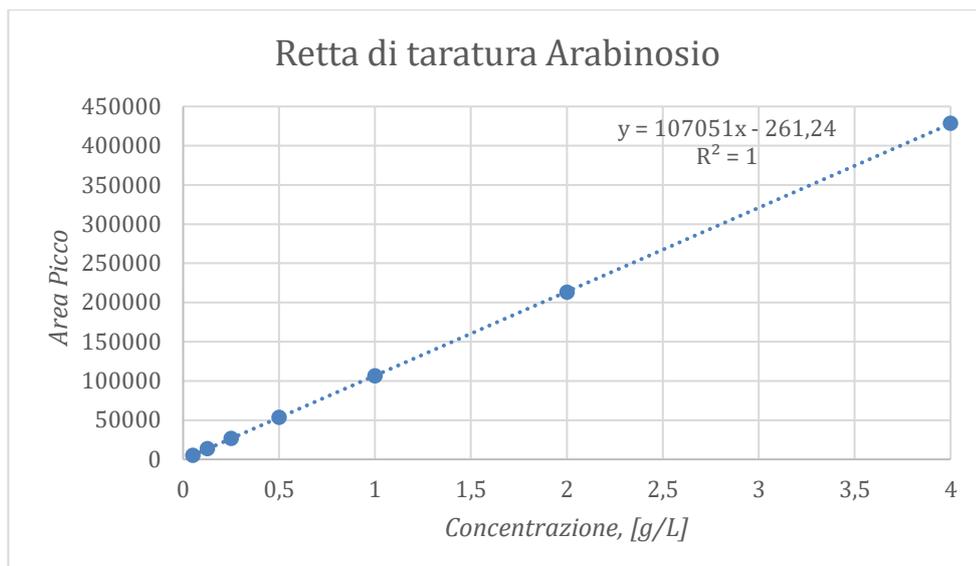


Figura 38: Retta di taratura Arabinosio realizzata mediante analisi all'HPLC.

In questo caso, la retta costruita ha la seguente formulazione:

$$y = 107051x - 261.24$$

con y=area picco e x= concentrazione [g/L]

I dati utilizzati per la realizzazione della retta di taratura del PHB sono:

Tabella 15: Dati per retta di taratura del PHB.

Concentrazione [g/L]	Area picco
0.001	92211
0.0005	47140
0.00025	20839
0.000125	11645
0.0000625	5508

Dai dati si ottiene la seguente curva:

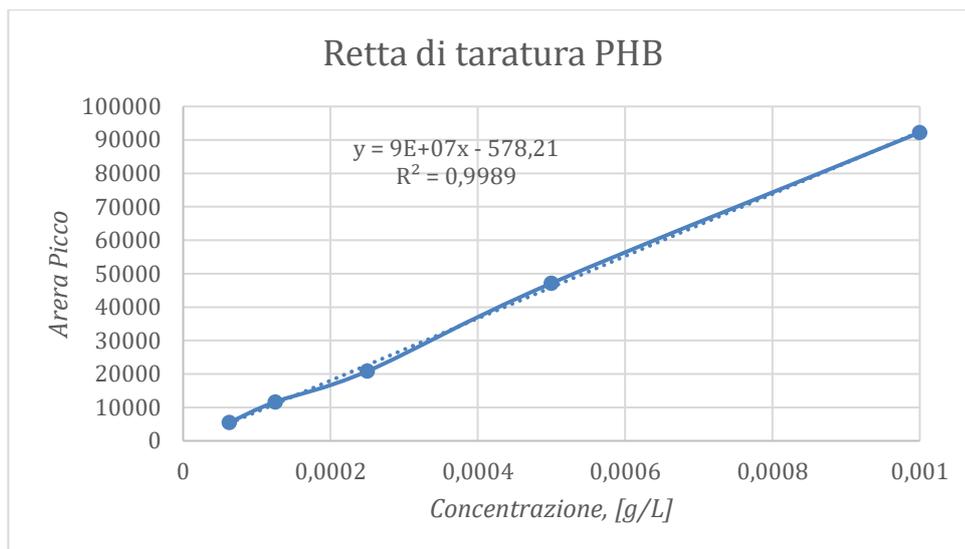


Figura 39: Retta di taratura PHB realizzata mediante analisi all'HPLC.

Il comportamento del PHB è descritto dall'equazione:

$$y = 90000000x - 578,21$$

con $y = \text{area picco}$ e $x = \text{concentrazione [g/L]}$

2.4 Estrazione degli zuccheri da *Phaeodactylum tricornutum*

Per l'ottenimento dell'estrazione di zuccheri contenuti nella biomassa algale *P. tricornutum*, da un'analisi di costi, benefici, sviluppo sul mercato, rese, è stata adottata la tecnica di idrolisi acida.

2.4.1 Test di idrolisi acida

Nel seguente elaborato è stato condotto uno studio di 'Design of Experiments (DoE)' per definire i valori dei parametri che massimizzano il quantitativo di zuccheri estratti dalla microalga *P. tricornutum* mediante idrolisi acida. Tale approccio statistico ha permesso una valutazione simultanea di due dei parametri da settare per il processo di estrazione: concentrazione di H₂SO₄ e rapporto biomassa/solvente. Tale indagine è volta ad incrementare il contenuto di glucosio, mannosio e arabinosio estratto dalla biomassa.

Mediante analisi in letteratura, sono stati selezionati alcuni range di parametri usualmente utilizzati per l'estrazione acida di mix zuccherini da biomasse algali.

Kusmiyati Kusmiyati et al. riportano alcune condizioni operative testate per ottenere alto contenuto di zucchero da alcune biomasse algali.

In particolare:

- 1) Idrolisi acida di *Spirulina platensis* utilizzando H₂SO₄ 2N a 80 [°C] per 60 [minuti];
- 2) Idrolisi acida di *Chorella sp* mediante H₂SO₄ 2N per 90 [minuti];
- 3) Idrolisi acida di *Ulva lactuca* mediante utilizzo di H₂SO₄ 2N a 80 [°C] per 60 [minuti];
- 4) Idrolisi acida di *Scenedesmus obliquus* utilizzando H₂SO₄ 2N a 120 [°C] per 30 [minuti] [50].

In 'Current trends in the pretreatment of microalgal biomass for efficient and enhanced bioenergy production', sia la specie *Chlorella* che *Scenedesmeceae* sono pretrattate usando una soluzione di acido solforico 2N [51].

Charnho Park et al. investigano diversi acidi per l'idrolisi di *Chlorella vulgaris* usando un rapporto biomassa/solvente=1/10 [g/ml] [71].

Gyeongho Seon et al. testano l'utilizzo di acido solforico per l'idrolisi acida di *Chlorella sp* con rapporto biomassa/solvente pari a 1/20 [g/ml], impiegando differenti concentrazioni acide 0.1N, 1N, 2N, a 90 [°C] per un tempo che va da 30 [minuti] a 300 [minuti] [68]. I risultati sono riportati nella figura 40:

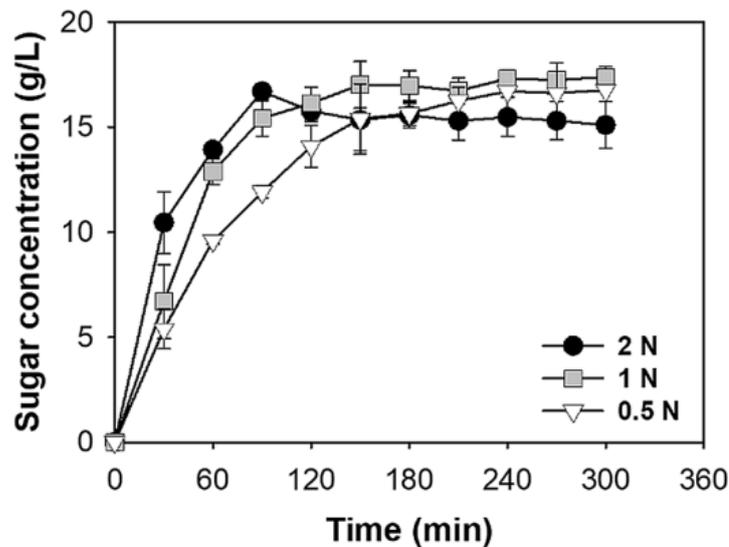


Figura 40: [g/L] di zucchero ottenuto mediante idrolisi acida con acido solforico [68].

Da un esame del grafico 35, si osserva come la curva 1N raggiunga valori superiori rispetto alle altre due curve per quasi la totalità dei campionamenti. Il quantitativo maggiore di concentrazione zuccherina è raggiunto con la seguente combinazione: H₂SO₄ 1N, biomassa/solvente=1/20 [g/ml], tempo=240 [min], temperatura=90 [°C] [68].

Le differenti condizioni sviluppate nei vari studi sono riassunte nella tabella 16:

Tabella 16: Condizioni di estrazione acida di diverse biomasse algali.

Specie	Condizioni	Riferimento
<i>Spirulina plantesis</i>	H ₂ SO ₄ 2N, 80[°C], 60 [minuti]	[50]
<i>Chlorella sp</i>	H ₂ SO ₄ 2N, 90 [minuti]	[50]
<i>Ulva lactuca</i>	H ₂ SO ₄ 2N, 80 [°C], 60 [minuti]	[50]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	H ₂ SO ₄ 2N, 120 [°C], 30 [minuti]	[50]
<i>Chlorella sp e Scenedesmaceae sp</i>	H ₂ SO ₄ 2N	[51]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa/solvente=1/10 [g/ml]	[71]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa/solvente=1/20 [g/ml] H ₂ SO ₄ 1N, 90 [°C], 240 [minuti]	[68]

Per le prove di estrazione sono state fissate due condizioni: temperatura e agitazione. In particolare, la temperatura è impostata a 90 [°C] e l'agitazione a 200 [rpm]. Le variabili indagate (fattori) sono, invece, concentrazione di acido solforico e rapporto biomassa/solvente [g/ml]. I range studiati sono: soluzione di acido solforico 1N e 2N, rapporto biomassa/solvente= 1/10 [g/ml] e 1/20 [g/ml],

I risultati dello studio del DoE definiscono il numero minimo di combinazioni da studiare per avere tutte le informazioni necessarie sulle prove affrontate. Avendo scelto

di studiare due fattori ciascuno a due livelli, il calcolo del numero di test da effettuare, seguendo le informazioni riportate nel paragrafo 1.6, è il seguente: $2^2=4$ test. Ovvero per la comprensione globale del fenomeno studiato è necessario analizzare 4 combinazioni diverse di parametri.

Dalla matrice sperimentale, si ottiene (figura 41):

Combinazione	Test	Fattori	
		H ₂ SO ₄	b/s
(1)	1	-	-
<i>a</i>	2	+	-
<i>b</i>	3	-	+
<i>ab</i>	4	+	+

Figura 41: Matrice sperimentale con 2 fattori ciascuno a due livelli.

Per ogni test è studiata la durata della reazione che massimizza l'estrazione zuccherina, dunque sono previsti campionamenti dopo 60-90-120-150 [minuti] così da individuare il tempo con cui si ottiene la concentrazione massima di zuccheri.

Di seguito sono illustrati i test nel dettaglio:

- TEST 1: idrolisi al 5% in peso con rapporto 1/10 [g/ml];
- TEST 2: idrolisi al 10% in peso con rapporto 1/10 [g/ml];
- TEST 3: idrolisi al 5% in peso con rapporto 1/20 [g/ml];
- TEST 4: idrolisi al 10% in peso con rapporto 1/20 [g/ml].

Tutti i test sono stati eseguiti in triplicato.

Ogni prova prevede l'utilizzo di 5 [g] di biomassa microalgale e diversi quantitativi di soluzione H₂O-H₂SO₄ così da soddisfare i diversi rapporti biomassa/solvente e le differenti concentrazioni in peso di H₂SO₄.

Nello specifico, tabella 17:

Tabella 17: Composizione per ogni test di idrolisi acida.

	Biomassa [g]	Soluzione [ml]	H₂SO₄ [mL]	H₂O [mL]
TEST 1	5	50	1.415	48.585
TEST2	5	50	2.831	47.169
TEST 3	5	100	2.831	97.169
TEST 4	5	100	5.661	94.339

La soluzione, tramite bagno in olio silconico, è mantenuta a 90 [°C] e viene agitata mediante utilizzo di magneti, figure 42 e 43.



Figura 42: Estrazione zuccheri con idrolisi acida.



Figura 43: Dettaglio estrazione zuccheri con idrolisi acida.

Per ogni prova, sono condotti dei campionamenti dopo 60-90-120-150 [minuti]. Con ogni campionamento si prelevano 2 [ml] di soluzione tramite pipette pasteur monouso sterili e il quantitativo viene conservato in delle falcon, figura 44.

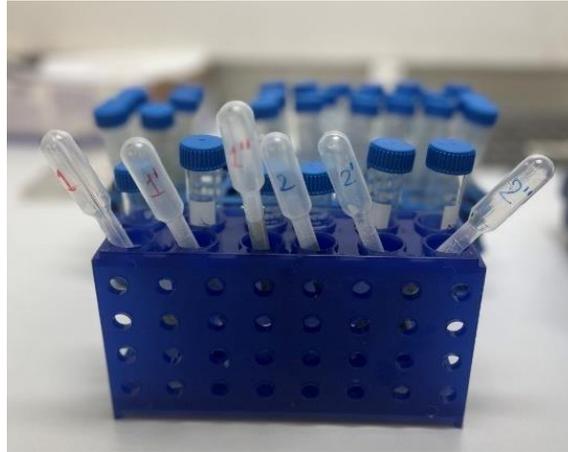


Figura 44: Campionamenti.

Successivamente, la soluzione prelevata è filtrata tramite filtro in polieterosolfone (PES) da 0.2 [μm] in delle vials e analizzata all'HPLC per 15 [minuti], figura 45 e 46.



Figura 45: Filtrazione tramite PES per analisi HPLC.

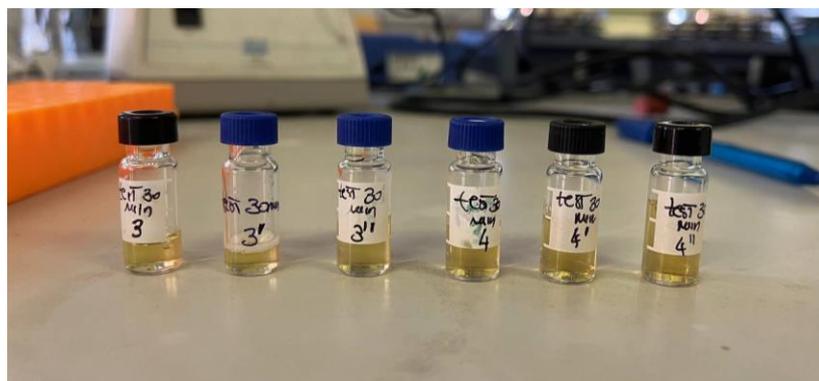


Figura 46: Vials per analisi HPLC.

La biomassa rimasta dopo i campionamenti è conservata in frigo per 24h e successivamente centrifugata 3 volte a 15 [$^{\circ}\text{C}$], con $\text{RCF} = 4696$ [xg] per 30 [min]. Il surnatante ottenuto è stato congelato a -20 [$^{\circ}\text{C}$].

2.4.2 Scale-up dell'idrolisi acida

Ottenute le informazioni necessarie all'ottimizzazione di estrazione di zuccheri dalla biomassa in questione, sono state condotte quattro prove di idrolisi acida.

È pesata una quantità pari a 60 [grammi] di biomassa microalgale (figura 47), posta successivamente in un becher a contatto con 600 [ml] di soluzione: 537.5 [mL] di acqua distillata e 62.5 [ml] di acido solforico. In questo modo, è possibile soddisfare il rapporto biomassa/solvente=1/10 e la concentrazione in peso di H_2SO_4 pari al 10%.

La soluzione, tramite bagno in olio siliconico, è mantenuta a 90[°C] per un tempo pari a 2[h] e 30[min] e viene agitata mediante utilizzo di magnete. L'operazione di estrazione è realizzata sotto cappa chimica, figure 48 e 49.



Figura 47: Pesatura biomassa microalgale.



Figura 48: Scale up idrolisi acida.

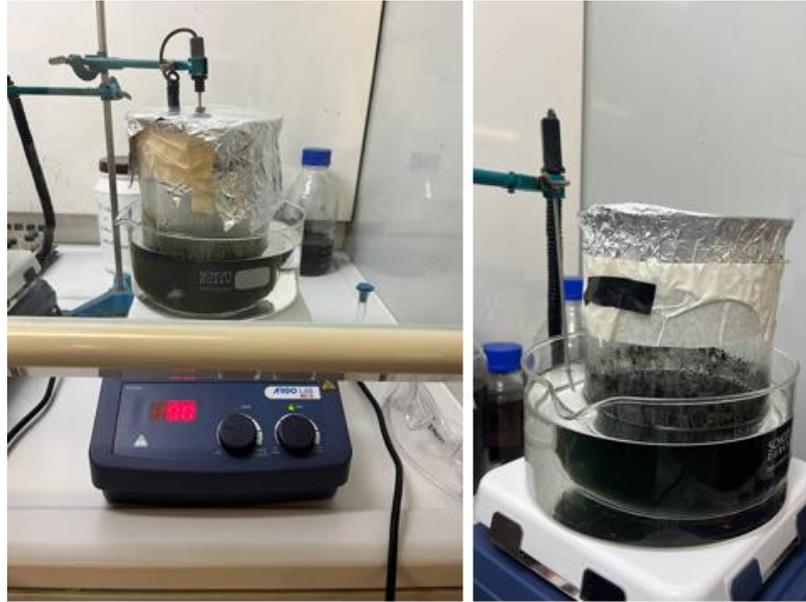


Figura 49: Dettaglio scale up idrolisi acida.

