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

Bioconversione del CO in PHA nella fermentazione anaerobica in pressione di *Rhodospirillum rubrum*

Relatrice
Prof.ssa Debora Fino

Candidato
Mattia Angelo Perrone

Correlatrice
Ing. Tonia Tommasi

Luglio 2018

Indice

Capitolo 1: La crescita microbica 1
1.1 La curva di crescita microbica 1
1.2 Effetto della temperatura 4
1.3 Effetto del pH 5
1.4 Effetto dell'ossigeno e/o del potenziale redox 6
1.5 Effetto dell'attività dell'acqua 8
1.6 Effetto dei nutrienti 10
Capitolo 2: I poliidrossialcanoati (PHA) 13
2.1 Introduzione 13
2.2 Cenni storici 14
2.3 Struttura e proprietà 15
2.4 Biosintesi 17
2.5 Biodegradabilità 17
2.6 Applicazioni 18
Capitolo 3: La fermentazione di *syngas* 21
3.1 Introduzione 21
3.2 Gassificazione di biomasse 22
3.3 Materie prime per la gassificazione 23
3.4 La biocatalisi 25
3.5 La reazione di *WGS* (*water-gas shift*) nei microrganismi 25
3.6 Effetti delle condizioni di processo 27
3.6.1 Composizione del *medium* 27
3.6.2 Pressione parziale dei substrati 28
3.6.3 Impurità nel *syngas* 28
3.7 Limitazione sul trasferimento di materia 30
Capitolo 4: *Rhodospirillum rubrum* 35
4.1 Introduzione 35
4.2 I primi studi 35
4.3 La crescita su CO e la *syngas fermentation* 37
Capitolo 5: Materiali e metodi 41
5.1 Introduzione 41
5.2 Materiali 41

5.2.1 Terreno di coltura ATCC 11170: ricetta per 1 L di soluzione 41
5.2.2 Terreno di coltura *SYN MEDIUM*: ricetta per 1 L di soluzione 41
5.2.3 Reagenti da inserire in bottiglia per la preparazione dei campioni 42
5.2.4 Stock di reagenti 42
5.3 Metodi 43
5.3.1 Degassamento e sterilizzazione 43
5.3.2 Preparazione colture 44
5.3.3 Isolamento su terreno solido 46
5.3.4 Curve di crescita microbica 47
5.3.5 Calcolo dei parametri di crescita 48
5.3.6 Analisi del gas di testa al gascromatografo 48
5.3.7 Misura della pressione nei campioni 49
5.3.8 Misura del volume di gas prodotto in modalità *fed-batch* 50
5.3.9 Quantificazione PHB 50
5.3.10 Estrazione PHB 51
5.3.11 Analisi del terreno di coltura 52
5.3.12 Rette di taratura 53
5.3.12.1 Area picco HPLC - Concentrazione PHB 53
5.3.12.2 Area picco HPLC - Concentrazione acetato di sodio 54
5.3.12.2 OD_{660} - peso secco per *Rhodospirillum rubrum* 55
Capitolo 6: Preadattamento di *Rhodospirillum rubrum* 57
6.1 Introduzione 57
6.2 Analisi della densità ottica 57
6.3 Analisi del gas di testa al gascromatografo 66
6.4 Quantificazione del contenuto di PHB 66
6.5 Selezione parametri operativi 67
Capitolo 7: Fermentazione in modalità *fed-batch* 69
7.1 Introduzione 69
7.2 Analisi della densità ottica 69
7.3 Analisi del gas di testa al gascromatografo 71
7.4 Analisi del terreno di coltura 74
7.5 Cinetica di produzione e estrazione PHB 75
7.6 Confronto fra *batch e fed-batch* 77
Conclusioni e sviluppi futuri 81
Bibliografia 83

Indice delle figure

1.1 Curva di crescita microbica 3
1.2 Effetto della temperatura sulla velocità di crescita, con riferimento alle temperature cardinali 5
1.3 Modello di Monod 10
1.4 Modello di Andrews 11
2.1 Unità monomerica di PHA 15
5.1 Stazione di degassaggio 43
5.2 Autoclave da laboratorio 44
5.3 Stazione di rifornimento gas 45
5.4 Bottiglie contenenti terreno sterile (sinistra) e coltura microbica (destra) 45
5.5 Incubatore da laboratorio 46
5.6 Rilevatore portatile di concentrazione di gas con allarme acustico (sinistra) e maschera a pieno facciale con filtro (destra) 46
5.7 Isolamento su terreno solido con piastra di Petri 47
5.8 Spettrofotometro UV-visibile 47
5.9 Pompa a vuoto. Capo lungo di aspirazione, capo corto di mandata 49
5.10 Sistema per la misura della pressione 49
5.11 Sistema per la misura del volume di liquido spostato dal gas in pressione 50
5.12 Centrifuga da laboratorio 51
5.13 Particolare della procedura per la quantificazione del PHB 51
5.14 Separazione di fase dopo la reazione con cloroformio e successiva centrifuga: fase acquosa (in alto), membrane cellulari (nel mezzo), fase organica (in basso) 52
5.15 pH-metro 53
5.16 Retta di taratura area picco HPLC - Concentrazione PHB 54
5.17 Retta di taratura area picco HPLC - Concentrazione acetato di sodio 55
5.18 Retta di taratura OD_{660} - Peso secco 56
6.1 Curva di crescita coltura adattata al 30% di CO 59
6.2 Curva di crescita linearizzara coltura adattata al 30% di CO 59
6.3 Densità ottiche massime per la coltura adattata al 30% di CO 60
6.4 Curva di crescita coltura adattata al 40% di CO 60
6.5 Curva di crescita linearizzara coltura adattata al 40% di CO 61
6.6 Densità ottiche massime per la coltura adattata al 40% di CO 61
6.7 Curva di crescita coltura adattata al 50% di CO 62

6.8 Curva di crescita linearizzara coltura adattata al 50% di CO 62
6.9 Densità ottiche massime per la coltura adattata al 50% di CO 63
6.10 Velocità massime di crescita per la coltura adattata al 30% di CO 64
6.11 Velocità massime di crescita per la coltura adattata al 40% di CO 64
6.12 Velocità massime di crescita per la coltura adattata al 50% di CO 65
6.13 Confronto migliori risultati OD_{660} 67
6.14 Confronto migliori risultati velocità massima di crescita 68
7.1 Curva di crescita fermentazione *fed-batch* al 50% di CO 70
7.2 Curva di crescita linearizzara fermentazione *fed-batch* al 50% di CO 70
7.3 Variazione del pH durante la fermentazione 74
7.4 Conversione di acetato di sodio durante la fermentazione 75
7.5 Cinetica di produzione di PHB 76
7.6 Confronto fra curve di crescita. Atmosfera al 50% di CO 78
7.7 Confronto fra curve di crescita linearizzate. Atmosfera al 50% di CO 78

Indice delle tabelle

1.1 Intervalli di temperature cardinali e classificazione dei microrganismi 4
1.2 Intervalli di pH e classificazione dei microrganismi 6
1.3 Intervalli di potenziale redox e classificazione dei microrganismi 8
2.1 Influenza del substrato sul processo produttivo 14
2.2 Paragone fra differenti tipologie di PHA e polipropilene 16
2.3 Confronto fra proprietà meccaniche di differenti polimeri 16
2.4 Microrganismi responsabili della degradazione dei PHA in differenti ambienti 18
3.1 Confronto fra K_La di diffenti configurazioni reattoristiche 32
4.1 Termini di paragone in letteratura 39
5.1 Composizione terreno di coltura ATCC 11170 41
5.2 Composizione terreno di coltura *SYN MEDIUM* 41
5.3 Quantità di reagenti da inserire in bottiglia 42
5.4 Composizione della soluzione *"iron chelated molybdenum solution"* (pH 7,1) 42
5.5 Composizione della soluzione *buffer* fosfato (1,91 M, pH 7,0) 43
5.6 Valori utilizzati per la retta di taratura area picco HPLC - Concentrazione PHB 53
5.7 Valori utilizzati per la retta di taratura area picco HPLC - Concentrazione acetato di sodio 54
5.8 Valori di OD_{660} utilizzati per la retta di taratura OD_{660} - peso secco 55
5.9 Valori di peso secco utilizzati per la retta di taratura OD_{660} - peso secco 56
6.1 Termini di paragone in letteratura 58
6.2 Parametri di crescita coltura adattata al 30% di CO 65
6.3 Parametri di crescita coltura adattata al 40% di CO 65
6.4 Parametri di crescita coltura adattata al 50% di CO 65
6.5 Rapporti molari fra i componenti chiave al termine della fermentazione 66
7.1 Parametri di crescita fermentazione fed-batch al 50% di CO 70
7.2 Pressione media del sistema durante la fermentazione 72
7.3 Produttività dopo 24 h 72
7.4 Produttività dopo 48 h 72
7.5 Produttività dopo 72 h 72
7.6 Produttività dopo 96 h 72
7.7 Produttività dopo 120 h 73
7.8 Conversione di CO durante la fermentazione 73

7.9 Rapporti molari fra i componenti chiave durante la fermentazione 73
7.10 Stima della produzione giornaliera di gas durante la fermentazione 73
7.11 Termini di paragone in letteratura 77
7.12 Confronto fra parametri di crescita. Atmosfera al 50% di CO 79
7.13 Confronto fra le conversioni di CO 79
7.14 Confronto fra percentuali molari del gas di testa nelle due configurazioni dopo 96 h di fermentazione 79
7.15 Confronto fra i rapporti molari dei componenti chiave dopo 96 h di fermentazione 79

Elenco dei simboli

X	Concentrazione di microrganismi
X_0	Concentrazione di microrganismi a t_0
$\frac{dX}{dt}$	Tasso di variazione della biomassa
t	Tempo
t_0	Tempo iniziale
K	Concentrazione microbica in fase stazionaria
pK_a	Costante di dissociazione acida
Eh	Potenziale redox
a_w	Attività dell'acqua
P	Tensione di vapore della soluzione
P_0	Tensione di vapore dell'acqua pura
N_w	Numero di moli di acqua in soluzione
N_s	Numero di moli totali in soluzione
S	Concentrazione substrato limitante
K_S	Costante di saturazione
K_i	Costante di inibizione
Q_S	Portata di gas trasferita in fase liquida
K_La	Coefficiente volumetrico di trasferimento di materia
H	Costante di Henry
P_S^G	Pressione del substrato in fase gassosa
P_S^L	Pressione del substrato in fase liquida
$\frac{dN_S}{dt}$	Tasso di variazione molare del substrato in fase liquida
V_L	Volume di liquido
q_S	Velocità specifica di consumo del substrato
q_S^{MAX}	Velocità specifica massima di consumo del substrato
I	Intensità luminosa
ox	Composto in forma ossidata
red	Composto in forma ridotta
V_i	Volume iniziale

V_f	Volume finale
C_i	Concentrazione iniziale
C_f	Concentrazione finale
OD_{660}	Densità ottica registrata ad una lunghezza d'onda di 660 nm
OD_0	Densità ottica iniziale
OD_{660}^{MAX}	Densità ottica massima a 660 nm
g	Tempo di generazione
n	Numero di generazioni
k	Costante della velocità di crescita
μ	Velocità di crescita
μ^{MAX}	Velocità di crescita massima
$\Delta\%$	Variazione percentuale
Y_{PHB}	Resa di estrazione PHB

Introduzione

Negli ultimi anni sempre più attenzione viene prestata al problema incalzante della gestione dei rifiuti di natura antropica. La crescita della popolazione mondiale comporta un enorme aumento della produzione di scarti, di origine sia urbana che industriale, che ovviamente devono essere smaltiti. Il problema maggiore riguarda le plastiche di origine petrolchimica, che a causa della propria natura, se riversate nell'ambiente si rivelano altamente inquinanti. Se dovessero essere smaltite (ad esempio tramite incenerimento) potrebbero rilasciare sostanze nocive per l'ambiente e per l'uomo. Analogamente ciò accadrebbe se venissero poste in discarica poiché, essendo in contatto con il suolo, potrebbero inquinare persino le falde acquifere. Inoltre, essendo fortemente resistenti alla biodegradazione, si riverserebbero nell'ambiente permanendo per un lungo periodo di tempo. Oltre a ciò c'è anche da considerare che, prima o poi, le riserve mondiali di fonti fossili sono destinate a terminare.