Terminato il tempo di estrazione, la soluzione ottenuta è neutralizzata con base idrossido di sodio 16M raggiungendo un valore di pH nel range 4-6.

In seguito, la soluzione è centrifugata a 15 [°C], con RCF= 4969 [xg] per 40 [minuti]. Il surnatante ottenuto è ulteriormente centrifugato a 15 [°C], con RCF= 4969 [g] per 30 [minuti].

La soluzione ottenuta viene filtrata tramite filtrazione sottovuoto mediante l'impiego di pompa da vuoto e filtri in polietereossolfone (PES) con luce di passaggio pari a 0.2 [µm], figura 50.



Figura 50: Filtrazione sottovuoto dell'idrolizzato algale.

La soluzione filtrata appare liquida e di colore omogeneo e giallo, come evidenziato dalla figura 51.



Figura 51: Idrolizzato algale post filtrazione.

Una piccola parte di ciò che si è ottenuto è ulteriormente filtrata con filtri in PES da 0.2 [μm] e analizzata all'HPLC per un tempo pari a 15 [minuti]. La restante parte subisce dei processi volti alla concentrazione del contenuto di zuccheri estratti dalla microalga.

A tal proposito, sono state condotte due diverse prove volte all'utilizzo di differenti tecniche di concentrazioni così da ottenere il miglior trattamento in termini di resa, tempo, costo.

Nel dettaglio, il surnatante, post centrifuga e filtrazione, è concentrato mediante l'impiego sia di evaporatore rotante sia di stufa.

Nel primo caso, la soluzione è posta all'interno del pallone di evaporazione, immerso in un bagno termostatico ad una temperatura pari a 40 [$^{\circ}\text{C}$]. Seguentemente, il pallone viene messo in rotazione con agitazione pari a 210 [rpm]. La pressione è settata a 40 [mbar].

Con la seconda tecnica testata, la soluzione viene conservata all'interno di un cristallizzatore in vetro borosilicato, il quale viene messo all'interno di una stufa per 24 [h]. In questo caso, si è reso necessario indagare la temperatura ottimale per rendere il processo efficiente. Pertanto, il processo di concentrazione in stufa è stato ripetuto tre volte con tre diverse temperature: 65, 70 e 90 [$^{\circ}\text{C}$].

Una piccola parte dei due idrolizzati algali sono filtrati mediante filtri in PES da 2 [μm] e analizzati alla colonna di cromatografia liquida ad alta prestazione per 15 [minuti].

Sono condotte altre 3 prove di idrolisi acida della specie *P. tricornutum* con successiva concentrazione tramite stufa al fine di ottenere un quantitativo idoneo per la realizzazione della successiva coltura fed-batch.

Per la realizzazione dell'idrolisi acida, sono stati utilizzati acido solforico H_2SO_4 (95.0%-98% in peso) Sigma-Aldrich, bagnetto di olio silconico (Sigma-Aldrich), acqua deionizzata.

2.5 Metodi analitici

Nel capitolo seguente sono presentati e descritti i diversi metodi analitici utilizzati per l'analisi dei risultati ottenuti nel seguente lavoro di tesi sperimentale.

2.5.1 Crescita dei batteri

Con il termine crescita microbica si descrive il fenomeno di aumento dei costituenti cellulari dei microorganismi, il quale può tradursi sia in un incremento delle dimensioni delle singole cellule batteriche, sia in un'espansione numerica della popolazione, o può prevedere il manifestarsi di entrambi i processi simultaneamente. Trattandosi di un processo autocatalitico, richiede la presenza di almeno una cellula vitale per il suo avviamento. Il suo aumento risulta direttamente proporzionale alla quantità di biomassa vitale disponibile, ovvero al numero di cellule capaci di riprodursi e quindi formare colonie [72].

La crescita microbica rappresenta un parametro cruciale per l'osservazione delle attività delle cellule viventi. Essa analizza la variazione nel tempo della concentrazione di microrganismi vitali presenti nel sistema analizzato. Esistono diversi metodi, sia diretti che indiretti, per prevedere la crescita cellulare. Tra questi: cell dry weight, densità ottica, conta vitale, respirazione cellulare, tasso metabolico [73].

Nel seguente lavoro di tesi, la crescita batterica è stimata mediante valutazione della densità ottica cellulare (assorbanza ad una lunghezza d'onda pari a 600 [nm], conosciuta anche come OD₆₀₀), e della biomassa secca ([g/L]).

Sperimentalmente tramite misure della variazione di concentrazione di microrganismi nel tempo è possibile analizzare l'andamento temporale della coltura. Questo è descritto da un processo che vede il susseguirsi di quattro fasi differenti:

1. Fase di latenza: i microrganismi utilizzano questo tempo per adattarsi all'ambiente, non si assiste a significative variazioni di dimensione e fenomeni di replicazione cellulare;
2. Fase di crescita esponenziale: il tasso di crescita microbica cresce esponenzialmente nel tempo, si arresta con l'accorrere dell'assenza di nutrienti o accumulo di prodotti di rifiuto inibitori prodotti dal microrganismo stesso;
3. Fase stazionaria: non si osservano fenomeni di crescita netta poiché la velocità di riproduzione e di morte si equivalgono;
4. Fase di declino: la densità cellulare decresce esponenzialmente con totale esaurimento dei nutrienti necessari alla vita [73].

Riportando in un grafico l'andamento del logaritmo del numero di organismi vitali al variare del tempo, si ottiene una curva dalla quale è possibile individuare le quattro fasi che caratterizzano la crescita microbica, figura 52:

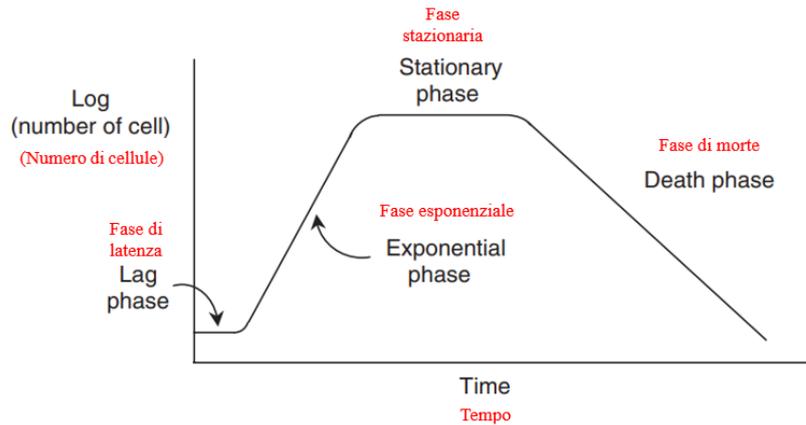


Figura 52: Curva di crescita microbica, modificato da [73].

Da un'analisi della figura 46, si nota come durante la prima fase, quella di adattamento, la curva rimane costante al valore di biomassa iniziale. Durante questa fase non si osserva variazione della popolazione microbica: i batteri si limitano a sintetizzare gli enzimi fondamentali per metabolizzare i nutrienti presenti nel terreno di coltura o a riparare danni cellulari subiti in trattamenti precedenti, quali congelamento, riscaldamento o essiccazione [72].

Successivamente, il numero di batteri vitali cresce esponenzialmente e questo si traduce in un andamento lineare nel grafico semi-logaritmico, come evidenziato dalla retta della fase esponenziale.

La seconda fase è seguita da un periodo di stazionarietà, la curva raggiunge un plateau: il valore di numero di cellule vitali si stabilizza al valore di picco.

Quando la velocità di morte eccede quella di crescita, la curva nel grafico semi-logaritmico si appiattisce linearmente, riflettendo una diminuzione esponenziale del numero di cellule vitali nel tempo.

La fase di crescita esponenziale può essere descritta matematicamente da un'equazione che evidenzia la proporzionalità tra la velocità di variazione della concentrazione microbica (x [numero cellule]) rispetto al tempo [72], [73], *formula 1*:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (\text{formula 1})$$

La proporzionalità è regolata dalla costante μ [h^{-1}]: tasso di crescita specifico.

Dall'integrazione dell'equazione, si ottiene:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (\text{formula 2})$$

Con x_0 : concentrazione biomassa al tempo zero.

In forma logaritmica:

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu t \quad (\text{formula 3})$$

Dalla *formula 3* è possibile ricavare il valore di tasso di crescita specifico del ceppo batterico testato:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{t} \quad (\text{formula 4})$$

2.5.2 Consumo degli zuccheri: analisi HPLC

La cromatografia liquida ad alta prestazione è impiegata per la valutazione degli zuccheri consumati da entrambi i ceppi batterici, permettendo un'analisi sia qualitativa che quantitativa.

Si utilizza la colonna SIL-20° HT UFLC Shimadzu con fase mobile soluzione di acido solforico H₂SO₄ 5mM.

Noti sia i tempi di ritenzione tipici dei tre zuccheri glucosio, mannosio e arabinosio, sia le rispettive rette di taratura, si analizza il consumo di questi ultimi da parte dei microorganismi *C. necator* e *H. halophila*.

Da un'attenta analisi del cromatogramma ottenuto con il lettore RID dell'HPLC, si individuano i picchi corrispondenti agli zuccheri cercati. L'area sottesa ad ogni picco risulta proporzionale alla concentrazione del composto corrispondente.

Dall'equazione della retta di taratura descrivente lo zucchero in questione, è possibile calcolare analiticamente la concentrazione del composto. Dall'equazione della retta $y = mx + q$, con y = area picco, m e q ricavati sperimentalmente, è possibile valutare il valore di x corrispondente proprio alla concentrazione [g/L] del composto analizzato.

In particolare, nella tabella 18 sono riassunti i tempi di ritenzione degli zuccheri testati:

Tabella 18: Tempi di ritenzione degli zuccheri, individuati mediante analisi all'HPLC.

Composto	Tempo di ritenzione [min]
Glucosio	8.690
Mannosio	9.200
Arabinosio	10.058

Tutti i composti presentano tempi di ritenzione inferiori a 15 minuti; pertanto, il tempo di analisi di ogni campione è fissato a 15 minuti.

2.5.3 Estrazione di PHB e analisi

L'estrazione di PHB prevede dei passaggi preliminari volti alla preparazione della biomassa secca.

Si utilizzano delle Eppendorf non sterili poste in stufa a 90[°C] per 24 [ore], nelle quali, previa taratura, viene aggiunto 1 [mL] di batterio campionato durante la fermentazione. Si procede con una centrifuga con RCF= 6931 [xg] per 5 [minuti]. Questi due passaggi sono ripetuti 3 volte ottenendo un quantitativo idoneo di pellet necessario per la successiva estrazione di biopolimero. Dopo la prima centrifuga, si conserva il surnatante, viene filtrato mediante filtri non sterili in PES da 0.2 [µm] e viene analizzato all'HPLC.

A questo punto, il pellet è sciacquato con 1 [mL] di acqua deionizzata per la rimozione definitiva di tracce di terreno. Le Eppendorf contenenti il pellet di biomassa sono poste in stufa a 90 [°C] per 24 [ore]. In questo modo si ottiene l'evaporazione dell'acqua al fine di poter proseguire con la pesatura del peso secco della biomassa. Mediante confronto con la tara del giorno precedente, è possibile dedurre qualitativamente il tasso di crescita batterica.

La biomassa secca viene prelevata, pesata e aggiunta in tubi pyrex resistenti ad alte temperature. A ciascun campione viene aggiunto 1 [mL] di acido solforico H_2SO_4 (95.0%-98.0%). I tubi pyrex sono incubati per 1 ora, a $90^{\circ}C$ in un bagnetto contenente olio siliconico con stirrer, figure 53 e 54.

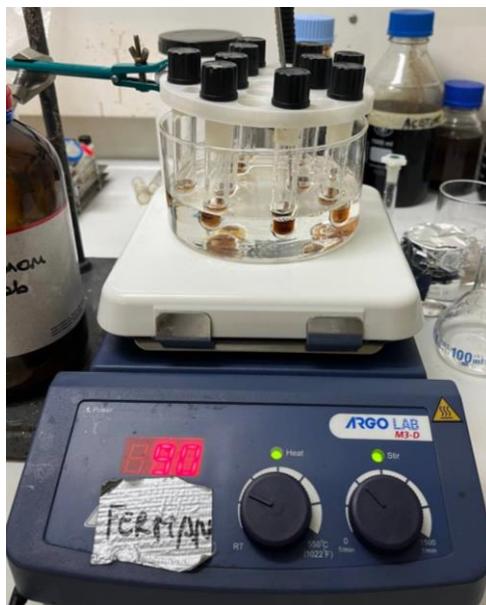


Figura 53: Estrazione PHB su scala laboratoriale realizzata mediante uso di tubi in pyrex incubati per 1 [h] a $90^{\circ}C$ in un bagnetto di olio siliconico con stirrer.

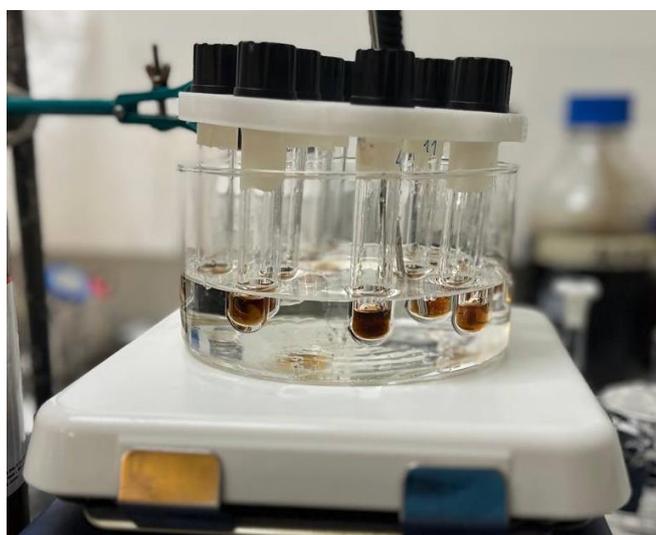


Figura 54: Dettaglio estrazione PHB.

Trascorso il tempo di analisi, la biomassa è diluita con acqua deionizzata con un rapporto 1:1000, filtrata con filtri non sterili in PES da $0.2\ [\mu m]$ e analizzata all'HPLC. Il tempo di ritenzione del PHB è pari a $23.2\ [min]$, dunque i campioni sono analizzata per un tempo pari a $30\ [minuti]$.

Da un'accurata analisi del cromatogramma a $210\ [nm]$ Detector PDA ottenuto all'HPLC, si individuano i picchi corrispondenti al polioidrossibutirrato. L'area sottesa al picco risulta proporzionale alla concentrazione del biopolimero.

Dall' equazione della retta di taratura del PHB, è possibile calcolare analiticamente la concentrazione del composto. Difatti, dall'equazione della retta $y = mx + q$, con $y = \text{area picco}$, m e q ricavati sperimentalmente, è possibile valutare il valore di x corrispondente proprio alla concentrazione [g/L] del composto analizzato.

Dalla concentrazione di PHB stimato con analisi HPLC e noto il volume di reazione (3 [mL]), si calcolano i grammi di PHB ottenuti nel test (*Formula 5*):

$$\text{Concentrazione PHB} \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{\text{massa PHB [g]}}{\text{volume di reazione [L]}} \quad (\text{Formula 5})$$

Il valore di concentrazione è correlato al peso della biomassa secca estratta, ottenendo la % di PHB presente in ciascun campione (*Formula 6*).

$$\text{PHB (\%)} = \frac{\text{massa PHB nella biomassa estratta [g]}}{\text{massa biomassa [g]}} * 100 \quad (\text{Formula 6})$$

2.6 Test di coltivazione di *Cupriavidus necator*

L'analisi prevede la crescita in beuta del ceppo batterico *C. necator* con prove in triplicato al fine di ottenere informazioni sull'andamento della crescita e relativo consumo di substrato.

Utilizzando una falcon sterile da 50 [mL], si effettua un preinoculo in 5 [mL] di terreno LB batterio *C. necator* con $OD_{600} = 0.1$ partendo da $OD_{600} = 2$.

Il volume di batterio da prelevare viene calcolato mantenendo costante il prodotto tra densità ottica a 600 [nm] e volume. Nel dettaglio, *Formula 7*:

$$C_{iniziale} * V_{iniziale} = C_{finale} * V_{finale} \quad (\text{Formula 7})$$

con $C_{iniziale} = 2$, $C_{finale} = 0.1$, $V_{iniziale} = 5$ [mL], ottenendo $V_{finale} = 250$ [μ L].

Il preinoculo è incubato per 24 [h] a 30[°C] e 170 [rpm], figura 55.



Figura 55: Incubazione delle falcon, precoltura I di *C. necator*.

Trascorse le 24 [ore], si procede con la seconda precoltura.

Si misura l'OD₆₀₀ del batterio della precoltura I e tramite la Formula 7 si calcola il volume da prelevare per ottenere nuovamente OD₆₀₀=0.1 in 50 [mL] di terreno precoltura II. Per questo step si utilizza una flask sterile da 250 [mL].

Si prosegue con 24 [h] di incubazione a 30 [°C], 170 [rpm], figura 56.



Figura 56: Incubazione flask, precoltura II di *C. necator*.

Successivamente, si procede con la fermentazione in triplicato utilizzando un volume finale di 150 [mL] per ciascuna beuta. Mediante analisi delle OD₆₀₀, viene valutato il volume di precoltura II da prelevare per ottenere un valore di densità ottica pari a 0.1. In questo step, i 12 [g/L] di glucosio necessari per la fermentazione di *C. necator* (tabella 7) sono sostituiti con 12 [g/L] di un mix di zuccheri glucosio-mannosio-arabinosio secondo i seguenti rapporti in peso A) glucosio: mannosio= 1:6.5, B) glucosio:arabinosio=1:4.5. Il terreno utilizzato è il terreno di fermentazione. La soluzione viene incubata a 30 [°C], 170 [rpm] per 54 [h].

Durante il periodo di fermentazione è valutata in maniera approssimativa la crescita batterica mediante misurazione della densità ottica a 600 [nm] dopo 0, 5.5, 21, 24, 27, 30, 45, 48, 54 [ore]. Inoltre, sono condotti dei campionamenti (congelati immediatamente a -20 [°C]) per la successiva estrazione di PHB.

2.7 Test di coltivazione di *Halomonas halophila*

L'analisi prevede la crescita in beuta del ceppo batterico *H. halophila* con prove in triplicato al fine di ottenere informazioni sull'andamento della crescita e relativo consumo di substrato.

Sono state effettuate prove di crescita e fermentazione su glucosio, su un mix di zuccheri glucosio-mannosio-arabinosio e sugli zuccheri estratti dalla microalga *P. tricorutum*.

2.7.1 Crescita di *H. halophila* su glucosio

Utilizzando una flask sterile da 250 [mL], si effettua un preinoculo in 50 [mL] di terreno complex medium K2 del batterio *H. halophila* con OD₆₀₀=0.1 partendo da OD₆₀₀=2.

Il volume di batterio da prelevare viene calcolato mantenendo il prodotto tra densità ottica a 600 [nm] e volume costante. Nel dettaglio, Formula 7:

$$C_{iniziale} * V_{iniziale} = C_{finale} * V_{finale} (\text{Formula 7})$$

con $C_{iniziale}=2$, $C_{finale}=0.1$, $V_{iniziale}=50$ [mL], ottenendo $V_{finale}=2.5$ [mL].

Il preinoculo viene incubato per 24 [h] a 30[°C] e 170 [rpm].

Successivamente, si procede con la fermentazione in triplicato utilizzando un volume finale di 250 [mL] in beute sterili da 500 [mL]. Mediante analisi delle OD₆₀₀, viene valutato il volume di precoltura da prelevare per ottenere un valore di densità ottica pari a 0.1. Il terreno utilizzato in questo step è il mineral medium e il substrato carbonioso è dato esclusivamente dal glucosio (20 [g/L]). La soluzione viene incubata a 30 [°C], 170 [rpm] per 72 [h].

Durante il periodo di fermentazione è stata valutata in maniera approssimativa la crescita batterica mediante misurazione della densità ottica a 600 [nm] dopo 0, 9, 24, 30, 33, 48, 53, 72 [ore]. Inoltre, sono stati condotti dei campionamenti dopo 0, 9, 24, 30, 33, 48, 53, 57 72 [ore], congelati immediatamente a -20 [°C] per la successiva estrazione di PHB.

2.7.2 Crescita di *H. halophila* su glucosio, mannosio e arabinosio

Le prove di crescita e fermentazione del batterio *H. halophila* sono state ripetute utilizzando, per la fermentazione, come contributo zuccherino un mix glucosio-mannosio-arabinosio.

Utilizzando falcon sterili da 10 [mL], si effettua un preinoculo in 10 [mL] di terreno complex medium K2 del batterio *H. halophila* con OD₆₀₀=0.1 partendo da OD₆₀₀=2.

Il volume di batterio da prelevare viene calcolato mantenendo costante il prodotto tra densità ottica a 600 [nm] e volume. Nel dettaglio, *Formula 7*:

$$C_{iniziale} * V_{iniziale} = C_{finale} * V_{finale} (\text{Formula 7})$$

con $C_{iniziale}=2$, $C_{finale}=0.1$, $V_{iniziale}=10$ [mL], ottenendo $V_{finale}=500$ [μL].

Il preinoculo viene incubato per 24 [h] a 30[°C] e 170 [rpm].

Successivamente, si procede con la fermentazione in triplicato utilizzando un volume finale di 150 [mL] in beute sterili da 500 [mL]. Mediante analisi delle OD₆₀₀, è valutato il volume di precoltura da prelevare per ottenere un valore di densità ottica pari a 0.1. Il quantitativo di glucosio pari a 20 [g/L] è stato sostituito con 20 [g/L] di un mix di zuccheri glucosio-mannosio-arabinosio secondo i seguenti rapporti in peso A) glucosio: mannosio= 1:6.5, B) glucosio:arabinosio=1:4.5. Il terreno utilizzato in questo step è il mineral medium. La soluzione viene incubata a 30 [°C], 170 [rpm] per 72 [h].

Durante il periodo di fermentazione è stata valutata in maniera approssimativa la crescita batterica mediante misurazione della densità ottica a 600 [nm] dopo 0, 19, 24, 42, 48, 65, 72 [ore]. Sono stati condotti dei campionamenti dopo 0, 24, 42, 48, 65, 72 [ore], la soluzione prelevata è stata immediatamente congelata a -20 [°C] per la successiva estrazione di PHB.

2.7.3 Crescita di *H. halophila* su idrolizzato algale

Gli esperimenti riguardanti la crescita e la fermentazione del batterio *H. halophila* sono stati ripetuti impiegando gli zuccheri estratti dalla biomassa algale come fonte carboniosa per la fermentazione. Utilizzando una flask sterile da 250 [mL], si effettua un preinoculo in 50 [mL] di terreno complex medium K2 del batterio *H. halophila* con OD₆₀₀=0.1 partendo da OD₆₀₀=2.

Il volume di batterio da prelevare è calcolato mantenendo costante il prodotto tra densità ottica a 600 [nm] e volume. Nel dettaglio, *Formula 7*:

$$C_{iniziale} * V_{iniziale} = C_{finale} * V_{finale} (\text{Formula 7})$$

con $C_{iniziale}=2$, $C_{finale}=0.1$, $V_{iniziale}=50$ [mL], ottenendo $V_{finale}=2.5$ [mL].

Il preinoculo viene incubato per 24 [h] a 30[°C] e 170 [rpm].

Successivamente si procede con la fermentazione in triplicato utilizzando un volume finale di 250 [mL] in beute sterili da 500 [mL]. Mediante analisi delle OD₆₀₀ è valutato il volume di precoltura da prelevare per ottenere un valore di densità ottica pari a 0.1. In questo caso, si inizia la fermentazione con un quantitativo minore di glucosio, i 20 [g/L] del protocollo sono sostituiti con 12 [g/L]. La soluzione viene incubata a 30 [°C], 170 [rpm] per 72[h].

Durante il periodo di fermentazione (dopo 9,24,29,48 [ore]) è stato eseguito un fed-batch di zuccheri dall'idrolizzato algale. Attraverso i flussi in ingresso di nutrienti si vuole mantenere il volume entro un certo range in maniera tale da consentire la fermentazione.

Nello specifico:

- Dopo 9,29,48 [ore]: vengono campionati in sterilità 20 [mL] di soluzione da ciascuna beuta, di cui 15 [mL] sono centrifugati a 15 [°C], con RCF=4969 [xg], per 20 minuti e 5 [mL] sono congelati a -20[°C] per la successiva preparazione della biomassa secca.

Il surnatante ottenuto dalla centrifuga è filtrato con filtri in PES da 0.2 [µm] e analizzato all'HPLC.

Successivamente ad ogni campionamento, è effettuata una misura del pH di ciascuna beuta in maniera tale da mantenerlo in un range tra 6 e 7 mediante l'eventuale utilizzo di base NaOH 8M. Un ambiente a pH neutro consente la crescita, ostacolando la presenza di fattori di inibizione.

A questo punto, sono aggiunti 15 [mL] di idrolizzato algale in ciascuna beuta, effettuando dunque un feeding di 3 [g/L].

Il pellet ottenuto dalla centrifuga viene vortexato in 3 [mL] di terreno mineral medium e re-inserito all'interno di ogni beuta. Viene controllato nuovamente il pH ed eventualmente ripristinato mediante l'uso di base NaOH 8M, evitando un ambiente eccessivamente acido. Infine, sono prelevati e filtrati con filtri in PES da 0.2 [µm] 2 [mL] di soluzione per analisi HPLC.

- Dopo 24 [ore]: sono stati ripetuti gli stessi passaggi descritti sopra, partendo però da un campionamento in sterilità di 25 [mL], di cui 20 [mL] vengono centrifugati e 5 [mL] vengono congelati. In questo modo, si ottiene un flusso in ingresso di nutrienti di concentrazione pari a 4 [g/L].

Dopo 0, 9, 24, 29, 33, 48, 57, 72 [ore], l'iter seguito è il seguente: si prelevano sotto cappa 3 [mL] in delle eppendorf non sterili, vengono centrifugati con RCF= 6931 [xg] per 5 [minuti]. Il surnatante è filtrato con filtri in PES da 0.2 [µm] e analizzato all'HPLC.

Nelle figure 57 e 58 sono raffigurati le fasi sperimentali che precedono e susseguono il primo feeding, realizzato dopo 9 [ore] dall'inoculo. Come si nota dal colore delle soluzioni nelle flask, l'idrolizzato algale ha reso la soluzione molto più scura rispetto alla colorazione iniziale, impedendo le analisi di densità ottica.

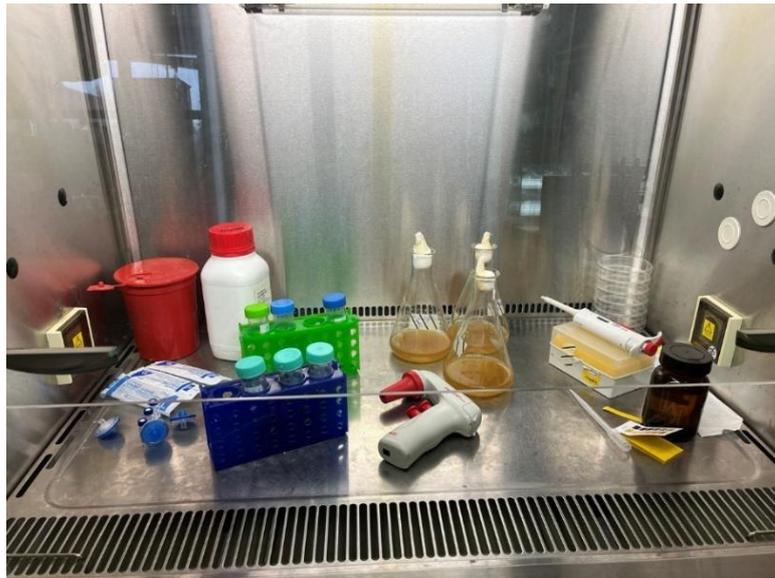


Figura 57: Nona ora del test di crescita in modalità fed-batch:
fase pre feeding idrolizzato algale.

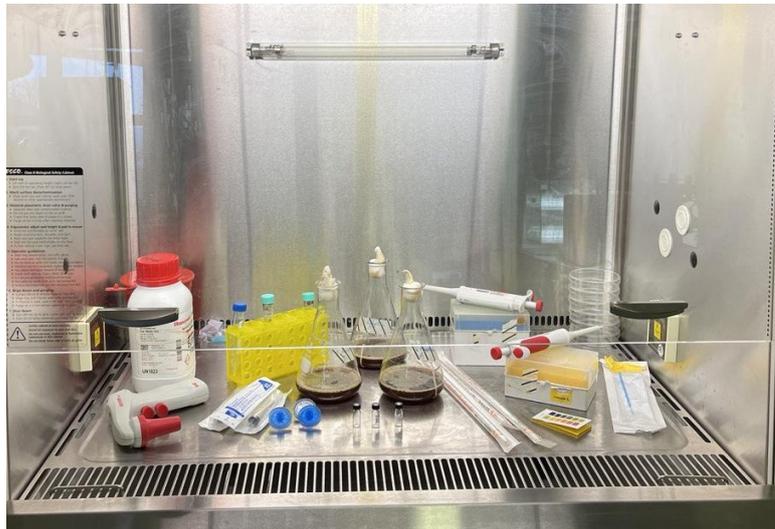


Figura 58: Nona ora del test di crescita in modalità fed-batch:
fase post feeding idrolizzato algale.

3. Risultati

Nel capitolo ‘Risultati’ sono analizzati gli esiti ottenuti dalle prove sperimentali affrontate nel seguente lavoro di tesi. Nella prima parte sono illustrati i risultati ottenuti dallo studio di Design Of Experiment al fine di fissare i parametri che ottimizzano l’estrazione degli zuccheri dalla microalga *P. tricornutum*. Successivamente, è condotto un confronto tra la crescita su mix zuccherino glucosio-mannosio-arabinosio di *Cupriavidus necator* e *Halomonas halophila*. Infine, sono approfonditi i valori di crescita, fermentazione, produzione poliidrossibutirrato (PHB) del batterio alofilo con apporto carbonioso ottenuto da glucosio, mix zuccherino glucosio-mannosio-arabinosio e da zuccheri estratti dalla diatomea.

3.1 Estrazione zuccheri da *Phaeodactylum tricornutum*

In questa sezione sono indagati i risultati ottenuti dalle prove di estrazione acida. In particolare, è illustrato sotto forma di grafici a barre (figure 59, 60, 61, 62) l’andamento delle concentrazioni di glucosio, mannosio ed arabinosio dei vari campionamenti sostenuti durante la durata del test. Per ogni zucchero è esaminata la media aritmetica delle concentrazioni del triplicato sperimentale.

Nelle figure 59 e 60 sono rappresentati gli esiti dei TEST 1 e 2, eseguiti utilizzando un rapporto biomassa/solvente pari a 1/10 [g/ml] e una concentrazione di acido solforico al 5 % e 10% in peso rispettivamente. Nelle successive due figure sono illustrati i risultati dei TEST 3 e 4, i quali prevedono un’estrazione acida con rapporto di 1/20 [g/mL] ed, in ordine, concentrazione di H₂SO₄ pari a 5 % e 10 %.

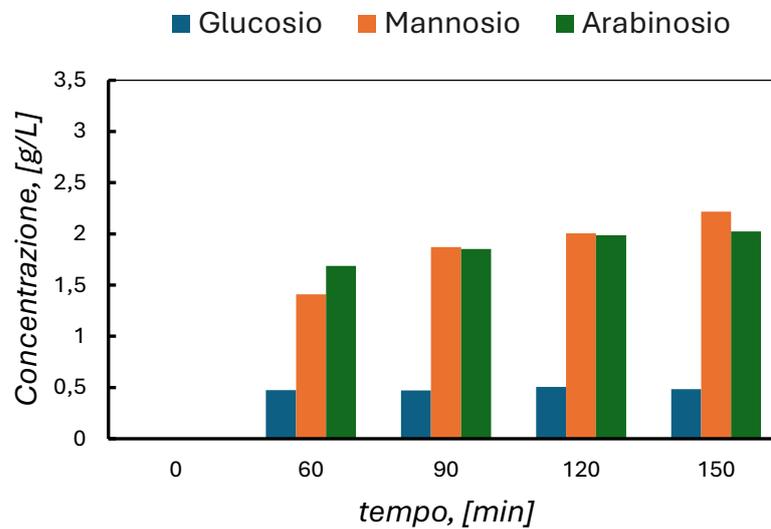


Figura 59: Andamento zuccheri, TEST 1 (concentrazione 5% in peso e rapporto 1/10 [g/mL]).

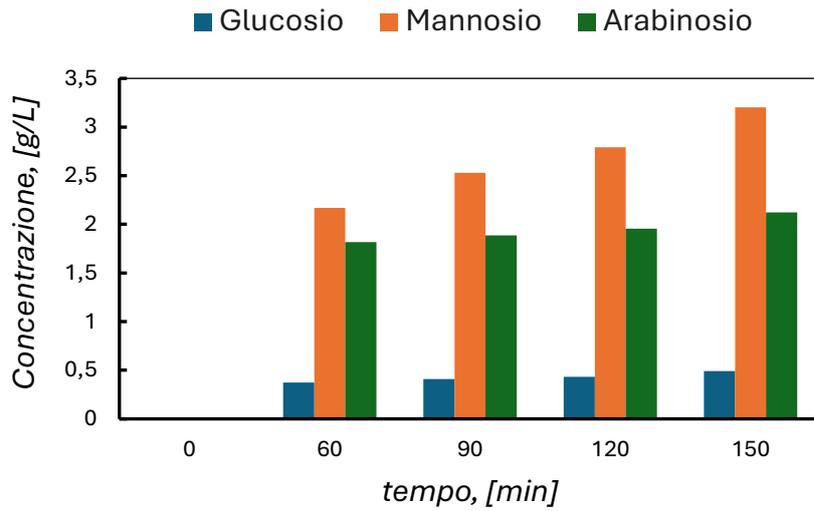


Figura 60: Andamento zuccheri, TEST 2 (concentrazione 10% in peso e rapporto 1/10 [g/mL]).