Quindi in questa ottica è molto importante riuscire ad offrire una soluzione alternativa che possa soddisfare nello stesso momento differenti necessità. Prima fra tutte quella di trovare dei sostituti competitivi delle plastiche di origine petrolchimica, in maniera tale da riuscire ad allontanarsi gradualmente dalle fonti fossili. Inoltre questi materiali dovranno rispettare il criterio della biodegradabilità, in modo da non rappresentare un pericolo per l'ambiente. In questa ottica si inserisce la produzione di plastiche di origine biologica (PHA), sfruttando la capacità di alcuni microrganismi di accumulare sacche citoplasmatiche di biopolimero in condizioni di eccesso di fonte di carbonio e limitazione di un nutriente chiave (azoto, fosforo). La seconda necessità è quella di riuscire a controllare la produzione e/o lo smaltimento dei rifiuti. A questo proposito viene proposta la gassificazione degli scarti con produzione di *syngas*, che altro non è che una miscela gassosa composta in gran parte da N_2, H_2, CO_2 e CO. Il *syngas* può essere prodotto anche tramite la gassificazione di biomasse, sfruttando ad esempio gli scarti delle lavorazioni agricole ed industriali. Inoltre anche la produzione di H_2 intercetta la necessità di trovare una fonte alternativa di combustibili che siano quanto più sostenibili possibile, rientrando nell'ottica dell'abbandono delle fonti fossili e della diminuzione della produzione di inquinanti. Infatti la combustione di H_2 si traduce nella produzione di H_2O e CO_2.

La soluzione che viene proposta in questo lavoro riguarda la fermentazione di *syngas* con *Rhodospirillum rubrum* per la produzione di PHB, con contemporaneo arricchimento della corrente gassosa in H_2. Infatti il microrganismo selezionato è capace di utilizzare il CO come fonte di carbonio e di energia, differentemente da altre specie microbiche per le quali tale substrato è inibitorio, se non addirittura nocivo. Inoltre *Rhodospirillum rubrum* è capace di accumulare PHB all'interno di sacche citoplasmatiche durante la propria crescita, che rivestono il compito di riserve intracellulari di carbonio ed energia. Infine il microrganismo è capace di effettuare la reazione di *water-gas shift*, tramite un complesso sistema enzimatico, metabolizzando il CO presente nell'ambiente di crescita e producendo contemporaneamente H_2.

I primi studi incentrati sul microrganismo in questione hanno riguardato la capacità di *Rhodospirillum rubrum* di crescere su differenti substrati in differenti condizioni (Uffen, 1973, Schultz and Weaver, 1982, Kerby et al., 1995). La capacità di *Rhodospirillum rubrum* di produrre PHA è conosciuta da tempo. Infatti già a partire dagli anni '80 e '90 si è valutata l'influenza sulla produzione di biopolimero sia del tipo di substrato utilizzato (Brandl et al., 1989) che del pH (Hashimoto et al., 1993). Inoltre si sono susseguiti differenti studi sulla capacità di *Rhodospirillum rubrum* di crescere su *syngas* sia per la produzione di H_2 (Najafpour et al., 2004) che per la produzione di PHA (Do et al., 2007, Heinrich et al., 2015,

Heinrich et al., 2016, Karmann et al., 2017). Infine questo lavoro di tesi prende spunto da uno studio riguardante la fermentazione di *syngas* per la produzione di PHA con il microrganismo selezionato (Revelles et al., 2016).

Il lavoro qui presentato si suddivide in 7 capitoli.

Nel primo capitolo si parla di crescita microbica, analizzando i modelli che la rappresentano e degli effetti che i parametri chimico-fisici del sistema hanno sul processo di crescita di una popolazione.

Il secondo capitolo si occupa di illustrare una panoramica generale sui PHA, dalla loro scoperta fino ai campi di applicazione, passando per l'analisi della struttura e della proprietà dei biopolimeri.

Nel terzo capitolo di tratta la fermentazione di *syngas*, analizzando dapprima il processo di gassificazione e le materie prime utilizzate nel processo. In seguito si analizzano le problematiche da affrontare affinché tale processo divenga una realtà implementabile a livello industriale. In particolare si affronta il problema dell'influenza delle condizioni di processo e della limitazione al *mass-transfer*.

Il quarto capitolo affronta l'analisi della letteratura riguardante il microrganismo in questione, dai primi studi effettuati fino al tempo presente, cercando di evidenziarne le peculiarità metaboliche.

Nel quinto capitolo si elencano i vari materiali e metodi utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Il sesto capitolo affronta la fase di preadattamento di *Rhodospirillum rubrum* e ne presenta i risultati.

Infine il settimo capitolo riguarda la fermentazione in modalità *fed-batch* e i relativi risultati.

Capitolo 1
La crescita microbica

1.1 La curva di crescita microbica

Ponendo una piccola quantità di microrganismi in un ambiente ricco di substrato, si osserva la produzione di nuovo materiale cellulare, a cui segue un aumento della popolazione microbica: tale fenomeno viene definito crescita microbica. La crescita microbica è un fenomeno autocatalitico, che in quanto tale si autosostiene e che non avverrebbe se non fosse presente almeno una cellula microbica vitale nel terreno di coltura. Inoltre, una caratteristica fondamentale di questo fenomeno, è il fatto che il tasso di crescita microbica aumenta all'aumentare della biomassa presente. Matematicamente ciò può essere rappresentato dalla seguente equazione (Adams and Moss, 2008):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \,. \tag{1.1}$$

Dove dX/dt è il tasso di variazione della biomassa, X è la concentrazione di microrganismi e μ è la velocità specifica di crescita. Integrando la (1.1) e riarrangiandola in forma logaritmica, si ottiene quindi:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \,. \tag{1.2}$$

Dove X_0 è la concentrazione di biomassa al tempo zero. Si può ricavare quello che viene denominato tempo di generazione o duplicazione, sostituendo nella (1.2) $X = 2X_0$:

$$\tau = \frac{ln2}{\mu} = \frac{0{,}693}{\mu}. \tag{1.3}$$

La crescita microbica può essere supervisionata attraverso il conteggio del numero di cellule, tramite la valutazione delle *CFU* (*colony forming unit*) oppure mediante la misura della densità ottica ad una certa lunghezza d'onda (Ray, 2004). Ripetendo questa valutazione ad intervalli di tempo regolari, si può quindi tracciare un grafico, denominato "curva di crescita microbica", che è espressione dell'andamento temporale della coltura. In una curva di crescita microbica, generalmente si possono distinguere 5 fasi (Fig. 1.1):

1) Fase di latenza (*lag*): rappresenta un periodo di adattamento, ovvero il tempo necessario al microrganismo per ambientarsi al nuovo terreno di coltura. Durante tale fase si sintetizzano gli enzimi necessari alla metabolizzazione dei substrati disponibili nell'ambiente di crescita ed eventualmente riparando danni cellulari precedentemente

subiti. Quindi, nel corso di questa fase non si osserva una variazione significativa della popolazione cellulare, anche se i microrganismi assimilano nutrienti ed aumentano le proprie dimensioni, portando ad un aumento della misura della densità ottica. La durata di questa fase dipende dalle condizioni ambientali e può essere ridotta, fino ad essere azzerata, utilizzando un inoculo in fase di crescita esponenziale prelevato da una coltura che utilizza lo stesso tipo di substrato per la crescita;

2) Fase di crescita esponenziale (logaritmica): durante questa fase i microrganismi, trovandosi in eccesso di substrato, possono riprodursi ad un tempo di generazione (o tempo di raddoppio) costante e tipico di ogni specie microbica. La velocità di crescita della biomassa dipende solo dalla concentrazione dei microrganismi e segue una cinetica del primo ordine, come indicato nell'equazione (1.1). In base ad altri fattori, come ad esempio la concentrazione iniziale di nutrienti o l'affinità del microrganismo verso un determinato tipo di substrato, tale fase può essere caratterizzata da una differente durata. Una volta terminata la fase esponenziale, si può considerare conclusa la trofofase (fase correlata al metabolismo primario) e iniziata la idiofase (fase relativa al metabolismo secondario);
3) Fase di crescita rallentata: rappresenta il momento in cui uno dei substrati necessari allo sviluppo microbico comincia ad essere limitante, oppure in cui l'accumulo di eventuali metaboliti inibenti la crescita diventa rilevante. Durante questa fase, l'equazione di Monod correla la velocità di crescita microbica alla concentrazione del substrato limitante nel terreno di coltura;
4) Fase stazionaria: è la fase in cui la popolazione microbica arresta la propria crescita, restando costante poiché la velocità di crescita è nulla. Ciò accade perché i microrganismi indirizzano l'energia proveniente dal substrato restante nel terreno di coltura verso il proprio metabolismo basale. Inoltre si osserva che la riproduzione e la morte cellulare sono perfettamente bilanciate;
5) Fase di declino (morte): in questo periodo si osserva che la concentrazione di microrganismi diminuisce in quanto la velocità di morte supera la velocità di riproduzione cellulare (velocità di crescita negativa). Le cellule morte vanno poi incontro a lisi.

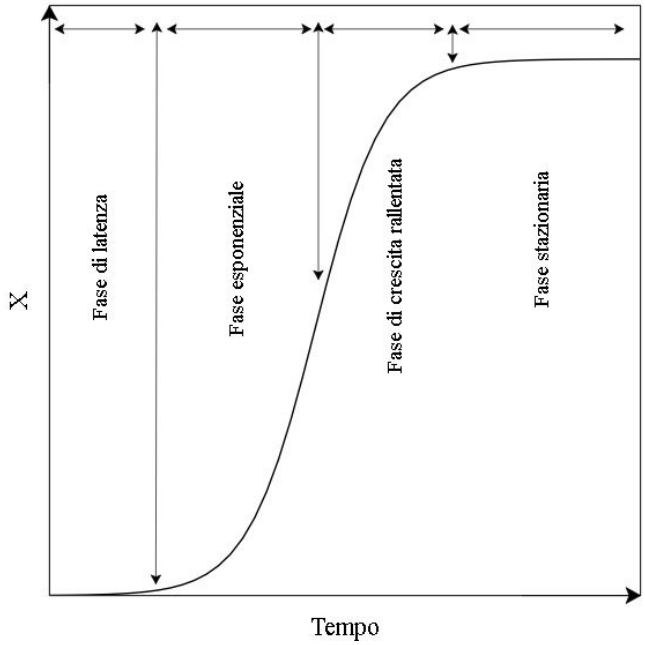

Figura 1.1: Curva di crescita microbica.

L'intero processo può essere descritto matematicamente modificando la (1.1) in maniera tale che la velocità di crescita diminuisca all'aumentare della densità cellulare. Una buona approssimazione del processo è la equazione logistica (Adams and Moss, 2008):

$$\frac{dX}{dt} = \left(\mu_{MAX} - \frac{\mu_{MAX} X}{K}\right) X \,. \tag{1.4}$$

Dove K è il valore di concentrazione cellulare in fase stazionaria e μ_{MAX} la massima velocità specifica di crescita. Tanto più X cresce e si avvicina a K, tanto più la velocità di crescita tende a zero. Integrando la (1.4), si ottiene:

$$X = \frac{Kc}{c + e^{-\mu_{MAX} t}} \,. \tag{1.5}$$

Con $c = X_0/(K - X_0)$.

L'analisi della crescita microbica non può prescindere dal tenere conto dell'influenza dei fattori ambientali sullo sviluppo della popolazione microbica, oltre che dell'interazione della stessa con l'ambiente di crescita. Infatti durante tutta la durata del fenomeno, i microrganismi interagiscono attivamente con il sistema, modificandolo tramite il proprio metabolismo. Per questo motivo, avendo a che fare con sistemi biologici, la necessità di fare in modo che il microrganismo si trovi sempre nelle condizioni ottimali di crescita e/o produzione assume una importanza fondamentale. Tutto ciò per poter avere un ambiente di reazione indirizzato verso la massima produttività e che sia in grado, quindi, di evitare lo spreco di reagenti e la comparsa di sottoprodotti e/o prodotti indesiderati. Di conseguenza è indispensabile

conoscere l'influenza dei parametri chimico-fisici sulla crescita microbica. Generalmente i fattori che influenzano maggiormente lo sviluppo microbico sono:

1) Temperatura;
2) pH;
3) Ossigeno e/o potenziale redox;
4) Attività dell'acqua;
5) Nutrienti.

1.2 Effetto della temperatura

La temperatura influenza fortemente l'attività enzimatica e quindi ha un effetto diretto sulla crescita di un microrganismo. Lo sviluppo microbico può avvenire in un range molto ampio di temperatura, che si estende dai -8°C sino a superare i 100°C. Nessun microrganismo è però capace di riprodursi in un intervallo di temperatura tanto esteso: generalmente lo sviluppo di un microrganismo avviene in un range di 30-35°C (Adams and Moss, 2008). Inoltre all'interno di questo intervallo è possibile riconoscere tre temperature denominate cardinali (Fig. 1.2), tipiche per ogni microrganismo, ma non assolute, in quanto possono essere modificate da altri fattori ambientali (disponibilità di nutrienti, pH, attività dell'acqua). Esse sono:

1) Temperatura minima, al di sotto della quale non si verifica crescita microbica poiché avviene il fenomeno del *membrane gelling*: esso consiste in una drastica diminuzione della fluidità delle membrane cellulari e quindi di conseguenza del passaggio di nutrienti attraverso di esse. Inoltre le basse temperature riducono sia la cinetica enzimatica sia l'attività dell'acqua, a causa di un possibile congelamento;
2) Temperatura ottimale, dove si ha la massima velocità di crescita poiché le reazioni enzimatiche avvengono al massimo *rate* possibile. Inoltre la temperatura ottimale è sempre più vicina alla massima che alla minima;
3) Temperatura massima, oltre la quale si ha la morte cellulare in quanto si osservano fenomeni di denaturazione delle macromolecole (riduzione della stabilità dei ribosomi, denaturazione delle proteine, collasso della membrana citoplasmatica, lisi termica).