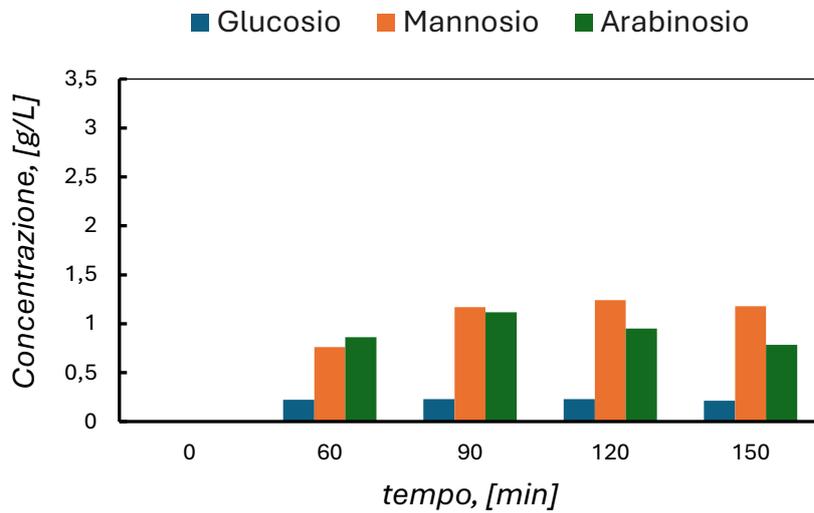


Figura 61: Andamento zuccheri, TEST 3 (concentrazione 5% in peso e rapporto 1/20 [g/mL]).

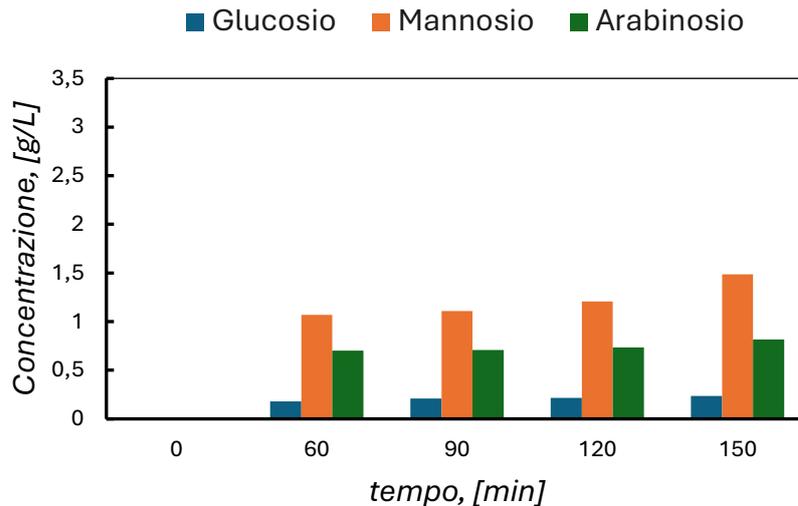


Figura 62: Andamento zuccheri, TEST 4 (concentrazione 10% in peso e rapporto 1/20 [g/mL]).

Dai grafici a barre è possibile apprezzare la variazione della concentrazione degli zuccheri al variare del tempo di campionamento. Si nota che, per tutte e quattro le condizioni operative, la concentrazione del glucosio rimane circa costante, mentre il quantitativo di mannosio e arabinosio cresce all'aumentare del tempo.

Per quanto concerne i TEST 1 e 3, si osserva un'estrazione maggiore di arabinosio rispetto agli altri due zuccheri per i campionamenti effettuati dopo 30 e 60 min per il primo test e dopo 60 minuti per le terze condizioni testate. Dal minuto 90 in poi, si osserva, invece, una quantità maggiore di mannosio rispetto alle altre due componenti zuccherine.

Mentre per i TEST 2 e 4 il trend di superiorità di estrazione del mannosio rispetto a glucosio e arabinosio è rispettato per la totalità dei campionamenti effettuati.

Per una migliore indagine, sono riassunti nella tabella 19 e nella figura 63 i valori degli zuccheri totali estratti, ottenuti dalla somma algebrica delle concentrazioni di glucosio, mannosio ed arabinosio. Nella tabella 19 è riportato in colore rosso per ogni test il quantitativo massimo di zuccheri raggiunto.

Tabella 19: [g/L] di zuccheri estratti totale.

Tempo [min]	Totale di zuccheri estratti [g/L]			
	TEST 1	TEST 2	TEST 3	TEST 4
60	3.57	4.36	1.84	1.95
90	4.20	4.83	2.52	2.03
120	4.50	5.18	2.42	2.16
150	4.72	5.81	2.18	2.54

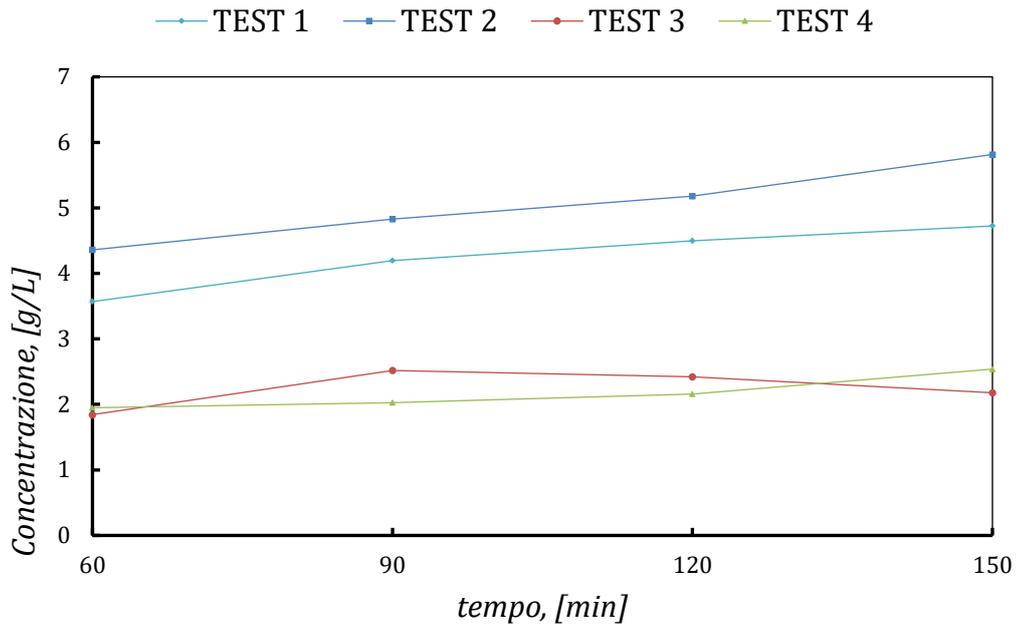


Figura 63: Concentrazione [g/L] di zuccheri totali estratti.

Dall'analisi della tabella 19 e della figura 63 è opportuno evidenziare come, eccetto per il TEST 3, la quantità maggiore di zuccheri estratti è ottenuta al tempo massimo di estrazione, ovvero 150 [minuti]. Mentre, per il TEST 3 il picco è raggiunto dopo soli 90 minuti, oltre i quali il quantitativo di zuccheri decresce. Questo fenomeno indica come una combinazione tra bassa concentrazione in peso di acido solforico e basso rapporto tra biomassa e solvente ostacoli l'estrazione degli zuccheri man mano che il tempo aumenta.

In generale, gli esiti delle prove che prevedono l'uso di un rapporto biomassa/solvente 1/10 [g/mL] (TEST 1 e 2) sono nettamente migliori rispetto ai valori forniti dalle prove con rapporto inferiore (TEST 3 e 4), come assimilabile da un'indagine della tabella 19.

Inoltre, l'accostamento tra concentrazione al 10% in peso e rapporto biomassa/solvente 1/10 [g/mL] sembra agevolare l'estrazione degli zuccheri dalla microalga *P. tricornutum* come mostrato dal grafico 63. Ponendo l'attenzione sulla variazione di concentrazione degli zuccheri nel tempo, si osserva, infatti, come la curva TEST 2 sovrasti le altre curve, presentando valori più alti nella totalità dei campionamenti.

Queste considerazioni suggeriscono un'efficienza migliore quando l'estrazione viene condotta con un rapporto biomassa/solvente pari a 1/10 [g/mL] e concentrazione di H₂SO₄ al 10 % in peso.

L'estrazione degli zuccheri con una concentrazione di acido solforico del 10% indica che condizioni più aggressive favoriscono il rilascio di zuccheri dalle cellule microalgali. Da questo si deduce come queste condizioni compromettano maggiormente l'integrità cellulare, facilitando l'estrazione degli zuccheri.

Inoltre, dai risultati del TEST 2, il quantitativo massimo di zuccheri estratti è raggiunto dopo 150 minuti, ottenendo un valore di concentrazione totale pari 5.81 [g/L], di cui 0.49 [g/L] di glucosio, 3.20 [g/L] di mannosio e 2.12 [g/L] di arabinosio.

Mentre, la concentrazione totale massima ottenuta si arresta a 4.72 [g/L] per il TEST 1, 2.52 e 2.54 [g/L] per i TEST 3 e 4.

Dalle considerazioni precedenti, i parametri che massimizzano l'estrazione zuccherina dalla microalga *P. tricornutum* e dunque utilizzati per la conduzione delle successive prove sperimentali del seguente lavoro sono:

- Temperatura pari a 90 [°C];
- Agitazione uguale a 200 [rpm],
- Rapporto biomassa/solvente=1/10 [peso/volume, g/mL];
- Concentrazione di acido solforico pari a 10% in peso (2N);
- Durata del test pari a 150 [min].

3.2 Scale up estrazione zuccheri da *Phaeodactylum tricornutum*

Per quanto concerne lo scale up delle prove di estrazione di zuccheri dalla microalga *P. tricornutum*, sono state condotte delle analisi di idrolisi acida impostando i parametri ottimali indagati nel capitolo 3. Successivamente sono state esaminate due diverse tecniche di concentrazione dell'idrolizzato algale: concentrazione mediante uso di evaporatore rotante e con stufa. In ambedue i casi si vuole ottenere l'evaporazione dell'acqua dall'idrolizzato algale.

Nel caso di concentrazione tramite stufa, sono stati esaminati diversi range di temperatura di essiccazione, impostando tale parametro a 90, 70 e 65 [°C].

I risultati ottenuti tramite colonna cromatografica di queste prove sono compendati nella tabella 20:

Tabella 20: Concentrazione [g/L] del concentrato algale.

Tecnica	Zuccheri estratti [g/L]
Evaporatore rotante	30.94
Stufa 90 [°C]	16.25
Stufa 70 [°C]	44.38
Stufa 65 [°C]	25.25

La tecnica di concentrazione mediante evaporatore rotante risulta difficoltosa da realizzare, costosa in termini di tempo ed energia. Anche da un'analisi dei risultati ottenuti, la concentrazione tramite stufa risulta la tecnica di concentrazione migliore. Inoltre, come appare evidente dagli esiti delle prove, la temperatura pari a 70 [°C] permette di massimizzare la concentrazione dell'idrolizzato algale. Sperimentalmente è stato evidenziato come sottoporre l'idrolizzato algale per un tempo di 24 [h] a temperature più basse di 70 [°C] non è sufficiente a far evaporare un adeguato quantitativo di acqua, mentre valori di temperatura maggiori causano la caramellizzazione degli zuccheri. Tale fenomeno è concorde con ciò che è affermato da Domenico Gabriel et al., i quali riportano come una temperatura sopra i 75 [°C] comporta una significativa caramellizzazione di zuccheri [74]. Oltre ad una differenza nei valori di concentrazione di zuccheri presenti, ottenuti tramite HPLC, è possibile apprezzare visivamente tale variazione analizzando la differenza di colore delle varie soluzioni concentrate (figure 64 e 65).



Figura 64: Concentrato algale ottenuto con: A) Evaporatore Rotante, B) Stufa 90 [°C], C) Stufa 70 [°C], D) Stufa 65 [°C].



Figura 65: da sinistra verso destra: concentrato algale ottenuto con essiccazione in stufa a 90 [°C], 70 [°C], 65 [°C].

Per la successiva prova di crescita batterica su idrolizzato algale è stata utilizzata una soluzione di idrolizzato algale data dall'unione dei vari composti ottenuti nelle diverse prove di estrazione. In questo caso, la concentrazione finale è ottenuta tramite calcolo della media aritmetica delle concentrazioni descritte nella tabella 20, raggiungendo un valore finale di circa 30 [g/L].

3.3 Crescita di *C. necator* su glucosio, mannosio ed arabinosio

Di seguito sono illustrati e analizzati i risultati delle prove in triplicato di fermentazione e produzione di PHB ottenuti con il batterio *Cupriavidus necator*.

Tramite analisi HPLC e analisi di densità ottica, sono stati valutati la crescita microbica all'interno del terreno di coltura testato, i consumi dei tre zuccheri glucosio, mannosio, arabinosio e la produzione di PHB. Le analisi sono condotte per un tempo pari a 48 [ore].

Nella figura 66 è evidenziato l'andamento della crescita batterica, valutata sia tramite misure di densità ottica con lunghezza d'onda $\lambda = 600$ [nm] (OD_{600}) sia tramite analisi di concentrazione di biomassa secca (CDW, cell dry weight [g/L]), e della produzione di PHB ([g/L]).

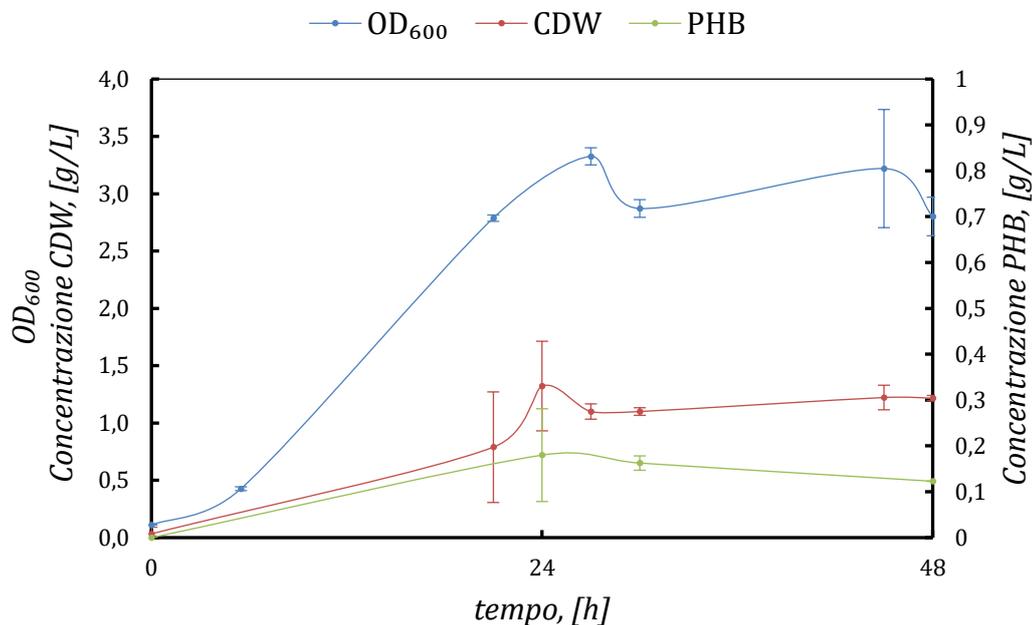


Figura 66: Andamento crescita batterica e produzione PHB, *C. necator* su mix zuccherino.

Da un'indagine delle curve sugli andamenti della densità ottica e della concentrazione di biomassa secca (curve blu e rossa nel grafico 66), è possibile riconoscere le quattro fasi della crescita microbica descritte nel capitolo 2.5.1.

Si osserva un breve periodo di latenza più evidente nel caso della curva OD_{600} , durante il quale *C. necator* subisce una fase di acclimatazione. Dalla sesta ora in poi, si nota una fase di crescita esponenziale: dopo 24 [h] il batterio raggiunge il valore di concentrazione di biomassa massima pari a 1.32 [g/L].

Le prime due fasi sono seguite dalla fase stazionaria durante la quale sia OD_{600} che CDW rimangono circa costanti.

Infine, come osservabile dal tratto finale della curva OD_{600} , *C. necator* attraversa la fase di declino con un decremento dei valori di densità ottica.

Da uno studio analitico della crescita microbica, utilizzando le formule descritte nel capitolo 2.5.1, è possibile valutare il tasso di crescita specifico del batterio *C. necator* su mix zuccherino. L'attenzione è stata posta sul valore massimo del tasso di crescita, osservando che alla ventiquattresima ora del test è stato registrato un valore di 0.17 [h^{-1}]. Tale risultato

fornisce un'indicazione precisa della velocità con cui *C. necator* si sviluppa nel terreno testato durante la fase di crescita esponenziale, riflettendo l'efficacia del substrato zuccherino nel favorire la crescita del batterio.

Contestualmente alla crescita microbica, si osserva la produzione di PHB, il cui andamento è descritto dalla curva verde del grafico 66.