In base alle temperature cardinali, i microrganismi possono essere classificati in differenti gruppi. Poiché esse non sono fisse, è più appropriato definire degli intervalli, piuttosto che dei singoli valori. I gruppi di microrganismi e i relativi intervalli sono indicati in tabella 1.1:

Tabella 1.1: Intervalli di temperature cardinali e classificazione dei microrganismi (Adams and Moss, 2008).

Denominazione	Minima, °C	Ottimale, °C	Massima, °C
Psicrofili	-5/+5	12-15	15-20
Psicrotropi	-5/+5	25-30	30-35
Mesofili	5-10	30-40	40-47
Termofili	40-45	55-75	60-90

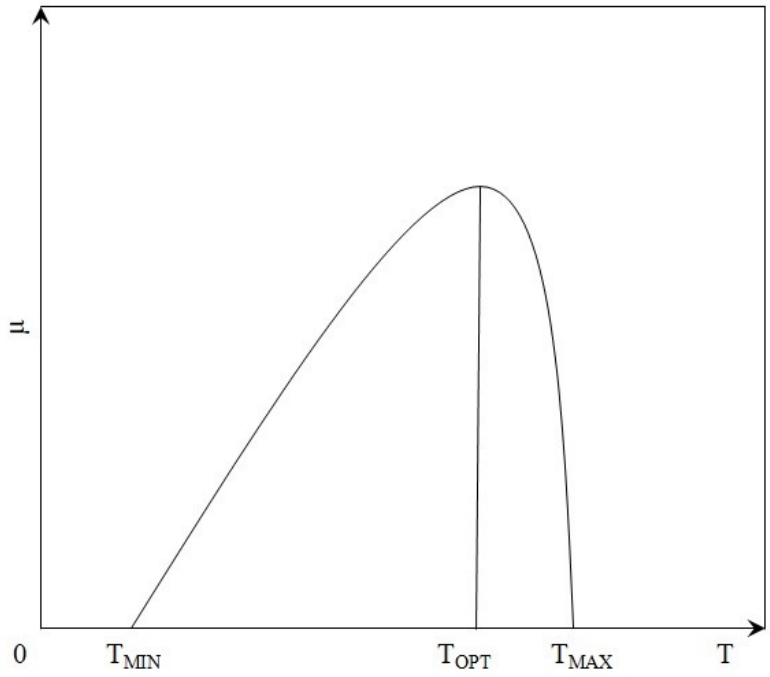

Figura 1.2: Effetto della temperatura sulla velocità di crescita, con riferimento alle temperature cardinali.

La temperatura, oltre ad influenzare la velocità di crescita, ha un effetto sulla velocità di sintesi e di conseguenza anche sulla formazione di un eventuale prodotto di interesse. Tale effetto è confermato anche dal fatto che i valori di temperatura ottimale di crescita e sintesi del prodotto desiderato siano quasi sempre differenti. Inoltre aumentando la temperatura, si potrebbe giungere ad una situazione in cui la velocità di reazione sia tanto elevata da portare il sistema in una condizione di diffusione limitante, dove la velocità di utilizzo del substrato è molto più elevata di quella di rifornimento dello stesso. Infine anche i coefficienti di resa del prodotto sono direttamente influenzati dalla temperatura, in quanto discostarsi, generalmente superando, la temperatura ottimale, porta ad un aumento della energia necessaria al mantenimento del metabolismo basale, sottraendo quindi energia utile alla biosintesi.

1.3 Effetto del pH

Analogamente alla temperatura, anche il pH ha un effetto sulla velocità di crescita microbica: infatti il pH influenza la struttura proteica e quindi l'attività enzimatica: di conseguenza si ha un effetto diretto sulla crescita microbica (Adams and Moss, 2008). Per ogni microrganismo è possibile definire un intervallo di pH all'interno del quale è capace di crescere. In particolar modo, all'interno dello stesso intervallo, si può individuare un pH ottimale di crescita. Anche in questo caso, il discostarsi dal valore ottimale di pH causa un aumento dell'energia di mantenimento che porta ad una minore velocità di biosintesi e/o crescita. La maggior parte degli ambienti naturali ha un valore di pH compreso tra 5 e 9 e, conseguentemente, i microrganismi con un pH ottimale compreso in questo intervallo sono i più comuni. Le categorie di microrganismi, classificati secondo i *range* di pH in cui si ha crescita microbica, sono indicati in tabella 1.2.

Tabella 1.2: Intervalli di pH e classificazione dei microrganismi.

Denominazione	pH
Acidofili	1-5
Neutrofili	5-9
Alcalofili	8-12

È stato osservato che la diminuzione della velocità di crescita microbica, non dipende solo dall'abbassamento del pH oltre il limite inferiore, ma anche dal tipo di acido utilizzato. Infatti, nonostante un acido forte abbia una capacità maggiore di abbassare il pH, un effetto più importante si osserva utilizzando acidi deboli lipofilici, specialmente se caratterizzati da una costante di dissociazione acida (pK_a) abbastanza elevata. Ciò accade perché le molecole lipofiliche non dissociate, a differenza di protoni e altre molecole cariche, possono liberamente attraversare la membrana cellulare. In questo modo si trovano a passare da un ambiente esterno, a pH acido, all'interno del citoplasma dove trovano un pH maggiore. Così facendo la dissociazione dell'acido viene favorita, con un conseguente rilascio di protoni, che si traduce in una acidificazione dell'ambiente citoplasmatico. Il gradiente protonico trans-membrana, utilizzato come fonte di energia per la biosintesi, tende ad annullarsi (Ray, 2004). La cellula, nel tentativo di ristabilire il proprio equilibrio interno, cerca di espellere e/o neutralizzare l'eccesso di protoni. Tutto ciò comporta una sottrazione di energia ai processi biosintetici e quindi un rallentamento della crescita microbica. A volte, specialmente in presenza di bassi valori di pH e grandi quantità di acido, l'entità del fenomeno è tanto importante da fare in modo che la cellula smetta di crescere o addirittura muoia (Adams and Moss, 2008).

Esiste anche una correlazione generale tra l'effetto del pH e quello della temperatura: infatti ad un aumento della temperatura di crescita corrisponde un aumento del valore del pH ottimale. Infine, durante il processo, si hanno delle variazioni di pH dovute all'attività del microrganismo che, con il proprio metabolismo, altera le proprietà del *medium* di coltura: è necessario, quindi uno stretto controllo del pH durante il processo, in maniera tale che non si discosti in maniera significativa dal suo valore ottimale per la crescita.

1.4 Effetto dell'ossigeno e/o del potenziale redox

I microrganismi hanno diverse esigenze e/o tolleranze nei confronti dell'ossigeno e perciò, in base ad esse, possono essere distinti in:

1) Aerobi obbligati;
2) Anaerobi obbligati;
3) Anaerobi facoltativi;
4) Microaerofili.

Gli aerobi obbligati necessitano di ossigeno per la propria crescita, in quanto l'ossigeno viene utilizzato come accettore finale di elettroni nella respirazione aerobica. Invece gli anaerobi facoltativi possono produrre energia tramite la respirazione aerobica in presenza di ossigeno atmosferica, oppure possono utilizzare l'ossigeno presente in altri composti (nitrati, solfati) nella respirazione anaerobica. Nel caso in cui l'ossigeno non sia affatto disponibile, gli anaerobi facoltativi intraprendono il cammino della fermentazione anaerobica, utilizzando

altri composti come accettori finali di elettroni. Un esempio è il trasferimento di idrogeno da $NADH_2$ a piruvato con la produzione di lattato (Ray, 2004). Gli anaerobi obbligati non possono assolutamente crescere in presenza di ossigeno atmosferico poiché sono deficitari di enzimi specifici (catalasi, superossido dismutasi) dediti alla neutralizzazione dei radicali liberi dell'ossigeno, che per questo sono caratterizzati da una elevata tossicità. Infine i microaerofili crescono in presenza di quantità di ossigeno inferiori a quella atmosferica (Ray, 2004).

Nei processi in cui si impiegano microrganismi aerobi, l'ossigeno rappresenta un vero e proprio substrato, che però risulta essere limitante: infatti a concentrazioni cellulari elevate la velocità di utilizzo supera la velocità di trasferimento nel brodo di coltura. Ciò accade perché, durante il trasferimento dell'ossigeno dalla fase gassosa fino al sito di utilizzo cellulare, devono essere vinte delle resistenze che ostacolano il fenomeno. Esse dipendono da numerosi fattori (natura delle fasi liquida e gassosa, proprietà chimico-fisiche del *medium*, concentrazione e attività della biomassa, turbolenza e/o agitazione del sistema) e sono:

1) Diffusione dell'ossigeno all'interno della bolla sino all'interfaccia gas-liquido;
2) Passaggio in fase liquida;
3) Diffusione attraverso il film di liquido stagnante attorno alla bolla;
4) Diffusione nel *medium* di coltura;
5) Diffusione attraverso il film di liquido stagnante attorno alla biomassa;
6) Passaggio all'interno dell'aggregato cellulare;
7) Diffusione all'interno dell'aggregato cellulare;
8) Passaggio all'interno della singola cellula attraverso la membrana cellulare;
9) Raggiungimento del sito di utilizzo all'interno della cellula.

Ovviamente un discorso analogo si affronta ogni qualvolta si abbia a che fare con un qualsiasi substrato gassoso che sia differente dall'ossigeno.

La velocità di crescita in funzione della concentrazione di ossigeno segue una cinetica di tipo saturativo: al di sotto della concentrazione di saturazione, il fenomeno ha una cinetica del primo ordine, mentre al di sopra della stessa, una cinetica ordine zero, quindi indipendente dalla quantità di substrato presente.

Inoltre è risaputo come la crescita dei microrganismi sia fortemente dipendente anche dal potenziale redox, il quale in primo luogo viene determinato dalla presenza di ossigeno nell'ambiente di crescita. Nel *medium* di coltura, numerosi fattori (pH, rapporto fra specie ossidanti e riducenti, coppie redox presenti, disponibilità di ossigeno) determinano il valore di potenziale redox, oltre al fatto che anche i microrganismi, ne contribuiscono alla modifica. Per esempio gli aerobi consumano l'ossigeno presente nell'ambiente di crescita, riducendone di conseguenza il potenziale redox. Oppure alcuni microrganismi riescono a ridurre il valore di potenziale redox a causa della comparsa di prodotti metabolici, come ad esempio H_2S. In base a quanto appena esposto, quindi si può effettuare una classificazione dei microrganismi in base all'intervallo di potenziale redox all'interno del quale possono crescere (Tab. 1.3).

Tabella 1.3: Intervalli di potenziale redox e classificazione dei microrganismi (Ray, 2004).

Denominazione	Eh, mV
Aerobi obbligati	+500/+300
Anaerobi facoltativi	+300/+100
Anaerobi obbligati	+100/-250

Gli aerobi obbligati, essendo microrganismi capaci di respirare aerobicamente, ricavano la maggior parte della propria energia dalla fosforilazione ossidativa, la quale usa l'ossigeno come accettore finale di elettroni. Di conseguenza hanno bisogno della presenza dell'ossigeno nell'ambiente di crescita e, quindi, di elevati valori di potenziale redox.

Gli anaerobi obbligati invece crescono soltanto in totale assenza di ossigeno e a bassi valori di Eh, se non addirittura negativi: ciò accade perché il metabolismo anaerobio riesce a ricavare una minore quantità di potere riducente rispetto a quello aerobio e, per poter cercare di ridurre al minimo una sua eventuale perdita, è richiesto un ambiente riducente. Inoltre bisogna anche ricordare che l'ossigeno ha un vero e proprio effetto tossico sui microrganismi anaerobi obbligati, legato al fatto che essi non riescono a smaltire i composti tossici dell'ossigeno molecolare (perossido di idrogeno, anione superossido), a causa della mancanza degli enzimi superossido dismutasi e catalasi, che si occupano di catalizzare le reazioni di smaltimento (Adams and Moss, 2008).

$$2O_2^{-\bullet} + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2 \tag{1.6}$$

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \tag{1.7}$$

Gli anaerobi facoltativi possono crescere anche in presenza di ossigeno, nonostante non siano in grado di eseguire la respirazione aerobica, poiché vertono sulla fermentazione. Anche essi mancano degli enzimi catalasi e superossido dismutasi, ma sono in grado di crescere in presenza di ossigeno perché sono forniti di un meccanismo di distruzione dei superossidi basato sull'accumulo di concentrazioni millimolari di manganese (Adams and Moss, 2008).

1.5 Effetto dell'attività dell'acqua

L'acqua allo stato liquido è un elemento essenziale per la vita degli organismi. Da ciò si deduce quanto la disponibilità di acqua sia uno dei fattori più importanti, se non il principale, ad influenzare la crescita microbica. L'acqua viene utilizzata per trasportare nutrienti e rimuovere prodotti di scarto, oltre che per sintetizzare nuovo materiale cellulare (Ray, 2004). Inoltre il citoplasma è racchiuso da una membrana che fa fluire l'acqua da e verso la cellula: il flusso di molecole d'acqua per un microrganismo è uno stato stazionario, ed una sua perturbazione può avere effetti negativi. Un modo per poter esprimere la quantità di acqua disponibile per la crescita dei microrganismi è quello di valutare l'attività dell'acqua (a_w), che altro non è che il rapporto tra la tensione di vapore della soluzione (P) e quella dell'acqua pura (P_0):

$$a_w = \frac{P}{P_0}. \tag{1.8}$$

Considerando però la presenza di soluti in soluzione, l'attività dell'acqua può anche essere espressa come il rapporto fra il numero di moli di acqua in soluzione (N_w) e il numero di moli totali (N_s) (solvente più soluti) (Adams and Moss, 2008):

$$a_w = \frac{N_w}{(N_w + N_s)}. \tag{1.9}$$

Un ulteriore parametro legato all'attività dell'acqua è la pressione osmotica, che rappresenta la forza che si dovrebbe esercitare per bloccare il flusso di molecole di acqua da un ambiente con attività dell'acqua maggiore ad uno con un valore minore. Essendo il citoplasma una soluzione acquosa, quindi caratterizzato da un'attività dell'acqua minore dell'acqua pura, si avrà un flusso netto di solvente all'interno della cellula. Se non controllato, tale flusso può comportare la rottura della membrana cellulare (Adams and Moss, 2008). Ad una diminuzione dell'attività dell'acqua, corrisponde un aumento del valore di pressione osmotica. In una tale situazione il microrganismo reagisce facendo in modo che il valore citoplasmatico di attività dell'acqua sia comunque minore rispetto a quello dell'ambiente esterno. Questo meccanismo di regolazione si basa sulla sintesi di soluti che non vanno ad intaccare le funzionalità della membrana citoplasmatica e, che per questo, sono denominati soluti compatibili: alcuni di essi sono carnitina, prolina e trimetilglicina (Jay et al., 2005).

L'attività dell'acqua rappresenta anche un modo per quantificare la quantità di acqua libera disponibile, ovvero quella non legata ad altre molecole: infatti la disponibilità di acqua non dipende soltanto dalla quantità presente *in toto*, perché sostanze (soluti come sali e/o zuccheri) e superfici solide possono sottrarre molecole d'acqua, diminuendone in maniera considerevole la quantità disponibile per la crescita. Ogni specie microbica ha un valore minimo, massimo e ottimale di attività dell'acqua per la crescita (Ray, 2004). Tali valori però non sono assoluti, in quanto possono essere modificati da altri fattori ambientali come temperatura e presenza di nutrienti. Per esempio, infatti il range di a_w in cui si ha crescita microbica è più ampio quando la temperatura è al suo valore ottimale oppure quando sono presenti i nutrienti necessari allo sviluppo. Se l'attività dell'acqua viene abbassata rispetto al valore ottimale, generalmente si osservano un aumento della durata della fase di latenza, una minore velocità di crescita e una diminuzione delle dimensioni finali della popolazione microbica. Tutto ciò può essere spiegato dal fatto che tutte le reazioni chimiche della cellula richiedono la presenza di acqua (Jay et al., 2005). Quando il valore di a_w viene portato al di sotto del valore minimo per la crescita, la cellula comunque resta vitale e molti microrganismi riescono a sopravvivere in questa condizione. Riducendo il valore di attività dell'acqua, il numero di microrganismi capaci di crescere diminuisce: nonostante ciò, esistono comunque diverse specie microbiche capaci di crescere in ambienti con bassa disponibilità di acqua, come per esempio gli alofili (ambienti ad elevata salinità), gli osmofili (ambienti ad elevata concentrazione di composti organici non ionizzati, come gli zuccheri) e gli xerofili (ambienti molto secchi). Infine il valore limite di attività dell'acqua, sotto il quale non si osserva crescita microbica, è 0,6 (Adams and Moss, 2008).

1.6 Effetto dei nutrienti

Lo sviluppo microbico si basa sulla sintesi di nuovo materiale cellulare. I microrganismi ricevono dall'ambiente di crescita un substrato che viene utilizzato come fonte di energia e altri elementi chimici, costituenti la biomassa, che autonomamente non sono capaci di sintetizzare. Generalmente la crescita microbica si basa sulla presenza di un componente chiave. La relazione che correla la concentrazione di tale componente alla crescita microbica è l'equazione di Monod, matematicamente analoga a quella di Michaelis-Menten per la cinetica enzimatica, accentuando in questo modo la stretta connessione fra reazioni enzimatiche e crescita microbica (Adams and Moss, 2008):

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{S + K_S}. \tag{1.10}$$

Dove μ è la velocità specifica di crescita, μ_{MAX} la velocità specifica di crescita massima, S la concentrazione del substrato limitante la crescita e K_S la costante di saturazione, che indica la concentrazione di substrato limitante per cui la velocità specifica di crescita è esattamente la metà di quella massima. K_S rappresenta anche una misura dell'affinità che il microrganismo ha nei confronti del substrato limitante la crescita: più basso sarà il valore della costante di saturazione, più il microrganismo sarà capace di crescere in ambienti con basse concentrazioni di substrato. Se S è molto maggiore di K_S, il microrganismo cresce ad una velocità prossima a quella massima e il fenomeno segue una cinetica di ordine zero. Al contrario, se S è molto minore di K_S, la crescita ha una cinetica di ordine uno (Fig. 1.3).

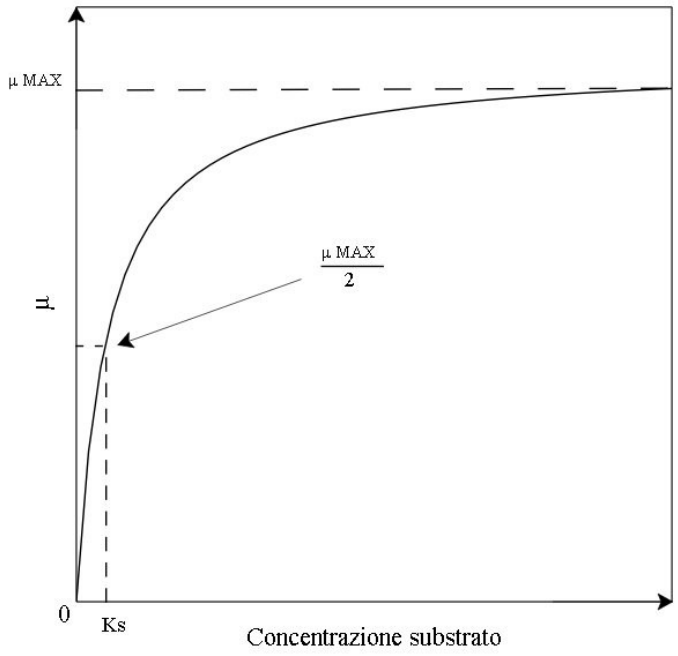

Figura 1.3: Modello di Monod.

Alcuni microrganismi hanno la capacità di crescere su substrati che, a causa della propria natura tossica, causano inibizione durante la crescita. Quando si verifica il fenomeno di

inibizione da substrato, la velocità di crescita microbica gradualmente diminuisce o è rallentata a causa dell'aumento della concentrazione nel *medium* di coltura del substrato inibente. Alcuni microrganismi, tra cui *Rhodospirillum rubrum*, hanno la capacità di utilizzare la CO come substrato: la crescita però risulta essere inibita quando è presente una grande concentrazione di CO disciolta. Ciò accade perché la CO è in grado di formare complessi molto stabili con la componente metallica degli enzimi utilizzati per la sua ossidazione, causando una forte riduzione dell'attività enzimatica. Il modello utilizzato per descrivere questo fenomeno è quello di Andrews (Fig. 1.4), che altro non è che una forma modificata del modello di Monod (Najafpour et al., 2004):

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{\frac{S^2}{K_i} + S + K_S}. \tag{1.11}$$

Il fenomeno di inibizione viene matematicamente determinato dalla presenza del termine K_i, che rappresenta la costante di inibizione.

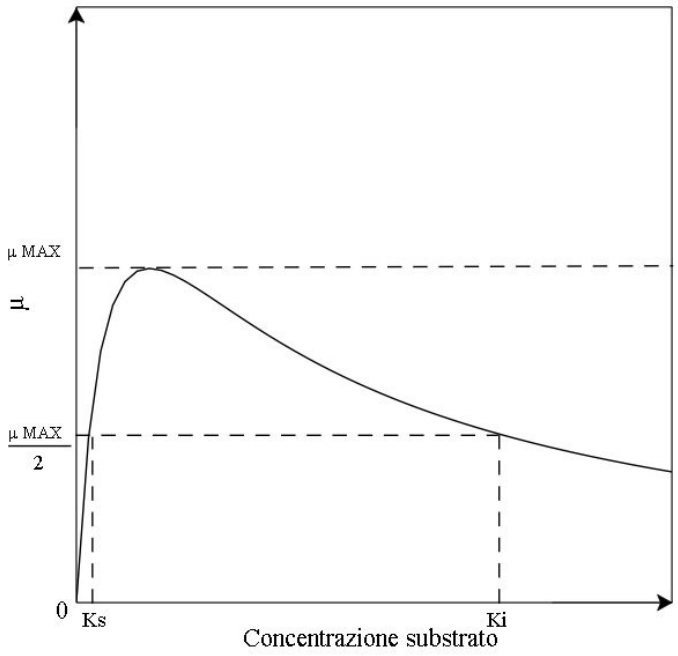

Figura 1.4: Modello di Andrews

Capitolo 2
I poliidrossialcanoati (PHA)

2.1 Introduzione

Le plastiche di origine petrolchimica nel XIX secolo hanno assunto una importanza fondamentale nell'industria, venendo infatti impiegate in numerosi settori, che vanno da quello automobilistico sino a quello medico. La grande versatilità di questi materiali è dovuta al fatto che, essendo polimeri sintetici, possono essere manipolati chimicamente a livello strutturale per ottenere una grande varietà di oggetti, caratterizzati da innumerevoli forme e proprietà. Ciò che rende le *oil-based plastics* un pericolo per l'ambiente è la loro difficoltà nello smaltimento: infatti esse sono estremamente resistenti alla degradazione microbica, a causa della eccessiva dimensione delle proprie molecole, e perciò permangono nell'ambiente per lunghi periodi (Reddy et al, 2003). Ogni anno vengono disperse milioni di tonnellate di plastica, che vanno ad inquinare l'ambiente. Uno dei modi possibili per smaltire questo eccesso di materiale è tramite l'incenerimento. Tale possibilità, oltre che essere un processo molto costoso, è anche esso dannosa per l'ambiente poiché durante la combustione, si producono sostanze nocive, come acido cloridrico e cianidrico. Anche il riciclo della plastica non è una adeguata soluzione al problema a causa dell'impiego di additivi e pigmenti colorati che limitano l'utilizzo dei materiali riciclati (Khanna et al, 2005). Negli ultimi anni, tutto ciò ha fatto in modo che si sviluppasse un pensiero critico riguardo gli effetti dannosi delle plastiche, ponendo sempre più interesse verso la produzione di materiali biodegradabili. Le plastiche biodegradabili possono essere divise in tre categorie (Khanna et al, 2005):

1) Polimeri sintetizzati chimicamente: fanno parte di questa categoria polimeri come l'acido polilattico o l'acido poliglicolico (Mater-Bi™, Ingeo™). I monomeri vengono prodotti per via biotecnologica ed in seguito polimerizzati secondo sintesi chimica classica. Il prodotto finito è sensibile alla degradazione enzimatica e/o microbica;
2) Plastiche derivate dall'amido: l'amido viene utilizzato come elemento di *cross-linking* per produrre un polimero che nella propria struttura abbia una matrice composta da amido e plastica. I microrganismi in un primo momento degradano l'amido, rompendo la matrice polimerica e riducendo in parte il tempo di degradazione, ma i frammenti di origine petrolchimica comunque permangono nell'ambiente per lungo tempo. Questo tipo di plastica risulta essere solo in parte degradabile;
3) Poliidrossialcanoati (PHA): sono le uniche plastiche degradabili completamente (Biopol™). Chimicamente sono dei poliesteri, con la funzione di riserva energetica intracellulare, sintetizzati da numerosi microrganismi in eccesso di carbonio e in presenza di concentrazioni limitanti di un nutriente essenziale (azoto, fosforo). Sono i principali candidati alla sostituzione delle plastiche di origine petrolchimica poiché posseggono proprietà meccaniche comparabili a quelle dei materiali tradizionali. Il poliidrossibutirrato è stato il primo PHA ad essere scoperto, e di conseguenza quello maggiormente studiato e caratterizzato.