Al tempo zero la produzione è chiaramente nulla. Successivamente, la concentrazione di PHB cresce nel tempo: dopo le prime 24 [h] raggiunge un valore di 0.18 [g/L]. La produzione arriva al massimo valore proprio in corrispondenza del picco del tasso di crescita, come evidenziato dal vertice raggiunto dalla curva verde alle 24 [h]. Durante le fasi di stazionarietà e di declino, la produzione di PHB diminuisce con un valore finale dopo 48 [h] di 0.12 [g/L].

È interessante osservare il consumo dei tre zuccheri da parte del microorganismo *C. necator*, riportato nella figura 67.

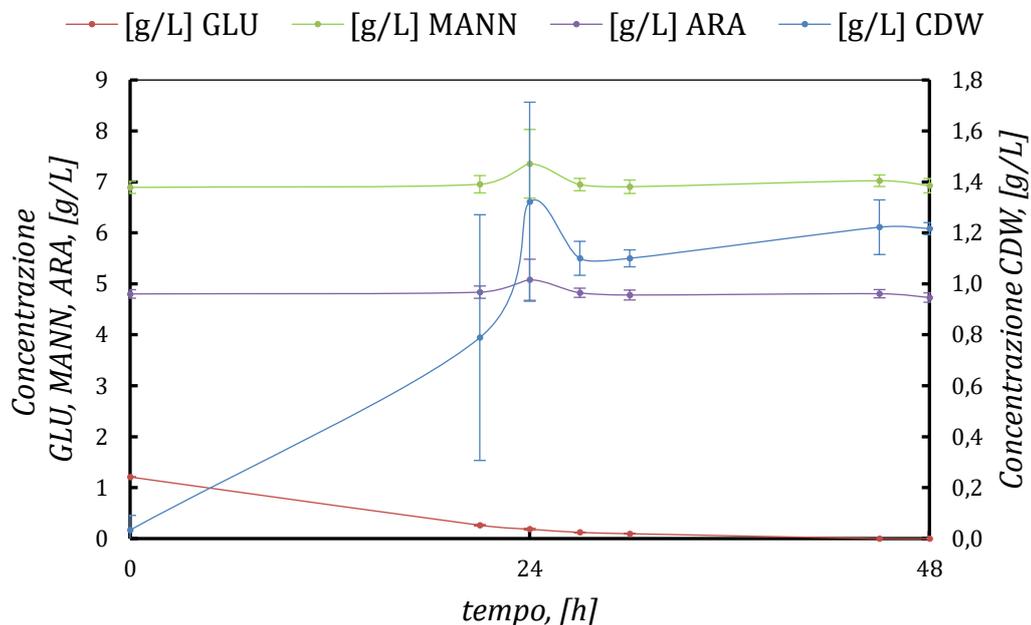


Figura 67: Andamento consumo zuccheri e concentrazione biomassa secca su mix zuccherino, *C. necator*

Analizzando la variazione di concentrazione dei tre zuccheri glucosio, mannosio, arabinosio (GLU, MANN, ARA) durante le 48 [ore] di prove di fermentazione, è possibile comprendere il tasso di consumo di *C. necator*.

Si osserva un totale consumo di glucosio: al tempo zero sono inoculati 1.2 [g/L], la concentrazione decresce nel tempo raggiungendo in corrispondenza del valore di picco del tasso di crescita un valore di 0.18 [g/L], arriva allo zero dopo 45 [h] dall'inizio del test.

Contestualmente, invece, si nota come *C. necator* non sia in grado di utilizzare gli zuccheri mannosio ed arabinosio. Le loro concentrazioni si stabilizzano per tutta la durata del test ai valori di inoculo iniziale: 6.9 [g/L] per il mannosio e 4.8 [g/L] per l'arabinosio. Al momento finale dell'esame, sperimentalmente i valori di concentrazione di mannosio e arabinosio sono pari rispettivamente a 6.9 [g/L] e 4.7 [g/L].

Dalle indagini condotte, è possibile concludere come il batterio *C. necator* sia in grado di utilizzare per il suo metabolismo e crescita esclusivamente il glucosio, substrato carbonioso più semplice tra quelli testati. Mentre, rimane nullo il consumo delle fonti di carbonio

mannosio e arabinosio. Nonostante il totale consumo di glucosio, il tasso di crescita e di produzione di PHB non raggiungono valori elevati, assestandosi a valori massimi di 1.32 [g/L] di biomassa, 0.18 [g/L] di PHB e OD₆₀₀ pari a 3.33.

3.4 Crescita di *Halomonas halophila* su glucosio

Per quanto concerne il batterio alofilo *H. halophila*, sono state condotte delle prove preliminari di fermentazione e produzione di PHB utilizzando come substrato carbonioso esclusivamente il glucosio. I risultati del triplicato sperimentale sono analizzati e discussi nel seguente capitolo.

Mediante analisi alla colonna cromatografica e di densità ottica, sono stati valutati la crescita microbica all'interno del terreno di coltura testato, i consumi di glucosio e la produzione di PHB. Le analisi sono condotte per un tempo pari a 72 [ore].

Nella figura 68, sono riportati gli andamenti del tasso di crescita, mediante analisi della densità ottica con $\lambda=600$ [nm] (OD₆₀₀) e concentrazione di biomassa secca (CDW, cell dry weight [g/L]), e di produzione di PHB ([g/L]).

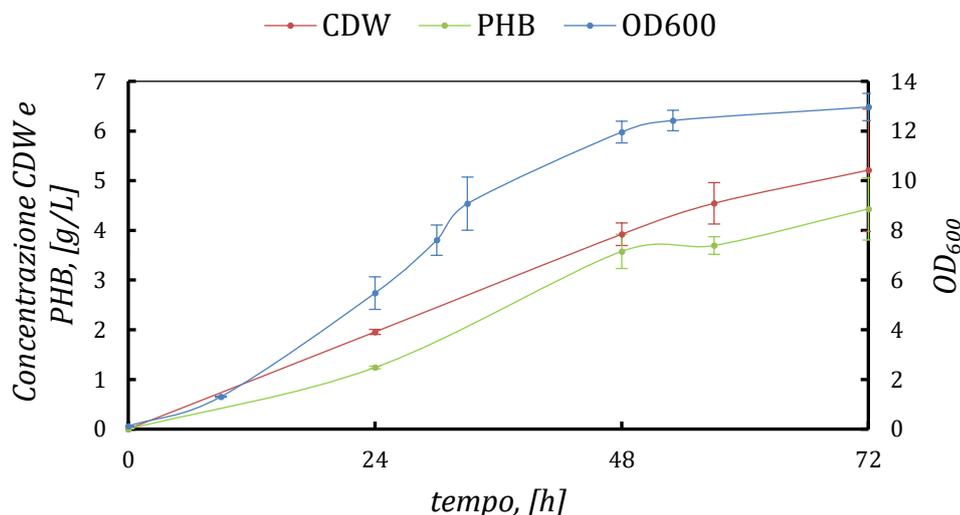


Figura 68: Andamento tasso di crescita e produzione PHB su glucosio, *H. halophila*.

Approfondendo la variazione nel tempo della densità ottica, si osserva il susseguirsi delle prime tre fasi di crescita microbica descritte nel capitolo 2.5.1.

Da un'analisi del primo tratto della curva, si osserva la presenza della fase di latenza, la quale ha una durata di 9 [h]. Questa è seguita da una fase di crescita esponenziale, come evidenziato dall'elevata pendenza della curva. Durante tale periodo, che va dalle 9 [h] alle 48 [h], la densità ottica di *H. halophila* subisce un forte incremento raggiungendo un valore di 11.97 dopo 48 [h]. Successivamente arriva ad assestarsi a valori nel range di [12-13], decretando l'inizio della fase stazionaria. Sperimentalmente non è osservabile la fase di declino finale.

Analizzando l'andamento della concentrazione di biomassa secca nel tempo, questa presenta un elevato e celere aumento nelle prime 48 [h], variando da un valore nullo ad una quantità pari a 3.92 [g/L]. Successivamente, la velocità di crescita subisce un rallentamento con un valore di 5.21 [g/L] dopo 72 [ore].

Il valore di concentrazione di biomassa secca dopo 72 [h] è coerente con il valore raggiunto da Kucera et al. in uno studio del 2018. Essi ottengono una concentrazione di 5.62 ± 0.03 [g/L] quando testano la crescita di *H. halophila* CCM 3662 su glucosio con 66 [g/L] di NaCl come in questo caso [44].

Risulta coerente anche con i risultati ottenuti da Thomas et al. con *Halomonas* sp. SF2003 con un valore superiore a 2.63 [g/L] [48].

La crescita microbica è studiata anche attraverso analisi dettagliate basate sulle formule delineate nel capitolo 2.5.1 del presente lavoro. Nel contesto specifico del batterio *H. halophila*, l'indagine rivela che il tasso di crescita specifico massimo su glucosio raggiunge $0.03 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ entro 48 ore dall'inizio dell'esperienza. Questo parametro fornisce una misura della velocità di crescita del batterio alofilo nel substrato considerato durante la fase di crescita esponenziale, riflettendo la sua capacità di adattarsi e proliferare nel terreno testato.

Il tasso di crescita procede in contemporanea alla produzione di PHB. La curva verde del grafico 62 indaga l'andamento della concentrazione di PHB nel tempo. Si osserva inizialmente un significativo incremento della curva, la concentrazione raggiunge un valore di 3.58 [g/L] alla fine della fase di crescita esponenziale (48 [h]). Nella restante parte del tempo, la concentrazione continua a crescere, ma con una velocità minore, conseguendo un valore finale di 4.43 [g/L].

Anche in questo caso il valore finale di PHB è simile al quantitativo presentato da Kucera et al., i quali raggiungono una concentrazione di 4.58 ± 0.60 [g/L] [44].

Il consumo di glucosio da parte del batterio *H. halophila* è descritto nel grafico 69.

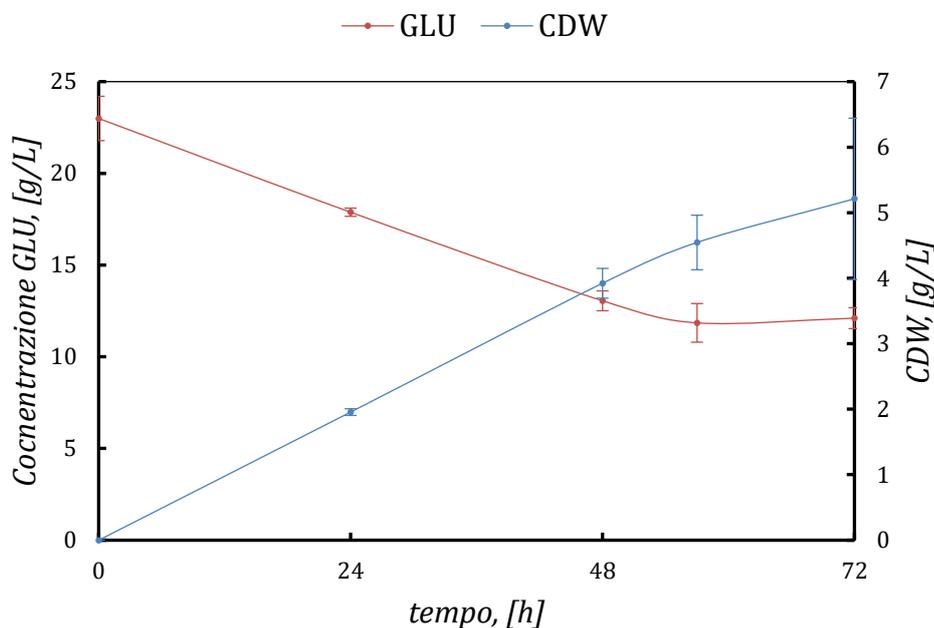


Figura 69: Andamento consumo zucchero e concentrazione biomassa secca su glucosio, *H. halophila*.

Da un'indagine della figura 69, si osserva che da un valore iniziale di inoculo di 22.99 [g/L], la concentrazione diminuisce velocemente nelle prime 48 [h], stabilizzandosi nella parte finale del test.

La decrescita di quantitativo di glucosio concorre con la contemporanea crescita della biomassa secca: il consumo del substrato carbonioso permette la crescita del batterio.

Il consumo di glucosio non è totale: dopo 72 [h] è ancora presente un quantitativo residuo di 12.10 [g/L] di glucosio.

Nella prova di crescita, fermentazione e produzione PHB con apporto carbonioso fornito esclusivamente da glucosio, *H. halophila* consuma 10.89 [g/L] di zucchero.

3.5 Crescita di *Halomonas halophila* su glucosio, mannosio ed arabinosio

Successivamente alle prove preliminari di fermentazione e produzione di PHB condotte con *H. halophila* su glucosio, è stato analizzato il tasso di consumo del mix di zuccheri glucosio, mannosio e arabinosio.

Tramite analisi HPLC e indagini di densità ottica, sono stati analizzati la crescita microbica all'interno del terreno di coltura testato, i consumi di glucosio, mannosio, arabinosio e la produzione di PHB. Le prove sperimentali sono condotte in triplicato per un tempo di 72 [ore].

L'andamento della crescita batterica, valutata sia tramite misure di densità ottica con lunghezza d'onda $\lambda = 600$ [nm] (OD_{600}) sia tramite analisi di concentrazione di biomassa secca (CDW, [g/L]), e della produzione di PHB ([g/L]) sono riportati nella figura 70.

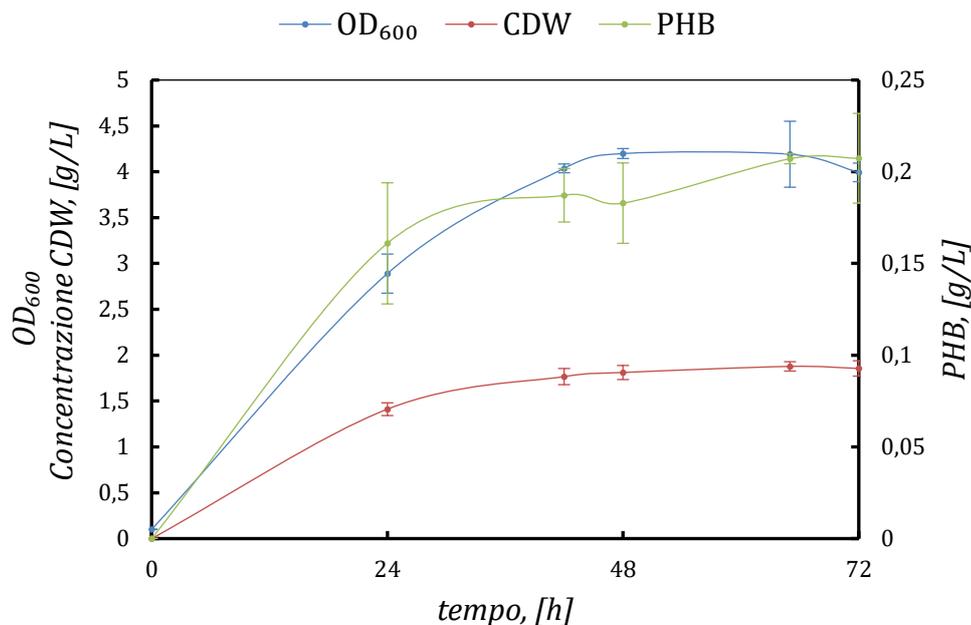


Figura 70: Andamento tasso di crescita e produzione PHB su mix di zuccheri, *H. halophila*.

In questo caso, non avendo condotto campionamenti prima delle 24 [ore], non è possibile confermare sperimentalmente la presenza di una fase di latenza. Nel test su glucosio, questa era visibile nelle prime 9 [ore] della prova.

Le curve sulle variazioni nel tempo di OD_{600} e concentrazione di biomassa secca crescono notevolmente dal tempo 0 alla quarantottesima ora, raggiungendo valori di 4.20 e 1.81 [g/L] rispettivamente. Di seguito, le variazioni sono minime con valori di concentrazioni circa costanti: ambedue le curve presentano un plateau.

Dalla sessantacinquesima ora in poi, il batterio attraversa la fase di declino, come evidenziato dal tratto discendente della curva OD_{600} , assumendo un valore finale pari a 3.99.

La crescita microbica è ulteriormente descritta analiticamente tramite le formule presenti nel capitolo 2.5.1 che consentono di valutare il tasso di crescita specifico del batterio *H. halophila* su mix zuccherino. Il valore massimo del tasso di crescita, osservato alla ventiquattresima ora del test, è di 0.01 [h⁻¹], indicando una crescita più lenta sul mix di zuccheri testato rispetto alla crescita su glucosio puro. La presenza di un quantitativo maggiore di glucosio, lo zucchero più semplice tra quelli utilizzati, favorisce un metabolismo più efficiente rispetto alla condizione in cui il substrato carbonioso è suddiviso in tre zuccheri differenti. Questo si riflette nei valori inferiori di biomassa secca e densità ottica osservati nel test su mix zuccherino rispetto a quelli ottenuti con la crescita su glucosio.

La produzione di PHB segue un rapido aumento dal tempo zero al tempo 65 [ore], assumendo un valore di 0.21 [g/L]. Da questo momento in poi, la concentrazione resta circa costante.

Il valore di concentrazione raggiunto è notevolmente più basso rispetto al caso di test condotto esclusivamente con apporto carbonioso dato da glucosio.