2.2 Cenni storici

Nel 1923 il microbiologo francese Maurice Lemoigne, presso l'Istituto Pasteur, scoprì la capacità del batterio gram-positivo *Bacillus megaterium* di accumulare granuli citoplasmatici di poli-3-idrossibutirrato (P(3HB)). Solo nel 1927 fu capace di estrarlo in quantità ritenute apprezzabili, tramite l'impiego di cloroformio come solvente. La produzione su scala industriale di P(3HB) non fu raggiunta però prima degli anni '60, quando furono depositati i primi brevetti negli USA per produrre ed isolare la sostanza, grazie al lavoro di Baptist e Weber della W.R Grace & Co: maggiormente il polimero veniva utilizzato per la produzione di oggetti destinati al settore medico. La produzione però venne soppressa a causa delle basse rese di fermentazione, degli elevati costi, legati soprattutto al solvente utilizzato per l'estrazione, e delle contaminazioni da parte di residui batterici nel prodotto finito (Philip et al, 2007).

La crisi petrolifera negli anni '70 diede una nuova spinta alla ricerca di materiali in grado di sostituire le plastiche tradizionali. Nel Regno Unito, la Imperial Chemical Industries (ICI) mise a punto un protocollo in grado di far accumulare P(3HB) ad *Alcaligenes latus* fino al 70% del proprio peso secco. Purtroppo il polimero ottenuto era fragile e con proprietà meccaniche non soddisfacenti, oltre che ancora caratterizzato da un elevato costo di produzione. Quindi superato questo periodo di crisi, la ricerca di materiali alternativi venne in parte accantonata (Philip et al, 2007). Nel frattempo, ICI produsse un nuovo polimero nel 1982 da *Alcaligenes eutrophus*, BIOPOL, risultato della copolimerizzazione di 3-idrossibutirrato e 3-idrossivalerato, caratterizzato da proprietà chimico-fisico nettamente migliorate (minore cristallinità, maggiore elasticità) (Reddy et al, 2003). La produzione di bioplastiche ha poi conosciuto una crescita negli anni '90 sino ad arrivare ai giorni nostri, favorita da legislazioni comunitarie e iniziative private, portando anche ad una diminuzione dei costi di produzione, dipendenti essenzialmente dal tipo di substrato utilizzato nel processo (Reddy et al, 2003).

Tabella 2.1: Influenza del substrato sul processo produttivo (Reddy et al., 2003).

Substrato	Prezzo substrato, USD/kg	Resa, g P(3HB)/g substrato	Costo prodotto, USD/kg
Glucosio	0,493	0,38	1,30
Saccarosio	0,290	0,40	0,72
Metanolo	0,180	0,43	0,42
Acido acetico	0,595	0,38	1,56
Etanolo	0,502	0,50	1,00
Melasso di canna	0,220	0,42	0,52
Siero di latte	0,071	0,33	0,22
Idrolizzato di emicellulosa	0,069	0,20	0,34

2.3 Struttura e proprietà

I poliidrossialcanoati, come già accennato, a livello chimico sono dei poliesteri sintetizzati da numerose tipologie di batteri, sia gram-positivi che gram-negativi. Sono state individuate almeno 75 specie batteriche (Reddy et al, 2003), tra cui *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Aeromonas*, *Rhodobacter*, in grado di produrre e accumulare, sotto forma di granuli citoplasmatici insolubili (Philip et al, 2007), poliidrossialcanoati come riserve di carbonio ed energia, fino al 90% del proprio peso secco. Una delle condizioni necessarie alla sintesi di PHA è quella di trovarsi in un ambiente in cui vi sia una limitazione di nutrienti essenziali (azoto, fosforo) e in eccesso di fonte di carbonio (Reddy et al, 2003). All'incirca un centinaio di monomeri compongono i PHA, facendo così in modo di avere la possibilità di creare polimeri biodegradabili caratterizzati da una ampia varietà di proprietà meccaniche (Reddy et al, 2003). Tipicamente la massa molecolare di questo tipo di polimeri varia dai 20000 ai 3000000 Da, a seconda del microrganismo produttore e delle condizioni di crescita (Khanna et al, 2005). Le unità monomeriche sono destrorse, sottolineando la stereospecificità degli enzimi responsabili della biosintesi (Reddy et al, 2003).

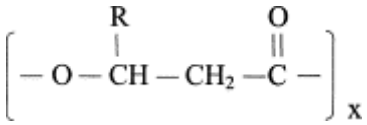

Figura 2.1: Unita monomerica di PHA (Reddy et al., 2003).

I PHA vengono classificati in *short-chain-lenght (SCL)* e *medium-chain-lenght (MCL)*, a seconda del numero di atomi di carbonio che costituiscono lo scheletro nell'unità monomerica. I primi, che si comportano da materiali termoplastici, sono composti da monomeri con all'interno dai 3 ai 5 atomi di carbonio. Sono materiali fragili, rigidi e con un elevato grado di cristallinità. I secondi, con proprietà analoghe agli elastomeri, posseggono uno scheletro carbonioso contenente dai 6 ai 14 atomi: sono flessibili, meno cristallini e con un punto di fusione più basso (Akaraonye et al, 2010). La differenza fra queste due tipologie di PHA è dettata dalla specificità delle PHA sintasi appartenenti a specie differenti, che sono in grado di metabolizzare substrati con uno scheletro carbonioso di una certa lunghezza. Infatti in *Alcaligenes eutrophus*, PHA sintasi riesce a polimerizzare solo monomeri costituiti da 3 a 5 atomi di carbonio, mentre in *Pseudomonas oleovorans* solo da 6 a 14 atomi (Khanna et al, 2005). Il grande interesse suscitato dai PHA, è dettato dal fatto di essere caratterizzati da proprietà chimico-fisiche comparabili a quelle delle plastiche tradizionali, ad esempio il polipropilene (Akaraonye et al, 2010).

Infine la struttura finale del biopolimero dipende dalla fonte di carbonio utilizzata. In base a ciò, i substrati carboniosi sono classificati in *related*, se danno vita a monomeri strutturalmente identici alla fonte di carbonio utilizzata, oppure *unrelated*, nel caso in cui la struttura dei monomeri derivanti sia completamente diversa da quella del substrato fornito (Philip et al, 2007).

Le proprietà meccaniche dei poliidrossialcanoati possono essere modificate miscelando monomeri di natura diversa in proporzioni differenti, creando copolimeri: questo risultato può essere ottenuto utilizzando sia microrganismi che spontaneamente sintetizzano copolimeri sia ingegnerizzando specie microbiche che naturalmente produrrebbero omopolimeri. Per esempio, il P(3HB) è un materiale altamente cristallino, fragile e rigido, con una temperatura di fusione di 180°C. Introducendo monomeri differenti all'interno della catena polimerica (3-

idrossivalerato (3HV), 4-idrossibutirrato (4HB), 3-idrossiesanoato (3HHx)) le proprietà del materiale possono essere notevolmente migliorate: infatti il poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato (P(3HB-co-3HV)) ha una temperatura di fusione più bassa e una minore cristallinità (Philip et al, 2007). Anche la percentuale molare di eteropolimero ha un effetto importante sulle proprietà del materiale: all'aumentare della frazione di 3HV il copolimero diventa più resistente, flessibile e registra un aumento dell'allungamento a rottura. Regolando le quantità e le tipologie di precursori (ad esempio l'acido propionico per il 3HV), si possono quindi controllare le proprietà del materiale prodotto (Khanna et al., 2005).

Tabella 2.2: Paragone fra differenti tipologie di PHA e polipropilene (Akaraonye et al, 2010).

Proprietà	SCL PHA	MCL PHA	Polipropilene
Cristallinità, %	40-80	20-40	70
Punto di fusione, °C	53-80	30-80	176
Densità, g/cm^3	1,25	1,05	0,91
Resistenza a trazione, MPa	4-43	20	34
Temperatura di transizione vetrosa, °C	-148/-4	-40/-150	-10
Allungamento a rottura, %	6-1000	300-450	400
Biodegradabilità	Buona	Buona	Nessuna

Tabella 2.3: Confronto fra proprietà meccaniche di differenti polimeri (Khanna et al., 2005).

Polimero	Temperatura di fusione, °C	Temperatura di transizione vetrosa, °C	Modulo di Young, GPa	Resistenza a trazione, MPa	Allungamento a rottura, %
P(3HB)	180	4	3,5	40	5
P(4HB)	53	-48	149	104	1000
P(3HB-co-3HV)					
3% mol 3HV	170	-	2,9	38	-
20% mol 3HV	145	-1	1,2	20	50
P(3HB-co-4HB)					
10% mol 4HB	159	-	-	24	242
16% mol 4HB	150	-7	-	26	444
P(3HB-co-3HHx)					
10% mol 3HHx	127	-1	-	21	400
Polipropilene	176	-10	1,7	34,5	400
LDPE	130	-30	0,2	10	620

2.4 Biosintesi

La possibilità di ottenere PHA di natura differente è legata al percorso metabolico intrapreso dal microrganismo durante la sintesi del biopolimero. Quattro differenti vie biosintetiche per i PHA sono state caratterizzate:

1) Il primo è il meccanismo utilizzato da microrganismi come *Ralstonia eutropha*, nonché il più conosciuto. In questa via metabolica dapprima si ha la condensazione, catalizzata dall'enzima 3-chetiolasi di due molecole di acetil-CoA provenienti dal ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), per formare acetoacetil-CoA. In seguito, l'enzima NADPH-dipendente acetoacetil-CoA riduttasi agisce su acetoacetil-CoA formando (R)-3-idrossibutinil-CoA. Infine l'enzima PHA sintasi catalizza la polimerizzazione di (R)-3-idrossibutinil-CoA in PHB. I geni responsabili della sintesi di PHA sono raggruppati e quindi organizzati in un operone;
2) Il secondo meccanismo, utilizzato da microrganismi come *Rhodopseudomonas rubrum*, differisce dal precedente per il fatto che l'acetoacetil-CoA viene ridotto da una NADH-dipendente riduttasi a (L)-3-idrossibutinil-CoA e poi successivamente convertito in (R)-3-idrossibutinil-CoA da enoil-CoA idratasi (Khanna et al, 2005);
3) Il terzo meccanismo è quello che sfrutta il catabolismo degli acidi grassi, ovvero la β-ossidazione. Tramite questa via metabolica si generano differenti precursori utilizzati per la sintesi di PHA, da parte di microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*). Questi microrganismi sono in grado di sintetizzare PHA_{MCL} da vari substrati di diversa natura, che vanno ad influenzare direttamente la composizione dei monomeri. In *Aeromonas caviae*, l'intermedio metabolico trans-2-enoil-CoA viene convertito in (R)-3-idrossibutinil-CoA da una enoil-CoA idratasi stereospecifica: la presenza di una idratasi simile è stata ritrovata anche in *Pseudomonas aeruginosa*;
4) La quarta via biosintetica è particolarmente interessante perché si basa sulla sintesi *de novo* di precursori monomerici (acidi grassi) direttamente da substrati come glucosio, saccarosio e fruttosio. L'enzima acil-ACP-CoA transacilasi, importante collegamento fra le sintesi di acidi grassi e PHA, converte l'(R)-3-idrossiacil-ACP (*acyl carrier protein*) in (R)-3-idrossiacil-CoA, generando quindi monomeri per la produzione di PHA (Philip et al, 2007).

2.5 Biodegradabilità

Una delle proprietà più importanti dei poliidrossialcanoati è la loro completa biodegradabilità in numerosi ambienti naturali (terreno, acque dolci e salate, acque reflue) (Khanna et al, 2005). In condizioni aerobiche i PHA si decompongono in acqua e anidride carbonica (mineralizzazione), mentre in ambienti anaerobici in metano e CO_2 (metanizzazione) (Reddy et al, 2003). I microrganismi in natura riescono a degradare i PHA grazie all'utilizzo delle proprie PHA depolimerasi, la cui attività dipende da fattori ambientali (temperatura, pH, attività dell'acqua) e da proprietà chimico-fisiche del materiale stesso (temperatura di fusione, composizione, cristallinità, additivi, area superficiale) (Khanna et al, 2005). Infatti è stato dimostrato che i PHA a basso peso molecolare sono più facilmente degradabili, mentre i materiali ad alto grado di cristallinità, essendo composti da strutture altamente ordinate, hanno una minore biodegradabilità. Per quanto riguarda la temperatura di fusione è stato notato che ad un suo aumento, corrisponde una diminuzione della biodegradabilità del polimero (Philip et al, 2007). Infine anche la composizione monomerica ha un effetto sulla velocità di

decomposizione: infatti i polimeri contenenti unità monomeriche di 4-idrossibutirrato (4HB) sono più facilmente degradabili rispetto al P(3HB) o al P(3HB-co-HV) (Akaraonye et al, 2010).