In questa prova la concentrazione massima di PHB è pari a 0.21 [g/L] contro 4.43 [g/L] ottenuti nel test su glucosio.

Per quanto concerne il tasso di consumo dei tre diversi zuccheri, si riporta la variazione della loro concentrazione durante le 72 [ore] nella figura 71.

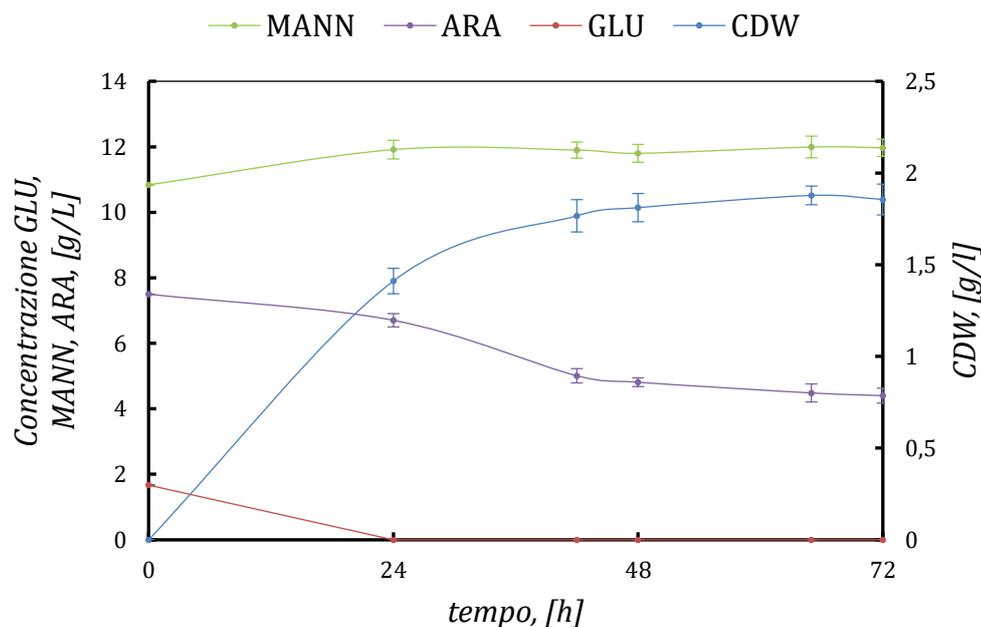


Figura 71: Andamento tasso di crescita e consumo zuccheri, *H. halophila*.

Dagli esiti del triplicato sperimentale, si evince come *H. halophila* sia in grado di metabolizzare sia il glucosio che l'arabinosio, mentre il consumo di mannosio rimane nullo. Studiando dettagliatamente la variazione della concentrazione degli zuccheri, si osserva un consumo totale di glucosio: da un valore iniziale di 1.67 [g/L], la concentrazione raggiunge il valore nullo dopo 24 [ore]. Il consumo di arabinosio è, invece, meno pronunciato: da un quantitativo al tempo zero di 7.5 [g/L], la concentrazione raggiunge una quantità di 4.81 [g/L] dopo 48 [ore] ed un valore di 4.40 [g/L] dopo 72 [ore]. *H. halophila* consuma in totale 3.10 [g/L] di arabinosio.

La concentrazione di mannosio rimane, invece, circa costante come evidenziato dalla curva verde del grafico 71. Il lieve aumento tra la quantità al tempo zero e i successivi valori è legato ad errori sperimentali commessi durante le prove. Infatti, il valore iniziale è stato calcolato teoricamente, ma non è stato misurato sul piano sperimentale. Probabilmente, a causa di errori sperimentali commessi nelle operazioni di campionamento, con l'inoculo iniziale è stata fornita una concentrazione di mannosio leggermente più alta.

La capacità di *H. halophila* di metabolizzare facilmente glucosio e arabinosio e in maniera molto difficoltosa il mannosio è riportato anche da Kucera et al., [44]. Tuttavia, contrariamente a quanto fatto nelle prove di questa tesi, Kucera et al. non testano la capacità di usare un substrato contenente tutti e tre gli zuccheri, ma analizzano la crescita su zuccheri singoli, come mostrato nella tabella 21:

Tabella 21: Risultati prove di fermentazione raggiunti da Kucera et al. [44].

Substrato	CDW [g/L]	PHB [g/L]
Glucosio	5.62 ± 0.03	4.58 ± 0.60
Mannosio	1.42 ± 0.10	0.96 ± 0.06
Arabinosio	5.17 ± 0.05	3.18 ± 0.55

Dagli esiti dei test sperimentali condotti utilizzando le tre fonti di carbonio, si osservano valori di crescita e produzione di PHB lievemente maggiori nel caso di *H. halophila* rispetto al batterio *C. necator*. Tuttavia, considerando lo studio analitico dei tassi di crescita specifici su mix zuccherino, il batterio alofilo presenta un valore di picco inferiore a quello ottenuto nel test con *C. necator*.

Nella tabella 22 sono confrontati i valori massimi di biomassa secca, tasso di crescita specifico e produzione di PHB ottenuti con i due diversi ceppi batterici.

Tabella 22: Confronto dati crescita di *C. necator* e *H. halophila* su mix zuccherino.

	<i>C. necator</i>	<i>H. halophila</i>
OD₆₀₀_MAX	3.33	4.20
CDW_{MAX} [g/L]	1.32	1.88
PHB_{MAX} [g/L]	0.18	0.21
μ_{MAX} [h⁻¹]	0.17	0.01

Il tasso di crescita specifico, che indica la velocità di crescita delle cellule batteriche durante la fase esponenziale, risulta essere maggiore in *C. necator* rispetto a *H. halophila*. Questo dato suggerisce che *C. necator* ha una capacità di divisione cellulare più rapida nelle prime fasi di crescita. Tuttavia, un tasso di crescita specifico elevato non necessariamente corrisponde a una maggiore biomassa finale o a una produzione superiore di PHB.

Infatti, *H. halophila* dimostra di avere una concentrazione di biomassa secca e una produzione di PHB superiori rispetto a *C. necator* nei vari tempi di osservazione.

C. necator presenta una rapida crescita iniziale, indice di una maggiore conversione del substrato carbonioso fornito, come indicato dal suo tasso di crescita specifico più alto; tuttavia, raggiunge la fase stazionaria più rapidamente, limitando la crescita complessiva e la produzione di PHB nel tempo. Al contrario, *H. halophila* ha un tasso di crescita specifico inferiore, che si traduce in una fase esponenziale più lenta, ma continua a crescere e ad accumulare biomassa e PHB anche dopo che *C. necator* ha raggiunto la fase stazionaria, risultando in valori finali di biomassa secca e produzione di PHB maggiori.

Inoltre, questo comportamento potrebbe essere legato al fatto che la conversione del substrato carbonioso nel caso di *H. halophila* è dirottata verso una maggiore produzione di PHB. Questo suggerisce come *H. halophila* possa essere più efficiente nel canalizzare i nutrienti disponibili verso la biosintesi di PHB piuttosto che verso la crescita cellulare, una caratteristica che potrebbe risultare vantaggiosa per applicazioni biotecnologiche focalizzate sulla produzione di biopolimeri.

I valori leggermente superiori in termini di densità ottica, concentrazione di biomassa secca e produzione PHB hanno permesso di prediligere l'utilizzo del batterio *H. halomonas* rispetto a *C. necator* per il successivo step di fermentazione e produzione di PHB mediante utilizzo degli zuccheri estratti dalla microalga *P. tricornutum*.

Anche i valori di consumo del mix zuccherino suggeriscono l'utilizzo del batterio alofilo rispetto a *C. necator*: mentre il primo è in grado di utilizzare 2 su 3 degli apporti carboniosi testati, il secondo consuma esclusivamente glucosio.

3.6 Crescita di Halomonas halophila su idrolizzato algale

Lo step finale del seguente lavoro di tesi prevede delle prove di fermentazione e produzione di PHB da parte di *H. halophila* utilizzando come apporto carbonioso gli zuccheri estratti dalla diatomea *P. tricornutum*.

In questo caso, a differenza delle prove precedentemente descritte, la crescita batterica è analizzata esclusivamente mediante analisi di concentrazione di biomassa secca. Le indagini di densità ottica sono state escluse a causa del colore scuro dell'idrolizzato algale usato per vari i fed-batch condotti durante la prova. Questo fattore ha impedito l'utilizzo dello spettrofotometro, necessario per la misurazione dei valori di OD₆₀₀. Anche in questo caso, le prove sono condotte in triplicato sperimentale con una durata di 72 [ore].

Le due curve presenti nella figura 72 descrivono la variazione nel tempo della concentrazione di biomassa secca e di produzione di PHB.

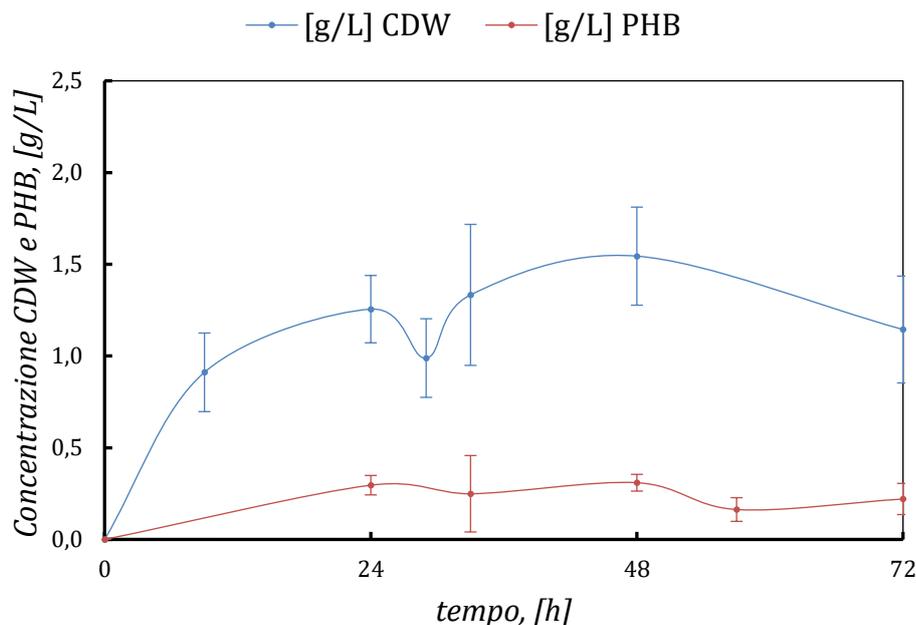


Figura 72: Andamento tasso di crescita e produzione PHB su idrolizzato algale, *H. halophila*.

Descrivendo dettagliatamente il grafico, si nota un andamento di concentrazione di biomassa e di PHB comparabili ai casi di crescita su glucosio e su mix zuccherino.

Osservando la curva sull'andamento della concentrazione di biomassa secca nel tempo, non è possibile definire se ci sia stata una fase di latenza nelle prime ore del test. Dalla nona ora in poi, la concentrazione aumenta velocemente raggiungendo un valore di picco pari a 1.54 [g/L] dopo 48 [ore]. Trascorsa la fase di picco, la curva sembra assumere valori circa costanti presentando una fase di stazionarietà. Nella parte finale del test, si presenta una fase di declino evidenziato dal decremento della curva, la concentrazione assume un valore finale di 1.14 [g/L].

Dalla curva rossa del grafico 66 si osserva la variazione di produzione di PHB: questa cresce in maniera celere nelle prime 24 [ore] raggiungendo dal valore nullo una quantità di 0.30 [g/L]. Nelle successive 24 [ore] la velocità di crescita subisce un rallentamento: la concentrazione assume un valore di picco di 0.31 [g/L] dopo 48 ore. Nella parte finale del test, la produzione di PHB decresce raggiungendo un valore finale di 0.22 [g/L].

I risultati ottenuti nella prova sperimentale sono coerenti con i valori raggiunti da uno studio nel quale è stata testata la crescita di *H. halophila* su vari substrati carboniosi complessi. Kucera et al. ottengono una concentrazione di biomassa secca pari a 1.80 ± 0.13 [g/L] e PHB 0.27 ± 0.02 [g/L] su idrolizzato diluito da fondi di caffè, 1.35 ± 0.04 [g/L] e 0.15 ± 0.01 [g/L] su idrolizzato diluito da segatura, 2.12 ± 0.1 [g/L] e 0.82 ± 0.01 [g/L] su idrolizzato diluito da stocchi di mais [44].

L'analisi della crescita batterica, effettuata utilizzando le formule per il calcolo del tasso di crescita specifico presentate nel capitolo 2.5.1, ha rivelato un valore di picco di 0.06 [h⁻¹] dopo 29 [ore] dall'inizio del test.

Per quanto riguarda il consumo degli zuccheri, nel grafico 73 sono evidenziati gli andamenti della concentrazione di glucosio, mannosio e arabinosio nel tempo. Inoltre, per una completa comprensione del test effettuato, si riporta anche l'andamento della concentrazione totale di zuccheri presenti durante tutta la durata del test.

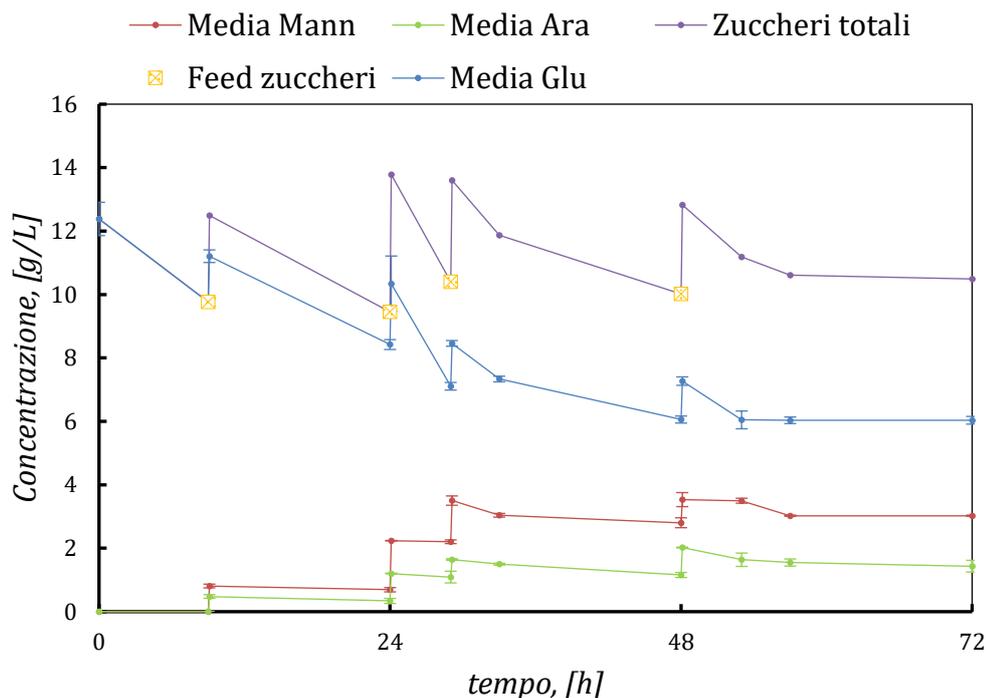


Figura 73: Consumo zuccheri su idrolizzato algale, *H. halophila*.

La concentrazione totale di zuccheri è mantenuta costante a 12 [g/L] con oscillazione di ± 2 [g/L] tramite tecnica fed-batch.

Inizialmente si ha una concentrazione pari a 12.38 [g/L], questa decresce nelle prime 9 ore e viene ripristinata al valore iniziale con il primo feeding di zuccheri. Questo fenomeno è evidenziato dalla curva viola che prima decresce e, successivamente al feeding raffigurato con il simbolo “x” di colore giallo, sale fino al raggiungimento del valore iniziale.

Lo stesso trend è verificato per ogni range di tempo che intercorre tra due feed consecutivi. Si osserva, infatti, il decremento della concentrazione totale a partire dalla nona ora fino al feeding delle 24 [ore], a questo punto sale fino ad un valore circa uguale al valore al tempo zero. Di nuovo, la curva diminuisce fin quando non è effettuato il terzo feeding dopo 29 [ore] e risale sino al valore circa uguale al valore iniziale. Lo stesso comportamento assume tra il tempo 29 [ore] e 48 [ore]. Successivamente all’ultimo feeding, la curva subirà una graduale diminuzione con valore finale pari a 10.57 [g/L].

Analizzando l’evoluzione della concentrazione di glucosio si osserva un andamento decrescente.

In particolare, la concentrazione decresce nelle fasi che precedono ogni feed, successivamente il valore viene incrementato grazie all’apporto di idrolizzato algale immesso nel terreno. L’aumento di glucosio ad ogni feed non è il medesimo, poiché la composizione dell’idrolizzato algale non è perfettamente omogenea.

Analizzando il contenuto di glucosio dei vari feed condotti, si ottengono i valori riassunti nella tabella 23:

Tabella 23: Concentrazione [g/L] di glucosio per ogni feed di idrolizzato algale.

Tempo [h]	Glucosio per ogni feed [g/L]
9	1.44
24	1.92
29	1.35
48	1.21

Con i vari feeding effettuati durante le 72 [ore] di prova è pari a 5.93 [g/L], mentre il contenuto di glucosio dell'inoculo al tempo zero è di 12.38 [g/L].

Nella tabella 24 si evidenzia il consumo di glucosio suddiviso per range di tempo:

Tabella 24: Consumo di glucosio nella prova di crescita di *H. halophila* su idrolizzato algale.

Range Tempo [h]	Glucosio consumato [g/L]
Da 0 a 9 [h]	2.62
Da 9 a 24 [h]	2.79
Da 24 a 29 [h]	3.24
Da 29 a 33 [h]	1.12
Da 33 a 48 [h]	1.28
Da 48 a 53 [h]	1.22
Da 53 a 57 [h]	0.01
Da 57 a 72 [h]	0.00

La somma di tutti i valori è pari a 12.27 [g/L]. Considerando gli errori legati alla strumentazione utilizzata, è possibile concludere come *H. halophila* abbia consumato totalmente il contenuto iniziale di glucosio pari a 12.38 [g/L], mentre rimane un residuo dopo 72 ore dato dall'apporto di glucosio legato ai feeding.

In questo caso, *H. halophila* si dimostra capace di metabolizzare lievemente il mannosio. Il valore iniziale è nullo perché l'inoculo effettuato al tempo zero contiene esclusivamente glucosio, il quantitativo di mannosio è fornito totalmente dall'idrolizzato algale.

Per ogni feeding, si immette nelle flask un quantitativo di mannosio che oscilla intorno al valore di 1 [g/L], dettagliatamente i valori sono raggruppati nella tabella 25.

Tabella 25: Concentrazione [g/L] di mannosio per ogni feed di idrolizzato algale.

Tempo [h]	Mannosio per ogni feeding [g/L]
9	0.81
24	1.55
29	1.30
48	0.73

Il quantitativo totale di mannosio fornito è di 4.38 [g/L].

Il lieve consumo di mannosio è analizzato nella tabella 26.

Tabella 26: Consumo di mannosio nella prova di crescita di *H. halophila* su idrolizzato algale.

Range Tempo [h]	Mannosio consumato [g/L]
Da 0 a 9 [h]	0.00
Da 9 a 24 [h]	0.12
Da 24 a 29 [h]	0.04
Da 29 a 33 [h]	0.46
Da 33 a 48 [h]	0.24
Da 48 a 53 [h]	0.03
Da 53 a 57 [h]	0.47
Da 57 a 72 [h]	0.00

Il consumo totale di mannosio è pari a 1.36 [g/L]. Come evidente da un'analisi della curva viola, la concentrazione finale di mannosio è di 3.03 [g/L], dato dalla differenza tra il quantitativo presente nella beuta e il quantitativo consumato.

Anche nel caso dell'arabinosio, il suo valore iniziale è nullo e il suo quantitativo è legato esclusivamente all'utilizzo di idrolizzato algale.

Il contenuto di arabinosio presente in ogni feeding è riportato nella tabella 27.

Tabella 27: Concentrazione [g/L] di arabinosio per ogni feed di idrolizzato algale.

Tempo [h]	Arabinosio per ogni feeding [g/L]
9	0.48
24	0.86
29	0.55
48	0.86

La somma di tutti i contributi è pari a 2.76 [g/L].

Per quanto concerne il consumo di arabinosio, *H. halophila* si dimostra capace di utilizzare circa il 50% del quantitativo di arabinosio disponibile. I valori di consumo sono descritti nella tabella 28.

Tabella 28: Consumo di arabinosio nella prova di crescita di *H. halophila* su idrolizzato algale.

Range Tempo [h]	Arabinosio consumato [g/L]
Da 0 a 9 [h]	0.00
Da 9 a 24 [h]	0.14
Da 24 a 29 [h]	0.11
Da 29 a 33 [h]	0.15
Da 33 a 48 [h]	0.34
Da 48 a 53 [h]	0.38
Da 53 a 57 [h]	0.09
Da 57 a 72 [h]	0.12

Globalmente si osserva un consumo di 1.33 [g/L] di arabinosio. Il valore residuo dopo 72 [h] è di 1.43 [g/L], quantitativo dato dalla differenza tra il quantitativo di zucchero fornito e quello consumato. Tale valore è evidenziato dal punto finale della curva che descrive l'evoluzione dell'arabinosio nel tempo.

La somma globale di tutti i feeding effettuati è di 13.07 [g/L], se si aggiunge il quantitativo di zucchero immesso al tempo zero si ottiene un valore totale di zuccheri di 25.45 [g/L]. Il consumo totale di zuccheri è di 14.96 [g/L], ottenuto dalla somma dei vari contributi di consumo di ogni zucchero.

Alla fine della prova sperimentale, rimane un residuo di zuccheri di 10.49 [g/L], come evidenziato dal valore finale della curva che riporta l'andamento degli zuccheri totali nel grafico 73.

3.7 Confronto tra crescita di *Halomonas halophila* su mix di zuccheri puri e su idrolizzato algale

Un confronto tra i risultati ottenuti dalle crescite di *H. halophila* su mix di zuccheri puri e su idrolizzato algale permette una comprensione globale dei risultati raggiunti nel seguente lavoro di tesi. La tabella 29 riassume i dati ottenuti confrontando la crescita di *Halomonas halophila* su un mix di zuccheri puri e su un idrolizzato algale. Da questi dati emerge un comportamento differenziato in termini di crescita batterica e produzione di PHB.

Tabella 29: Confronto risultati crescite su mix zuccheri puri e idrolizzato algale, *H. halophila*.

	<i>H. halophila</i> su mix zuccheri puri	<i>H. halophila</i> su idrolizzato algale
CDW_{MAX} [g/L]	1.88	1.54
PHB_{MAX} [g/L]	0.21	0.31
μ_{MAX} [h⁻¹]	0.01	0.06

H. halophila raggiunge una concentrazione massima di biomassa secca pari a 1.88 [g/L] quando cresciuta su mix di zuccheri puri, mentre sull'idrolizzato algale il valore si assesta a 1.54 [g/L]. Questo risultato suggerisce che i nutrienti presenti nel mix di zuccheri puri sono più facilmente assimilabili o presenti in concentrazioni ottimali per la crescita cellulare rispetto a quelli nell'idrolizzato algale.

Contrariamente alla crescita batterica, la produzione massima di PHB risulta maggiore quando *H. halophila* è cresciuta sull'idrolizzato algale, con un valore di 0.31 [g/L], rispetto a 0.21 [g/L] ottenuto con il mix di zuccheri puri. Questo dato indica che l'idrolizzato algale favorisce una maggiore biosintesi di PHB. Si potrebbe ipotizzare che l'idrolizzato algale ottenuto dalla microalga *P. tricornutum* non contenga solo zuccheri, ma anche una varietà di altri nutrienti, inclusi aminoacidi, vitamine e minerali. Questi componenti addizionali potrebbero agire come promotori della sintesi di PHB, migliorando l'efficienza metabolica di *H. halophila* rispetto al mix di zuccheri puri.

Inoltre, la tecnica di coltura fed-batch impiegata per l'idrolizzato algale consente un controllo più preciso delle condizioni di crescita e della disponibilità di nutrienti. Questo metodo riduce così l'accumulo di sostanze tossiche e allevia lo stress nutrizionale, creando un ambiente che favorisce la produzione di PHB piuttosto che la semplice proliferazione cellulare. La sintesi di PHB è un processo energeticamente dispendioso per i batteri. In condizioni non ottimali, i batteri possono deviare l'energia verso la produzione di PHB come riserva energetica. L'idrolizzato algale potrebbe fornire condizioni che stimolano questa risposta metabolica, mentre il mix di zuccheri puri, essendo una fonte di energia più facilmente utilizzabile, potrebbe supportare maggiormente la crescita cellulare a discapito della produzione di PHB.

Il tasso di crescita specifico massimo ottenuto su idrolizzato algale dimostra come la crescita su mix zuccherino estratto dalla microalga, condotta con tecnica fed-batch, risulta più rapida rispetto alla crescita sugli zuccheri puri utilizzando la tecnica batch, dove il tasso di crescita specifico è pari a 0.01 [h⁻¹]. L'aggiunta di idrolizzato algale contenente gli zuccheri durante l'intera prova consente una maggiore efficienza di conversione del substrato carbonioso, che si traduce sia in una velocità di crescita superiore sia in valori più elevati di produzione di PHB rispetto alla crescita su zuccheri puri.

Questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che la tecnica fed-batch permette di mantenere livelli ottimali di nutrienti nel mezzo di coltura, prevenendo condizioni di deplezione o eccesso che possono limitare la crescita batterica. In questo modo, *H. halophila* si dimostra in grado di metabolizzare più efficacemente il substrato disponibile, massimizzando sia la velocità di crescita che la sintesi di biopolimeri. Tali risultati suggeriscono un potenziale significativo per l'uso del mix zuccherino estratto dalla microalga in applicazioni industriali, dove l'efficienza di produzione di biopolimeri come il PHB è cruciale.

In conclusione, la crescita di *H. halophila* su zuccheri estratti dalla microalga *P. tricornutum* tramite idrolisi acida dimostra dei risvolti promettenti in termini di produzione di PHB. Questo approccio offre una strategia sostenibile ed efficiente per la bioproduzione di materiali polimerici, aprendo la strada a ulteriori sviluppi e ottimizzazioni nel campo delle bioplastiche.

4 Conclusioni e sviluppi futuri

Il seguente lavoro di tesi ha affrontato due temi: studio di estrazione zuccheri dalla microalga *P. tricornutum* e produzione PHB mediante crescita di batteri con apporto carbonioso dato esclusivamente dall'idrolizzato algale.

Per quanto concerne lo studio di estrazione di zuccheri dalla diatomea, è stata condotta un'analisi comparativa tra le diverse tecniche di estrazioni presenti sul mercato. Un compromesso tra efficienza e costi economici ha condotto all'adozione della tecnica di idrolisi acida.

Mediante uno studio di Design of Experiment sono stati definiti i parametri che hanno permesso di massimizzare la resa di estrazione, ottenendo un quantitativo di zuccheri pari a 5.81 [g/L] da *P. tricornutum*.

Gli spunti di miglioramento di questa fase possono essere svariati, per esempio potrebbe essere condotto un ulteriore studio DoE fissando i parametri ottenuti in questo lavoro e variando, invece, i parametri di temperatura e giri di agitazione; potrebbe essere valutato l'uso di altri acidi nell'idrolisi acida come acido cloridrico o nitrico; potrebbero essere studiate altre tecniche di estrazione, per esempio esplorando l'utilizzo di microonde o ultrasuoni che potrebbero incrementare il quantitativo di zuccheri estratti o ancora valutare l'utilizzo di solventi di estrazioni meno dannosi per uomo e ambiente.

La seconda fase del seguente saggio ha permesso di valutare la capacità di crescita su mix di zuccheri puri glucosio, mannosio, arabinosio da parte di due diversi ceppi batterici: *C. necator* DSM 445 e *H. halophila* CCM 3662.

Dalle prove sperimentali testate è emerso come il batterio alofilo mostri un'efficienza maggiore in termine di crescita e produzione PHB con questa tipologia di apporto carbonioso rispetto a *C. necator*.

Successivamente, è stata confrontata la crescita di *H. halophila* su mix di zuccheri puri con quella ottenuta utilizzando gli zuccheri estratti con idrolisi acida da *P. tricornutum*. I risultati sono promettenti: la crescita su idrolizzato algale presenta valori di produzione di PHB lievemente maggiori rispetto ai valori ottenuti nel test di crescita su mix di zuccheri puri, fattore chiave in un modello industriale di bioproduzione di polimeri.

Nonostante gli esiti positivi delle varie prove condotte, i valori raggiunti non sono molto elevati e accattivanti in un'ottica economica.

I risultati delle prove sperimentali affrontate in questo progetto di tesi potrebbero essere migliorati nei seguenti modi:

- Valutare sperimentalmente la concentrazione effettiva dell'idrolizzato algale ottenuto dalla miscelazione delle varie prove di estrazioni effettuate: prediligere analisi HPLC rispetto alla media aritmetica tra le varie concentrazioni;
- Considerare la variazione dei parametri settati nell'evaporatore rotante per la concentrazione dell'idrolizzato, per esempio si potrebbero studiare variazioni nella velocità di rotazione, pressione o volume del pallone di rotazione;
- Effettuare un controllo termico più accurato nelle fasi di estrazione tramite utilizzo di bagno termostatico da laboratorio, il quale consentirebbe un riscaldamento uniforme;
- Testare la crescita di altri ceppi batterici sugli zuccheri ottenuti dall'idrolisi di *P. tricornutum*.

A proposito dell'ultimo punto, da letteratura emergono ottime capacità di utilizzo di un ampio ventaglio di substrati carboniosi, quali glucosio, mannosio, arabinosio da parte del batterio *Burkholderia sacchari*.

Uno studio di Oliveira-Filho et al. dimostra la capacità di *B. sacchari* di usare efficientemente saccarosio, glucosio, xilosio, arabinosio, fruttosio, mannosio e galattosio per la produzione di PHA [43].

Dietrich et al. osservano l'utilizzo da parte di *B. sacchari* di glucosio, mannosio, xilosio, galattosio e arabinosio [75].

In uno studio di Cesario et al. si osserva la produzione di PHB di *B. sacchari* su un idrolizzato lignocellulosico contenente glucosio, xilosio e arabinosio [25].

Nell'analisi di Li et al. emerge l'abilità di questo batterio di metabolizzare simultaneamente glucosio, xilosio e arabinosio con produzione veloce di PHB [76].

I promettenti risultati ottenuti nel seguente lo studio di tesi incoraggiano l'ampliamento della ricerca sugli argomenti analizzati.

Le conclusioni raggiunte nella fase di estrazione rappresentano un importante risultato sia per il numero esiguo di studi presenti in letteratura di idrolisi di zuccheri a partire da *P. tricornutum* sia in un'ottica di bioraffineria.

Difatti, i valori raggiunti sembrano confermare il potenziale dato dall'utilizzo della parte carboniosa della microalga *P. tricornutum*, lasciando ampio spettro di applicazioni per i restanti nutrienti presenti nella biomassa. Per esempio, la diatomea in questione potrebbe essere al centro di un progetto di bioraffineria che propone l'estrazione tramite tecniche green di fucoxantina con risvolto sul settore cosmetico ed estrazione zuccheri con conseguente produzione di biopolimero abbracciando i campi di packaging, edilizia, mobilità, trasporti, settore elettronico, sanitario, agricoltura, sport ed intrattenimento. A proposito di ciò, come emerso da un precedente studio, il carotenoide fucoxantina può essere estratto da *P. tricornutum* mediante utilizzo di NaDES (Natural Deep Extraction Solvent), solventi a basso impatto ambientale [77].

Da tutte queste considerazioni, la microalga *P. tricornutum* emerge come un ottimo candidato con notevoli potenzialità da porre al centro di un sistema di bioraffineria.

Inoltre, tramite il processo studiato, è consentito produrre biopolimeri utilizzando tecniche sostenibili ed evitando, allo stesso tempo, la competizione con la filiera alimentare.

Questa tesi si propone come un valido punto di partenza per uno studio più ampio che vede la microalga *P. tricornutum* come una notevole risorsa economica dal quale ottenere un ampio spettro di prodotti, tra cui sicuramente PHB, preservando la salute dell'ambiente e dell'uomo.