Tabella 2.4: Microrganismi responsabili della degradazione dei PHA in differenti ambienti *(*Khanna et al., 2005).

Ambiente	Microrganismo
Terreno	*Aspergillus fumigatus*
	Acidovorax faecalis
	Pseudomonas lemoignei
	Variovorax paradoxus
Mare	*Comamomas testosteroni*
Acqua dolce	*P. stutzeri*
Fognatura	*Pseudomonas fluorescens*
	Ilyobacter delafieldii

La degradazione dei PHA in ambiente avviene su due livelli: il primo extracellulare e il secondo intracellulare. A livello extracellulare, i microrganismi attaccano i polimeri in superficie secernendo delle depolimerasi extracellulari: il risultato è una degradazione enzimatica che si svolge in due fasi. Nella prima fase si ha l'adsorbimento degli enzimi sulla superficie del materiale. Nella seconda si ha l'idrolisi della catena polimerica sui siti attivi enzimatici, con produzione di frammenti solubili, che possono essere così assorbiti dalla cellula attraverso la membrana cellulare. In primo luogo la degradazione enzimatica produce oligomeri, che possono essere assorbiti direttamente tal quali oppure ulteriormente idrolizzati, poiché alcune specie microbiche sono capaci di sintetizzare ulteriori enzimi in grado di scindere ulteriormente gli oligomeri nei corrispondenti monomeri. Una volta che i frammenti residui sono stati assorbiti dal microrganismo, può iniziare la fase di degradazione intracellulare. Durante questa fase l'enzima PHA depolimerasi scinde le molecole di P(3HB) in acido 3-idrossibutirrico, che a sua volta viene ossidato da una deidrogenasi per produrre acetoacetil-CoA. Infine l'enzima 3-chetiolasi scinde l'acetoacetil-CoA in due molecole di acetil-CoA, che in condizioni aerobiche entrano nel ciclo dell'acido citrico, venendo infine ossidate a CO_2. L'enzima 3-chetiolasi è caratterizzato da una grande importanza in quanto svolge un ruolo chiave sia nella sintesi che nella degradazione del PHA (Philip et al, 2007).

2.6 Applicazioni

I PHA hanno trovato spazio in numerosi campi di utilizzo, proprio grazie alle proprie caratteristiche. Avendo proprietà comparabili a quelle dei polimeri di origine petrolchimica, i PHA possono essere utilizzati per la produzione di oggetti di uso quotidiano, come bottiglie, rasoi, articoli per l'igiene personale, oppure essere impiegati nel settore *packaging* (Reddy et

al, 2003). Inoltre sono utilizzati come pellicola nella produzione di superfici impermeabili da utilizzare al posto dell'alluminio. Infine i PHA, grazie alla propria natura piezoelettrica, possono essere impiegati nella produzione di sensori di ogni genere (Philip et al, 2007).

Un altro settore in cui i PHA trovano largo impiego è quello biomedico: infatti vengono utilizzati per la produzione di suture, tamponi, materiale chirurgico (valvole cardiache, innesti vascolari, legamenti), poiché, essendo prodotti tramite fermentazione, non contengono residui di catalizzatori metallici utilizzati nella sintesi chimica (Philip et al, 2007). Inoltre, sfruttando le proprie caratteristiche piezoelettriche, possono essere utilizzati in osteogenesi, in particolar modo per la riparazione delle ossa (Reddy et al, 2003). I PHA sono anche i migliori candidati per la produzione di *carrier* farmaceutici, grazie alla propria biodegradabilità e biocompatibilità. Essi possono essere degradati a partire dalla superficie: in questo modo si riesce ad avere un rilascio graduale di farmaco, che viene influenzato dalla composizione e dalla porosità della matrice polimerica, dal grado di cristallinità e dal peso molecolare del farmaco, ma non dal peso molecolare del polimero. Da questo punto di vista, l'unica pecca dei PHA è rappresentata dalla bassa velocità di biodegradazione e dalla grande resistenza all'idrolisi in ambienti sterili (Philip et al, 2007).

Lo stesso principio del rilascio controllato di un farmaco, fa in modo che i PHA vengano utilizzati anche in agricoltura per il rivestimento di fertilizzanti, erbicidi e, in particolar modo, insetticidi. Il rilascio di insetticida dipende dalla quantità di parassiti presenti nella coltivazione, che sarà tanto più elevato quanto sarà elevato il grado di contaminazione

Capitolo 3
La fermentazione di *syngas*

3.1 Introduzione

La fermentazione di *syngas* viene considerata come una delle possibili soluzioni riguardo l'aumento delle richieste energetiche del pianeta, dovuto soprattutto alla rapida espansione della popolazione mondiale e della conseguente industrializzazione (Redl et al., 2017). Con il termine "*syngas fermentation*" viene indicato l'utilizzo di microrganismi come catalizzatori per la conversione di H_2 e della frazione C_1 del syngas in prodotti ad alto valore aggiunto. Grazie a questo processo si possono produrre sia *chemicals* (PHA, acidi organici) che *biofuels* (etanolo, butanolo) (Drzyga et al., 2015). Uno degli obiettivi principali dell'introduzione e dello sviluppo di tale tecnologia è il tentativo di diminuire, o addirittura eliminare, la dipendenza dalle fonti fossili. Infatti si stima che esse siano destinate ad esaurirsi nel giro di 50 anni, secondo le stime basate sui *consumption rates* odierni (Yasin et al., 2015). Il *syngas* utilizzato nel processo viene ottenuto tramite una conversione termochimica (gassificazione) di materiali di scarto (residui agricoli, rifiuti urbani) contenenti una frazione carboniosa rilevante e riutilizzabile. Tutto ciò si inserisce nell'ottica di una economia circolare, basata sul principio della rivalutazione e della trasformazione di scarti in prodotti ad alto valore aggiunto (Drzyga et al., 2015). Uno dei vantaggi della gassificazione è l'ottenimento di una corrente gassosa dove le differenze nelle composizioni chimiche delle varie fonti di partenza vengono appianate. Infatti il gas prodotto è per la maggior parte composto da H_2, CO, CO_2: ciò rende possibile l'utilizzo di biomasse di varia natura (Yasin et al., 2015). Inoltre l'utilizzo di biocatalizzatori è più efficiente rispetto alla catalisi classica, considerando le minori richieste energetiche (temperatura e pressione vicine ai valori ambiente) ed economiche (Drzyga et al., 2015).

Una delle maggiori difficoltà per lo sviluppo della *syngas fermentation* su larga scala è la bassa densità cellulare raggiungibile nel processo, a causa del basso *mass-transfer rate* dei gas utilizzati. Ciò è da imputare alla bassa solubilità in soluzione acquosa di CO e H_2. Di conseguenza l'utilizzo di tali gas si traduce in un processo controllato dal trasferimento di materia gas-liquido. Infatti la concentrazione dei substrati disciolti in soluzione non è sufficiente a saturare le richieste dei microrganismi. L'entità delle resistenze al trasferimento di materia gas-liquido dipende da numerosi fattori correlati sia direttamente alle proprietà del *medium* che alle condizioni operative del processo. Inoltre al diminuire della solubilità del gas si ha l'aumento della resistenza al trasferimento di materia. In un processo in cui vengono utilizzati dei gas, la valutazione del coefficiente volumetrico di trasferimento di materia gas-liquido rappresenta un modo per poter valutare le resistenze al *mass-transfer*. Tale parametro dipende da alcuni fattori come la dimensione ed il numero di bolle, la velocità di agitazione, la geometria del reattore e la natura del liquido (Yasin et al., 2015).

Un ulteriore fattore da analizzare è la cinetica di reazione del processo: infatti utilizzando substrati gassosi, il reattore impiegato deve essere capace di garantire una condizione operativa compresa fra due situazioni limite. La prima è quella che si verifica quando il sistema è controllato dal *mass-transfer*. In questo caso si produce una quantità di biomassa sempre maggiore che comporta una richiesta progressiva di substrato, che però il sistema non riesce a soddisfare. La seconda situazione si verifica quando il sistema è controllato dalla

cinetica: in questo caso il substrato è efficientemente fornito alla fase liquida, ma non vi è una concentrazione cellulare sufficiente da permettere uno stato stazionario (Mohammadi et al., 2011). Quindi, affinché si possa sviluppare un processo di *syngas fermentation* su scala industriale, vi è la necessità di mettere a punto un design ottimale che coniughi assieme l'ottenimento di un notevole *gas-liquid mass-transfer* e di elevate concentrazioni sia di biomassa che di prodotto, in un tempo breve, senza che si verifichino fenomeni di limitazione e/o inibizione da substrato (Yasin et al., 2015).

3.2 Gassificazione di biomasse

La gassificazione è un processo che permette di convertire termochimicamente la parte carboniosa contenuta in biomasse di origine e composizione differenti in una miscela di gas chiamata *syngas* (Redl et al., 2017). La composizione del gas prodotto dipende sia dalla natura del *feed* che dai parametri del processo. I maggiori componenti del *syngas* sono CO, CO_2 e H_2, ma vengono prodotti anche altri composti gassosi in percentuale minore, ceneri e *tar* (termine indicante il benzene e altri idrocarburi aromatici condensabili con un peso molecolare maggiore del benzene (Rabou et al., 2009)). Generalmente le altre specie presenti nel *syngas* sono: acqua, metano, etano, etilene, acetilene, azoto, ammoniaca, acido cianidrico, ossidi di azoto e zolfo, acido solfidrico e solfuro di carbonile (Daniell et al., 2012).

La conversione delle biomasse in *syngas* si articola in tre fasi distinte. Esse comprendono: il pre-trattamento della materia prima, la gassificazione e infine il *gas-cleaning* (Daniell et al., 2012). Nella fase di pre-trattamento si modificano le proprietà fisico-chimiche della biomassa di partenza in maniera tale da poterla rendere omogenea per un processo più efficiente. Il *feed*, a seconda della sua natura e della tipologia di gassificazione impiegata, può essere essiccato, polverizzato o ridotto in pellet. Il contenuto di umidità della biomassa è un parametro molto importante da considerare poiché ha delle ripercussioni rilevanti sul processo. In primo luogo, una elevata umidità può comportare un *cracking* incompleto degli idrocarburi nel gassificatore, abbassando la temperatura di esercizio nella zona di ossidazione e riducendo, di conseguenza, la quantità di CO nel *syngas*. Inoltre si può avere una ulteriore riduzione del quantitativo di CO poiché tramite la reazione di *water-gas shift* si promuove la produzione di H_2 e CH_4. Perciò, prima di procedere con la gassificazione, si deve prestare attenzione al fatto che la biomassa abbia un contenuto di umidità compreso fra il 10 e il 15%. Le prestazioni del processo e la composizione del *syngas* ottenuto, sono influenzati positivamente dalla polverizzazione del *feed* tipicamente in particelle di dimensione compresa fra i 20 e gli 80 mm. Tutto ciò accade perché si riscontrano miglioramenti nei trasferimenti di massa e calore che influenzano direttamente la cinetica di gassificazione (conversione del carbonio, concentrazione di *tar*) (Daniell et al., 2012).

La gassificazione si differenzia dalla combustione, seguendo le reazioni seguenti che rappresentano il processo:

Ossidazione parziale	$C + 0{,}5\ O_2 \leftrightarrow CO$	(3.1)
Ossidazione completa	$C + O_2 \leftrightarrow CO_2$	(3.2)
Water-gas reaction	$C + H_2O \leftrightarrow CO + H_2$	(3.3)

Inoltre CO e H_2 possono ulteriormente reagire: essendo reazioni di equilibrio, il loro verso dipende da numerosi fattori quali temperatura, pressione, concentrazione di reagenti, agente gassificante e tipologia di gassificazione (Daniell et al., 2012).