Lista degli acronimi

PHA	Poliidrossialcanoati
PHB	Poliidrossibutirrato
DoE	Design of Experiment
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PLA	Acido polilattico
PE	Polietilene
PET	Polietilene tereftalato
PA	Poliammide
PTT	Politrimetilentereftalato
PBS	Polibutilene succinato
PBAT	Polibutirrato
PCL	Policaprolattone
PP	Polipropilene
PVC	Polivinilcloruro
CBB	Calvin-Benson-Bassham
EPA	Acido eicosapentaenoico
PHPLC	Preparative High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Cromatografia Liquida-Spettrometria di Massa
NMR	Risonanza Magnetica Nucleare
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GC-MS	Gas-Cromatografia-Spettrometria di Massa
PLE	Pressurized Liquid Extraction
SFE	Supercritical Fluid Extraction
HTC	Hydro Thermal Carbonization
OFAT	One-Factor-At-a-Time
PES	Polieterosolfone
PDA	Photo Diode-Array
RFC	Relative Centrifugal Force
CDW	Cell Dry Weight
P(3HB)	Poli(3-idrossibutirrato)
P(3HV)	Poli(3-idrossivalerato)
P(3HH)	Poli(3-idrossiesanoato)
P(3HO)	Poli(3-idrossioctanoato)
P(3HD)	Poli(3-idrossidodecanoato)
P(4HB)	Poli(4-idrossibutirrato)
P(4HV)	Poli(4-idrossivalerato)
P(5HV)	Poli(5-idrossivalerato)
P(5HH)	Poli(5-idrossiesanoato)
P(5HD)	Poli(5-idrossidodecanoato)

Lista dei simboli

C_{iniziale}	Concentrazione biomassa al tempo zero [g/L]
C_{finale}	Concentrazione biomassa [g/L]
V_{iniziale}	Volume al tempo zero [mL]
V_{finale}	Volume al tempo finale [mL]
y	Area picco
x	Concentrazione [g/L]
x_0	Concentrazione al tempo zero [g/L]
μ	Tasso di crescita specifico [h^{-1}]
μ_{MAX}	Tasso massimo di crescita specifico [h^{-1}]
OD_{600}	Densità ottica con lunghezza d'onda=600 [nm]
t	Tempo [min]
λ	Lunghezza d'onda [nm]

Bibliografia

- [1] D. Yadav, V. Sahu, and A. Mathur, "A Review on Plastic Waste Management Using Life Cycle Assessment Approach," in *Lecture Notes in Civil Engineering*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2024, pp. 215–224. doi: 10.1007/978-981-99-4186-5_17.
- [2] E. E. PasticsEurope, "Plastica-I fatti del 2011," 2010.
- [3] Lars Fogh Mortensen et al, "Plastics, the circular economy and Europe's environment-A priority for action," 2021. doi: 10.2800/5847.
- [4] Liberi dalla Plastica, "Inquinamento da plastica."
- [5] V. Shanmugam et al., "Polymer Recycling in Additive Manufacturing: an Opportunity for the Circular Economy," *Materials Circular Economy*, vol. 2, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1007/s42824-020-00012-0.
- [6] M. L. Khan et al., "Effects of microplastics in freshwater fishes health and the implications for human health," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 84, 2024, doi: 10.1590/1519-6984.272524.
- [7] Plastics Europe AISBL, "Plasticsthefastfacts2023," 2023.
- [8] D. Pan, F. Su, C. Liu, and Z. Guo, "Research progress for plastic waste management and manufacture of value-added products," *Advanced Composites and Hybrid Materials*, vol. 3, pp. 443–461, 2020, doi: 10.1007/s42114-020-00190-0/Published.
- [9] OECD, "Towards Eliminating Plastic Pollution by 2040 A Policy Scenario Analysis," 2023. [Online]. Available: <http://www.oecd.org/termsandconditions>.
- [10] Michael Zhang, "Eye-Opening Photos Show How Plastic Waste is Polluting Our Planet."
- [11] "Wwf: non solo nei mari, c'è plastica anche nelle rocce, nella pioggia e nella neve," The Map Report.
- [12] N. A. Welden, "The environmental impacts of plastic pollution," in *Plastic Waste and Recycling: Environmental Impact, Societal Issues, Prevention, and Solutions*, Elsevier, 2020, pp. 195–222. doi: 10.1016/B978-0-12-817880-5.00008-6.
- [13] M. L. , H. H. U. , K. F. U. , G. R. A. , R. N. , B. M. , K. A. R. , U. S. , J. H. , N. K. , S. M. A. M. , A. T. Khan, "Effects of microplastics in freshwater fishes health and the implications for human health," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 84, 2024.
- [14] Parlamento europeo, "Microplastiche: origini, effetti e soluzioni," Nov. 2018.
- [15] B. XiaoZhi Lim, "MICROPLASTICS ARE EVERYWHERE-BUT ARE THEY HARMFUL? Microplastics collected from the Magothy River in," *Springer Nature Limited*, vol. 593, 2021.
- [16] A. Zeb et al., "Microplastic pollution in terrestrial ecosystems: Global implications and sustainable solutions," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 461. Elsevier B.V., Jan. 05, 2024. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.132636.

- [17] “Biobased plastic sustainable sourcing and content Environment Final Report,” 2022, doi: 10.2779/668096.
- [18] M. Kolybaba, L. G. Tabil, S. Panigrahi, W. J. Crerar, T. Powell, and B. Wang, “Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future,” 2003.
- [19] B. Colombo and G. Ricicla, “Le bioplastiche che nascono dai rifiuti: i progetti Cowboy, PHA Star e Rainbow,” 2018.
- [20] K. Sudesh and T. Iwata, “Sustainability of biobased and biodegradable plastics,” *Clean - Soil, Air, Water*, vol. 36, no. 5–6, pp. 433–442, 2008. doi: 10.1002/clen.200700183.
- [21] M. C. Lavagnolo, V. Poli, A. M. Zampini, and V. Grossule, “Biodegradability of bioplastics in different aquatic environments: A systematic review,” *Journal of Environmental Sciences (China)*, vol. 142. Chinese Academy of Sciences, pp. 169–181, Aug. 01, 2024. doi: 10.1016/j.jes.2023.06.013.
- [22] Y. Ming *et al.*, “Co-utilization of glucose and xylose for the production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02,” *Microb Cell Fact*, vol. 22, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/s12934-023-02159-2.
- [23] X. Liang, D. K. Cha, and Q. Xie, “Properties, production, and modification of polyhydroxyalkanoates,” *Resources, Conservation and Recycling Advances*, vol. 21. Elsevier Inc., May 01, 2024. doi: 10.1016/j.rcradv.2024.200206.
- [24] S. H. Kee, J. B. V. Chiongson, J. P. Saludes, S. Vigneswari, S. Ramakrishna, and K. Bhubalan, “Bioconversion of agro-industry sourced biowaste into biomaterials via microbial factories – A viable domain of circular economy,” *Environmental Pollution*, vol. 271. Elsevier Ltd, Feb. 15, 2021. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116311.
- [25] M. T. Cesário, R. S. Raposo, M. C. M. D. de Almeida, F. van Keulen, B. S. Ferreira, and M. M. R. da Fonseca, “Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates,” *N Biotechnol*, vol. 31, no. 1, pp. 104–113, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.nbt.2013.10.004.
- [26] L. E. A. Munoz and M. R. Riley, “Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (pha) bioplastics by *Saccharophagus degradans*,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 100, no. 5, pp. 882–888, Aug. 2008, doi: 10.1002/bit.21854.
- [27] S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, and I. Pernicova, “Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications,” *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 3. Elsevier Inc., pp. 856–870, May 01, 2018. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006.
- [28] B. McAdam, M. B. Fournet, P. McDonald, and M. Mojicevic, “Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics,” *Polymers*, vol. 12, no. 12. MDPI AG, pp. 1–20, Dec. 01, 2020. doi: 10.3390/polym12122908.
- [29] S. M. Lee *et al.*, “Finding of novel polyhydroxybutyrate producer *Loktanella* sp. SM43 capable of balanced utilization of glucose and xylose from lignocellulosic biomass,”

Int J Biol Macromol, vol. 208, pp. 809–818, May 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.155.

- [30] S. Bellini, T. Tommasi, and D. Fino, “Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Cupriavidus necator*: A review on waste substrates utilization for a circular economy approach,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 17. Elsevier Ltd, Feb. 01, 2022. doi: 10.1016/j.biteb.2022.100985.
- [31] W. Blunt *et al.*, “Biosynthesis and properties of polyhydroxyalkanoates synthesized from mixed C5 and C6 sugars obtained from hardwood hydrolysis,” *N Biotechnol*, vol. 77, pp. 40–49, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.nbt.2023.06.005.
- [32] European Commission, “Biobased plastic sustainable sourcing and content Environment Final Report,” 2022. doi: 10.2779/668096.
- [33] M. P. Sudhakar *et al.*, “Feasibility of bioplastic production using micro- and macroalgae- A review,” *Environmental Research*, vol. 240. Academic Press Inc., Jan. 01, 2024. doi: 10.1016/j.envres.2023.117465.
- [34] G. Kale, T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, S. E. Selke, and S. P. Singh, “Compostability of bioplastic packaging materials: An overview,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 7, no. 3. pp. 255–277, Mar. 08, 2007. doi: 10.1002/mabi.200600168.
- [35] BioPak Team, “COMMERCIAL COMPOSTING VS. HOME COMPOSTING: WHAT IS THE DIFFERENCE?”
- [36] J.-L. Bertrand, B. A. Ramsay, J. A. Ramsay, and C. Chavarie, “Biosynthesis of Poly-p-Hydroxyalkanoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*,” 1990. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aem>
- [37] W. Blunt *et al.*, “Biosynthesis and properties of polyhydroxyalkanoates synthesized from mixed C5 and C6 sugars obtained from hardwood hydrolysis,” *N Biotechnol*, vol. 77, pp. 40–49, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.nbt.2023.06.005.
- [38] L. Zhang, Z. Jiang, T. H. Tsui, K. C. Loh, Y. Dai, and Y. W. Tong, “A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10. Frontiers Media S.A., Jul. 19, 2022. doi: 10.3389/fbioe.2022.946085.
- [39] B. Dariš and Ž. Knez, “Poly(3-hydroxybutyrate): Promising biomaterial for bone tissue engineering,” *Acta Pharmaceutica*, vol. 70, no. 1, pp. 1–15, Mar. 2020, doi: 10.2478/acph-2020-0007.
- [40] E. Vlaeminck, E. Uitterhaegen, K. Quataert, T. Delmulle, K. De Winter, and W. K. Soetaert, “Industrial side streams as sustainable substrates for microbial production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB),” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 38, no. 12. Springer Science and Business Media B.V., Dec. 01, 2022. doi: 10.1007/s11274-022-03416-z.
- [41] J.-I. Choi and S. Y. Lee, “Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation.”
- [42] S. Bellini, F. Demichelis, T. Tommasi, L. Tarraran, and D. Fino, “Integrated biorefinery strategy for poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Cupriavidus necator* DSM 545

- using a sugar rich syrup from cereal waste and acetate from gas fermentation,” *J Environ Chem Eng*, vol. 12, no. 1, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.jece.2023.111661.
- [43] E. R. Oliveira-Filho, J. G. C. Gomez, M. K. Taciro, and L. F. Silva, “Burkholderia sacchari (synonym Paraburkholderia sacchari): An industrial and versatile bacterial chassis for sustainable biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and other bioproducts,” *Bioresource Technology*, vol. 337. Elsevier Ltd, Oct. 01, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125472.
- [44] D. Kucera *et al.*, “Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium Halomonas halophila,” *Bioresour Technol*, vol. 256, pp. 552–556, May 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.062.
- [45] R. Mitra, T. Xu, H. Xiang, and J. Han, “Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory,” *Microbial Cell Factories*, vol. 19, no. 1. BioMed Central Ltd., Apr. 07, 2020. doi: 10.1186/s12934-020-01342-z.
- [46] J. Quillaguamán, H. Guzmán, D. Van-Thuoc, and R. Hatti-Kaul, “Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 6. pp. 1687–1696, Feb. 2010. doi: 10.1007/s00253-009-2397-6.
- [47] X. Kourilova, I. Novackova, M. Koller, and S. Obruca, “Evaluation of mesophilic Burkholderia sacchari, thermophilic Schlegelella thermodepolymerans and halophilic Halomonas halophila for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates,” *Bioresour Technol*, vol. 325, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.124704.
- [48] T. Thomas *et al.*, “PHA production and pha synthases of the halophilic bacterium halomonas sp. SF2003,” *Bioengineering*, vol. 7, no. 1, Mar. 2020, doi: 10.3390/bioengineering7010029.
- [49] M. Branco-Vieira *et al.*, “Biotechnological potential of Phaeodactylum tricornutum for biorefinery processes,” *Fuel*, vol. 268, May 2020, doi: 10.1016/j.fuel.2020.117357.
- [50] A. H. S. K. , A. H. , and H. H. Kusmiyati Kusmiyati, “Hydrolysis of Microalgae Spirulina platensis, Chlorella,” *International Energy Journal* , vol. 20, pp. 611–620, 2020.
- [51] A. Agarwalla, J. Komandur, and K. Mohanty, “Current trends in the pretreatment of microalgal biomass for efficient and enhanced bioenergy production,” *Bioresource Technology*, vol. 369. Elsevier Ltd, Feb. 01, 2023. doi: 10.1016/j.biortech.2022.128330.
- [52] R. C. Anyanwu, C. Rodriguez, A. Durrant, and A. G. Olabi, “Micro-Macroalgae Properties and Applications,” in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, 2018. doi: 10.1016/b978-0-12-803581-8.09259-6.
- [53] X. B. Tan, M. K. Lam, Y. Uemura, J. W. Lim, C. Y. Wong, and K. T. Lee, “Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 26, no. 1. Chemical Industry Press, pp. 17–30, Jan. 01, 2018. doi: 10.1016/j.cjche.2017.08.010.

- [54] L. Blinová, A. Bartošová, and K. Gerulová, “ Cultivation Of Microalgae (Chlorella vulgaris) For Biodiesel Production ,” *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*, vol. 23, no. 36, pp. 87–95, Jun. 2015, doi: 10.1515/rput-2015-0010.
- [55] J. Velazquez-Lucio *et al.*, “Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review,” *Biofuel Research Journal*, vol. 5, no. 1. Green Wave Publishing of Canada, pp. 780–791, 2018. doi: 10.18331/BRJ2018.5.1.5.
- [56] S. Mandal and N. Mallick, “Microalgae: The Tiny Microbes with a Big Impact,” in *Bioenergy Research: Advances and Applications*, Elsevier Inc., 2014, pp. 171–184. doi: 10.1016/B978-0-444-59561-4.00011-5.
- [57] D. M. M. , C. E. , F. S. , P. F. Barbato F., “Sistemi per la produzione di microalghe da inserire a valle del processo di digestione anaerobica MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO,” 2014.
- [58] T. O. Butler, G. Padmaperuma, A. M. Lizzul, J. McDonald, and S. Vaidyanathan, “Towards a Phaeodactylum tricornutum biorefinery in an outdoor UK environment,” *Bioresour Technol*, vol. 344, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2021.126320.
- [59] Annette Hohe, “Bioreaktor quer2,” ReskiLab, University of Freiburg Ralf_Reski.
- [60] Manuel Giuliano, “FOTOGRAFIA – Presente e futuro non dimenticabile. WORLD PRESS PHOTO 2023.,” *Giornalista Indipendente*.
- [61] A. Rahman and C. D. Miller, “Microalgae as a Source of Bioplastics,” in *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, Elsevier, 2017, pp. 121–138. doi: 10.1016/B978-0-444-63784-0.00006-0.
- [62] C. Celi, D. Fino, and F. Savorani, “Phaeodactylum tricornutum as a source of value-added products: A review on recent developments in cultivation and extraction technologies,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 19. Elsevier Ltd, Sep. 01, 2022. doi: 10.1016/j.biteb.2022.101122.
- [63] A. Saxena, A. Tiwari, R. Kaushik, H. M. N. Iqbal, and R. Parra-Saldívar, “Diatoms recovery from wastewater: Overview from an ecological and economic perspective,” *Journal of Water Process Engineering*, vol. 39, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101705.
- [64] UCL-London’s Global University, “Diatoms.”
- [65] E. S. Karaman, Z. Wang, G. Di Benedetto, J. L. Zunino, X. Meng, and S. Mitra, “Fabrication of supercapacitors and flexible electrodes using biosilica from cultured diatoms,” *Mater Today Energy*, vol. 11, pp. 166–173, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.mtener.2018.11.004.
- [66] R. Zhang, N. Lebovka, L. Marchal, E. Vorobiev, and N. Grimi, “Multistage aqueous and non-aqueous extraction of bio-molecules from microalga Phaeodactylum tricornutum,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 62, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.ifset.2020.102367.
- [67] W. Zhang, F. Wang, B. Gao, L. Huang, and C. Zhang, “An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and

- chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricornutum* biomass,” *Algal Res*, vol. 32, pp. 193–200, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.04.002.
- [68] G. Seon, H. S. Kim, J. M. Cho, M. Kim, W. K. Park, and Y. K. Chang, “Effect of post-treatment process of microalgal hydrolysate on bioethanol production,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73816-4.
- [69] A. Jankovic, G. Chaudhary, and F. Goia, “Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems,” *Energy Build*, vol. 250, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.enbuild.2021.111298.
- [70] Z. Wahid and N. Nadir, “Improvement of one factor at a time through design of experiments,” *World Appl Sci J*, vol. 21, no. SPECIAL ISSUE1, pp. 56–61, 2013, doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.21.mae.99919.
- [71] C. Park *et al.*, “Enhancement of hydrolysis of *Chlorella vulgaris* by hydrochloric acid,” *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 39, no. 6, pp. 1015–1021, Jun. 2016, doi: 10.1007/s00449-016-1570-4.
- [72] M. R. Adams and M. O. Moss, *Food microbiology*. Royal Society of Chemistry, 2008.
- [73] Ghasem D. Najafpour, “Growth Kinetics 5.1 INTRODUCTION,” in *Biochemical Engineering and Biotechnology*, 2007, pp. 81–141.
- [74] M. M. B. de C. Domenico Gabriele, “Innovazione di processo nella produzione di melasse di fichi approccio reologico,” *παντα ρει*, pp. 3–16, 2006.
- [75] K. Dietrich, M. J. Dumont, V. Orsat, and L. F. Del Rio, “Consumption of sugars and inhibitors of softwood hemicellulose hydrolysates as carbon sources for polyhydroxybutyrate (PHB) production with *Paraburkholderia sacchari* IPT 101,” *Cellulose*, vol. 26, no. 13–14, pp. 7939–7952, Sep. 2019, doi: 10.1007/s10570-019-02664-x.
- [76] M. Li and M. R. Wilkins, “Fed-batch polyhydroxybutyrate production by *Paraburkholderia sacchari* from a ternary mixture of glucose, xylose and arabinose,” *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 44, no. 1, pp. 185–193, Jan. 2021, doi: 10.1007/s00449-020-02434-1.
- [77] C. C. S. D. L. Debora Fino, “Studio di crescita di *Phaeodactylum tricornutum* ed estrazione di fucoxantina usando tecniche sostenibili,” 2023.