Water-gas shift $$CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + H_2 \quad (3.4)$$

Metanazione $$CO + 3H_2 \leftrightarrow CH_4 + H_2O \quad (3.5)$$

Il processo di gassificazione può essere suddiviso in tre fasi principali: essiccamento, pirolisi, ossidazione. La fase di essiccamento avviene ad una temperatura compresa fra i 100 e 200°C ed è finalizzato alla rimozione dell'umidità del *feed*. In seguito poi si verifica la pirolisi della biomassa, ad una temperatura di 300-500°C: durante questa fase la biomassa viene termicamente decomposta in assenza di agente ossidante, formando idrocarburi gassosi e *char*. Si verifica quindi il rilascio di metano, anidride carbonica, monossido di carbonio, acqua a *tar*. Infine l'ossidazione avviene quando il *char* (solido ad alto contenuto di carbonio) reagisce con l'ossigeno, mentre l'idrogeno nella biomassa viene ossidato per formare acqua, rilasciando una grande quantità di calore. Durante questa fase, poiché l'agente ossidante viene fornito in quantità sub-stechiometrica, il carbonio nella biomassa viene parzialmente ossidato, risultando nella produzione di una maggiore quantità di CO rispetto alla CO_2. La gassificazione del *char* è il *rate-limiting step* del processo, la cui velocità dipende da variabili come pressione, velocità di riscaldamento, concentrazione di agente gassificante e proprietà della biomassa (Daniell et al., 2012). Ottimizzando il processo di gassificazione, la composizione del *syngas* può essere indirizzata preferibilmente verso la produzione di CO e H_2. Per esempio operando ad una temperatura di 1100°C, si avranno nel gas concentrazioni maggiori di CO e H_2. Mentre utilizzando ossigeno puro come agente ossidante, la concentrazione di prodotti contenenti azoto può essere notevolmente ridotta, anche se non azzerata (poiché comunque l'azoto contenuto nella biomassa è introdotto nel sistema con essa) (Abubackar et al., 2011).

3.3 Materie prime per la gassificazione

La biomassa utilizzata per la gassificazione può provenire da fonti differenti: possono essere utilizzate colture dedicate, residui agricoli e forestali e rifiuti urbani. Un fattore da non sottovalutare è la maggiore reattività della biomassa rispetto al carbone utilizzato tradizionalmente per la gassificazione, che comporta una minore temperatura di processo. D'altro canto il contenuto carbonioso nella biomassa è molto minore rispetto a quello nel carbone (rispettivamente 39-52% e 68-92%): lo svantaggio è che quindi una minore quantità di carbonio sarà disponibile nel *syngas* per la fermentazione (Ramachandriya et al., 2016).

Uno dei parametri principali che influisce sulla scelta della biomassa da utilizzare è il costo della stessa: ciò perché la maggior parte dei costi del processo, e conseguentemente del prodotto finale, dipendono da quello della materia prima. Infatti si stima che la spesa riguardante la materia prima di partenza possa arrivare a rappresentare all'incirca il 67% del costo totale di produzione (Abubackar et al., 2011). Anche le proprietà intrinseche della biomassa influiscono sui costi di processo: per esempio un elevato contenuto di umidità comporta uno *step* preventivo di essiccamento, che richiede un grande quantitativo di energia. Prima di inviare il *feed* al gassificatore, il frazionamento e la lisciviazione con acqua sono operazioni volte a diminuire il contenuto di composti azotati e alcalini, in modo da produrre un *syngas* con un maggior grado di purezza. Inoltre una biomassa caratterizzata da un

maggiore contenuto minerale porterà ad una elevata produzione di ceneri, che può causare problemi nelle tubature dell'impianto (intasamento). Infine la produzione di *tar* e composti volatili durante la gassificazione può causare quiescenza e inibizione delle cellule microbiche (Munasinghe et al., 2010). Quindi ogni operazione effettuata a monte e/o a valle della gassificazione, che abbia lo scopo di produrre un gas quanto più puro possibile, comporta un aumento dei costi operativi. La scelta perciò deve essere orientata verso una biomassa che abbia bisogno del minor numero di trattamenti possibili, sia prima che dopo la gassificazione.

L'impiego di coltivazioni dedicate sembra non essere una soluzione sostenibile dal punto di vista etico, poiché è un meccanismo che compete con il *food-processing*, utilizzando materie prime altrimenti destinate alla alimentazione umana (Wainaina et al., 2017). Inoltre, percorrendo questa via, si rischia di sfociare in un processo non sostenibile anche da un punto di vista ambientale. Infatti si potrebbe correre il rischio di sottrarre terreno utile al reparto agricolo, aumentando così il fabbisogno generale di terra coltivabile, generando contemporaneamente un incremento dell'inquinamento a causa dell'utilizzo intensivo di macchine agricole e fertilizzanti (Daniell et al., 2012). L'utilizzo invece di scarti, residui e rifiuti agricoli, industriali e urbani sembra essere la soluzione più appropriata per il rifornimento di biomassa, considerandone anche l'abbondanza e il basso costo.

La lignocellulosa, maggior componente strutturale delle piante, è la più abbondante materia prima organica rinnovabile sul pianeta, con una produzione annua di circa 200 miliardi di tonnellate (Wainaina et al., 2017), ed è costituita da tre componenti principali: cellulosa (40-50%), emicellulosa (20-40%) e lignina (10-40%) (Abubackar et al., 2011). Una delle maggiori limitazioni ad un suo impiego è l'elevata resistenza all'attacco microbico: infatti la maggior parte dei microrganismi non è capace di metabolizzare la lignina, rendendola in buona parte inutilizzabile. Inoltre la separazione della lignina da cellulosa ed emicellulosa (substrati idrolizzabili a semplici zuccheri fermentabili per via enzimatica e/o chimica) è un processo complesso, caratterizzato quindi da elevati costi e richieste energetiche (Wainaina et al., 2017). Tramite la gassificazione invece si riescono a superare tutte queste limitazioni, trasformando direttamente la biomassa in *syngas*, utilizzabile per la sintesi di un ampio *range* di prodotti tramite la *syngas fermentation*.

Una ulteriore e possibile fonte di biomassa è rappresentata dai rifiuti generati dai processi industriali o dalle cucine domestiche e/o commerciali, di cui circa il 30% è costituito da materiale organico. Inoltre gli alimenti, che assieme ad altri tipi di rifiuti si trovano all'interno degli *MSW* (*municipal solid waste*) ne rappresentano la componente maggiore. Si stima che lo spreco di cibo annualmente ammonti approssimativamente a 1,3 miliardi di tonnellate, che generalmente finiscono in discarica oppure vengono inceneriti: in questa maniera però si rischia di esporre l'ambiente ad un rischio notevole. Infatti tramite l'incenerimento potrebbe verificarsi la generazione di gas tossici, oppure, durante la permanenza in discarica dei rifiuti, potrebbero esserci un rilascio di sostanze indesiderate, che andrebbero ad inquinare le falde acquifere, ed una produzione incontrollata di gas serra, come ad esempio il metano. Quindi la gassificazione potrebbe rappresentare una possibile soluzione alle suddette problematiche, trasformando contemporaneamente i rifiuti in una risorsa utile. Una delle difficoltà maggiori nell'utilizzo di questa fonte è rappresentata dall'elevato contenuto di umidità del *feed*: una possibile soluzione al problema potrebbe essere la co-gassificazione dei rifiuti alimentari con altro materiale (ad esempio con della biomassa lignocellulosica). Un ulteriore approccio che permette di gassificare biomasse ad elevato contenuto di umidità, superando la fase di essiccamento, è la gassificazione con acqua supercritica: superato il proprio punto critico (374,12°C e 221,2 bar), l'acqua assume un comportamento intermedio fra la fase liquida e quella gassosa. In queste condizioni si riduce la solubilità della componente inorganica della biomassa, mentre si aumenta quella della frazione organica: tutto ciò porta quindi ad una

minore formazione di *tar* seguita da una maggiore produzione di idrogeno ed una maggiore efficienza generale del processo. La particolarità operativa di questo processo permette di gassificare, sia rifiuti solidi ad elevato tenore di umidità che liquidi, come ad esempio le acque reflue, generate durante la produzione di olio di oliva. Il processo tuttavia presenta degli svantaggi: infatti i notevoli valori di temperatura e pressione raggiunti richiedono un dispendio energetico abbastanza elevato e la necessità di particolari tipi di impianto, che comportano anche elevati costi di investimento (Wainaina et al., 2017).

3.4 La biocatalisi

Il *syngas* viene tradizionalmente convertito tramite *metal-based catalysts* in prodotti ad alto valore aggiunto: nel processo le reazioni sono pressoché istantanee, ma sono presenti comunque degli svantaggi. Infatti il processo avviene a temperature e pressioni molto elevate, che richiedono un importante dispendio energetico. Inoltre i catalizzatori impiegati sono caratterizzati da una selettività non elevata, che porta quindi alla produzione di prodotti indesiderati. Ciò comporta anche la necessità di operare in presenza di un *feed* che abbia specifici rapporti fra i componenti gassosi. Infine i catalizzatori metallici sono facilmente avvelenati dalla presenza di composti solforati (H_2S, COS, mercaptani, zolfo organico) anche in piccole quantità (ppm), causando una ulteriore diminuzione della resa del processo: ad esempio prima di essere utilizzato, il *syngas* necessita di un trattamento di desolforazione che riduca il contenuto di zolfo ad un valore inferiore di 0,1 ppm (Mohammadi et al., 2011)

L'impiego invece di biocatalizzatori per la *syngas fermentation* permette di superare le difficoltà e i punti deboli della conversione catalitica classica, malgrado i microrganismi siano caratterizzati da basse velocità di reazione. Innanzitutto, i biocatalizzatori operando a temperatura e pressione più vicine alle condizioni ambiente, comportano un notevole risparmio energetico. Inoltre tale condizione sfavorisce gli equilibri termodinamici, facendo in modo che le reazioni biologiche diventino irreversibili, aumentando contemporaneamente le efficienze di conversione (Wainaina et al., 2017). Oltre a ciò, la reazione di *water-gas shift*, che permette la produzione di H_2, è propria del metabolismo dei microrganismi anaerobi utilizzati. Per di più, a causa della elevata selettività delle reazioni enzimatiche, i biocatalizzatori tendono ad essere più *product specific* (Drzyga et al., 2015): in questo modo la resa del processo viene notevolmente aumentata in quanto si generano una quantità minore di prodotti secondari, risultando in un più facile recupero del prodotto desiderato. Un ulteriore vantaggio dell'utilizzo dei biocatalizzatori è la loro elevata tolleranza ad eventuali impurità tossiche presenti nel *syngas*, come ad esempio composti solforati: addirittura tali composti possono favorire la crescita dei microrganismi anaerobi in quanto riducono il potenziale redox del *medium* di coltura, essendo agenti riducenti (Mohammadi et al., 2011). Infine i microrganismi non richiedono specifici rapporti fra le componenti del *syngas* per poter crescere (Wainaina et al., 2017) Tutto ciò quindi permette di utilizzare, come *feed* per la produzione di gas, materie prime di origine e composizione eterogenee, a causa alla natura uniformante della gassificazione stessa, che grazie ad un unico processo riesce a produrre un gas fermentabile dalle caratteristiche simili, nonostante le differenze iniziali.

3.5 La reazione di *WGS* (*water-gas shift*) nei microrganismi

Tramite la reazione di *water-gas shift* (*WGS*), il contenuto di H_2 nel *syngas* può essere incrementato. Infatti il monossido di carbonio presente nel *syngas* reagisce con l'acqua per formare H_2 e CO_2. Tradizionalmente questa reazione si esegue servendosi di catalizzatori a

base metallica, che ad esempio contengono come principi attivi cromo, zinco, ferro: ovviamente un processo così impostato porta con sé tutti gli svantaggi legati all'utilizzo di catalizzatori inorganici (Mohammadi et al., 2011).

La stessa reazione però può avvenire in un sistema biologico utilizzando microrganismi capaci di ossidare la CO e produrre contemporaneamente H_2. Il processo segue le semireazioni:

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2e^- + 2H^+ \quad (3.6)$$

$$H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 \quad (3.7)$$

La prima semireazione si basa sull'intervento di una CO-deidrogenasi (CODH). Tramite la seconda semireazione si fornisce l'energia necessaria alla crescita microbica, poiché una idrogenasi catalizza la riduzione dell'idrogeno. Sommando le due semireazioni, si ottiene la reazione di *water-gas shift* complessiva del processo (ΔG = -20.1 kJ/mol):

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2 \quad (3.8)$$

La conversione del CO tramite la *WGS* produce 4,46 kcal/mol, mentre una semplice ossidazione genererebbe 61,1 kcal/mol:

$$CO + O_2 \rightarrow CO_2 \quad (3.9)$$

Tramite la fermentazione anaerobica si produce molta meno energia rispetto alla respirazione aerobica, tanto che per generare lo stesso quantitativo energetico una cellula dovrebbe consumare una quantità di substrato dieci volte maggiore. Ciò comporta un veloce *turnover* di substrato che può rappresentare un ottimo vantaggio. Nella respirazione aerobica non si produce H_2, nonostante si produca una maggiore quantità di energia e si raggiungano alti valori di densità cellulare (Mohammadi et al., 2011).

La reazione di *WGS* è integrata nel metabolismo di molti microrganismi, che a seconda della specie hanno performance differenti. I microrganismi capaci di produrre idrogeno sono suddivisi in quattro categorie: eterotrofi anaerobi, eterotrofi anaerobi facoltativi, eterotrofi anerobi obbligati e batteri fotosintetici (Mohammadi et al., 2011). Questi ultimi hanno destato particolare attenzione poiché la produzione di H_2 è un processo molto versatile: infatti i batteri fotosintetici hanno differenti tipologie di enzimi sulla quale basarsi per poter portare a termine la reazione di *WGS*. Fra i batteri fotosintetici, *Rhodospirillum rubrum* è quello che ha attirato particolare considerazione grazie ad una elevata velocità di utilizzo di monossido di carbonio, seguita da una conversione quasi totale dello stesso (Mohammadi et al., 2011).

Inoltre i batteri anerobi fotosintetici riescono a generare un flusso di energia grazie all'utilizzo di substrati organici e dell'energia proveniente dalla luce. Ciò è possibile grazie alla presenza di pigmenti capaci di catturare la radiazione luminosa e di trasformarla in energia chimica. Tali pigmenti svolgono un ruolo fondamentale per la crescita cellulare poiché regolano l'assorbimento di luce da parte del microrganismo, causando una diretta connessione fra

intensità luminosa e sviluppo microbico. Infatti, nonostante l'assorbimento della radiazione luminosa sia un promotore per la crescita cellulare, un eccesso della stessa potrebbe causare una diminuzione dell'attività microbica, con un effetto simile ad una vera e propria inibizione da substrato. Quindi in presenza di microrganismi fotosintetici, anche l'intensità della radiazione luminosa dovrà essere sottoposta ad un processo di ottimizzazione (Mohammadi et al., 2011).

3.6 Effetti delle condizioni di processo

La *syngas fermentation* è un processo che risente degli effetti combinati di differenti parametri operativi, basandosi sull'impiego di un sistema biologico: ognuno di questi parametri deve essere attentamente messo a punto, per poter favorire la crescita microbica e raggiungere rese elevate di prodotto.

3.6.1 Composizione del *medium*

I batteri necessitano di una fonte di energia per sopravvivere e moltiplicarsi, sintetizzando nuovo materiale cellulare. Durante la *syngas fermentation* i batteri metabolizzano le componenti principali del gas, utilizzandole come fonte di carbonio ed energia. Tutto ciò però non basta ad assicura una attività metabolica adeguata: anche altri composti come vitamine e minerali devono essere forniti alle cellule (Abubackar et al., 2011).

Un altro aspetto critico del processo è quello di evitare che vi sia una limitazione di nutrienti che possa causare problemi sia di crescita che di sopravvivenza delle cellule: infatti in questa condizione si può verificare che il microrganismo abbia difficoltà a promuovere la sintesi di enzimi e/o la formazione di cofattori, necessari al metabolismo cellulare, con un conseguente rallentamento dello stesso (Mohammadi et al., 2011).

Essendo in ogni caso un processo biologico, la *syngas fermentation* può anche andare incontro a fenomeni di inibizione causati sia da substrati che da prodotti. Per esempio, la produzione di acidi organici è associata alla comparsa di idrogeno. Un aumento della pressione parziale di H_2 può causare un aumento di concentrazione del gas in fase liquida che va ad inibire la fermentazione. Lo stesso effetto si può avere anche aumentando la pressione parziale di CO_2: infatti in questo modo, molto più gas si solubilizza nel *medium*, portando alla produzione di acido carbonico e/o carbonati che influiscono direttamente sul pH della soluzione e di conseguenza sulla crescita microbica (Mohammadi et al., 2011). In uno studio effettuato su *Rhodospirillum rubrum* (Nafajpour et al., 2004), la concentrazione di acetato è stata variata fra 1 e 3 g/L: un aumento della stessa oltre questo valore, ha portato ad una conversione di acetato ridotta dal 73 (con concentrazione di acetato pari a 1,5 g/L) al 23%, una conversione di CO dal 97 (con concentrazione di acetato pari a 2 g/L) al 30% ed una riduzione del 50% sulla produzione di idrogeno.

I batteri utilizzati nella *syngas fermentation* sono classificati come anaerobi, pertanto non capaci di vivere in ambienti ad alto valore di potenziale redox. L'eventuale presenza di ossigeno causerebbe un aumento del potenziale redox: quindi nel *medium* di coltura dovranno essere aggiunti degli agenti riducenti che hanno il compito di abbassare il potenziale redox. Nelle colture microbiche, gli agenti riducenti più utilizzati sono la cisteina cloridrato monoidrato, il solfato di sodio nonaidrato e l'acido ascorbico. Na_2S inoltre può decomporsi e formare H_2S, che può essere trovato nel *syngas* come impurità (Mohammadi et al., 2011). Sempre considerando *Rhodospirillum rubrum*, è stato scoperto che l'attività dell'enzima CO-

deidrogenasi (CODH) è stimolato dalla presenza di H_2S durante la fermentazione del *syngas* (Do et al., 2007).

Infine anche la presenza di tracce di ioni metallici (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}) nel *medium* influenza la crescita microbica e la sintesi del prodotto (Mohammadi et al., 2011). Ciò accade perché la maggior parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei batteri utilizzati deve la propria attività alla presenza di cofattori metallici, come ad esempio la sopraccitata CODH.

3.6.2 Pressione parziale dei substrati

Durante la *syngas fermentation*, la pressione parziale dei vari costituenti del *syngas* ha un ruolo fondamentale. Gli elettroni necessari alla crescita cellulare possono provenire sia da H_2, grazie all'utilizzo delle idrogenasi, che dal CO attraverso l'enzima CODH. Quindi il monossido di carbonio può essere utilizzato sia come fonte di energia che di elettroni. Tuttavia per poter ottenere una più efficiente conversione del carbonio, è preferibile che gli elettroni necessari provengano da H_2. Quindi, in presenza di idrogeno, i microrganismi utilizzano il CO solo come fonte di carbonio. Nel caso in cui ciò non sia possibile, il CO viene impiegato sia come fonte di carbonio che di elettroni, tramite la reazione di *WGS*, che ne comporta l'ossidazione a CO_2. Da ciò quindi si comprende l'importanza della pressione parziale di H_2 sul processo (Wainaina et al., 2017).

Inoltre, una volta raggiunti elevati valori di densità cellulare, il processo risulta essere un fenomeno governato dal *mass-transfer*, considerando anche la bassa solubilità di CO in soluzione acquosa. Il problema può essere risolto aumentando la pressione parziale del gas, fornendo in questo modo una opportuna *driving force* al *mass-transfer*. Infatti in una coltura *batch*, il trasferimento di un substrato gassoso in fase liquida è direttamente proporzionale alla pressione applicata sullo spazio di testa. L'incremento della disponibilità di substrato ad alte concentrazioni cellulari comporta un aumento dell'attività degli enzimi, la cui sintesi viene promossa dalla presenza maggiore di nutrienti, con un conseguente incremento della velocità di crescita e della produttività (Wainaina et al., 2017). Aumentando la pressione parziale dei gas, anche il volume del sistema può essere ridotto (Mohammadi et al., 2011). Ovviamente tale soluzione è solo possibile nel caso in cui si utilizzino microrganismi capaci di resistere ad alte pressioni parziali di gas, e quindi ad alte concentrazioni di substrato. Infatti è stato osservato che nei microrganismi meno resistenti al CO, un aumento della sua pressione parziale comporta un prolungamento del tempo di duplicazione cellulare (Abubackar et al., 2011).

3.6.3 Impurità nel *syngas*

I microrganismi utilizzati nel processo sono molto più resistenti alle impurità nel gas rispetto ai catalizzatori a base metallica. In ogni caso ciò non implica che la crescita microbica e la sintesi dei prodotti non siano influenzati da eventuali impurità presenti nella corrente gassosa. Quindi il *syngas* dovrà comunque rispettare un certo grado di purezza. La comparsa di composti indesiderati nel gas dipende da differenti fattori, come ad esempio la natura della biomassa utilizzata per la gassificazione, i pre-trattamenti a cui è sottoposta o le condizioni di processo dell'operazione. Inoltre una serie di apparecchiature per il *gas-cleaning* (cicloni, filtri, precipitatori elettrostatici, *scrubber*) possono essere utilizzate a valle della gassificazione per raggiungere la purezza necessaria (Munasinghe et al., 2010). Alcune delle impurità nel *syngas* includono ceneri, idrocarburi volatili (metano, acetilene, etilene, etano),

tar, composti azotati (ammoniaca, NO_X, acido cianidrico) e solforati (SO_X, acido solfidrico, solfuro di carbonile) (Xu et al., 2011).

Con il termine *tar* ci si riferisce comunemente al benzene e ad altri idrocarburi aromatici condensabili con un peso molecolare maggiore del benzene, la cui formazione avviene durante la fase di pirolisi del processo di gassificazione. La presenza di questo tipo di impurità comporta un rallentamento del metabolismo cellulare e quindi altera la produttività del processo (Daniell et al., 2012). Le costanti di Henry di naftalene e benzene in soluzione acquosa sono rispettivamente 1000 e 10000 volte maggiori rispetto a quelle di CO e H_2. Da ciò si evince che, nonostante una bassa concentrazione, tali composti possono avere un'incidenza importante sul processo (Ramachandriya et al., 2016).

La comparsa di composti azotati nel gassificatore si verifica per la presenza di azoto nella biomassa o dell'eventuale utilizzo di aria come agente gassificante. Nel sistema si possono avere sia zone di riduzione che di ossidazione. In condizioni di riduzione, l'azoto nella biomassa viene trasformato in HCN, poi ridotto ad ammoniaca. Tuttavia la concentrazione di queste due specie dipende dalle condizioni di processo: infatti quando è presente nel sistema H_2 in eccesso, l'azoto si trova sotto forma di ammoniaca e quindi HCN non si decompone. Quando invece nel gassificatore vi è un ambiente ossidante (con un eccesso di O_2), l'ammoniaca viene trasformata in NO oppure N_2O preferibilmente (a sua volta velocemente ossidato a NO). Inoltre l'eventuale presenza di cloro nel gas, comporta la produzione di cloruro di ammonio (NH_4Cl) che, dissociandosi in ione ammonio in soluzione acquosa, aumenta la pressione osmotica e inibisce le idrogenasi (Ramachandriya et al., 2016). Un analogo effetto di inibizione si verifica quando NO è presente ad una concentrazione maggiore di 40 ppm, influenzando direttamente la crescita microbica e la formazione del prodotto. Infatti inibendo le idrogenasi, gli elettroni necessari al metabolismo cellulare vengono ricavati da CO invece che da H_2, riducendo in questo modo l'efficienza di conversione del carbonio. In ogni caso, la maggior parte dell'azoto introdotto nel gassificatore viene convertito in NH_3, che si ritrova in soluzione come ione ammonio, portando alle conseguenze precedentemente esposte. Inoltre l'ammoniaca, data l'elevata solubilità in acqua, può accumularsi nel bioreattore fino a livelli critici, nonostante la concentrazione nel *syngas* non sia elevata. Infine una parte dell'ammoniaca nel sistema può anche essere utilizzata come fonte di azoto dai microrganismi (Daniell et al., 2012).

Le specie solforose si generano a partire dallo zolfo presente nella biomassa. Sicuramente H_2S è il composto presente in maggiore quantità e rappresenta il 93-96% dello zolfo totale nel *syngas*, mentre la restante parte è costituita da COS. I catalizzatori *metal-based* sono molto sensibili a questo tipo di impurità: infatti una concentrazione anche solo di 0,1 ppm può avere effetti importanti. Invece i batteri impiegati nella *syngas fermentation* sono caratterizzati da una tolleranza maggiore verso questo tipo di composti, fino anche ad una concentrazione pari al 20% nel *feed*. Inoltre alcuni microrganismi, fra cui *Rhodospirillum rubrum*, sono capaci di degradare COS a H_2S tramite la reazione:

$$\mathrm{COS} + \mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{H_2S} + \mathrm{CO_2} \tag{3.10}$$

Oltre a ciò, i composti solforati possono essere utilizzati sia come fonte di zolfo per i batteri che come controllo del potenziale redox, rimuovendo l'eventuale ossigeno presente (Ramachandriya et al., 2016). Nonostante il fatto che i batteri possano tollerare concentrazioni importanti di composti solforati, bisogna prestare attenzione al fatto che, superata una certa

soglia limite, sia l'utilizzo di substrato che la crescita cellulare sono influenzati negativamente dalla presenza di zolfo (Daniell et al., 2012).

Gli idrocarburi volatili possono avere un effetto importante sulla *syngas fermentation*, anche essendo presenti in tracce. Per esempio, l'acetilene è conosciuto come un potente inibitore di idrogenasi: infatti su *Rhodospirillum rubrum* si è registrata una inibizione delle CODH all'incirca del 50% in presenza del 10% (v/v) di C_2H_2 (Abubackar et al., 2011). Inoltre l'acetilene ha un effetto inibente su alcuni microrganismi in quanto interferisce con il gradiente protonico trans-membrana, e quindi con la sintesi di ATP (Ramachandriya et al., 2016).

Infine anche l'ossigeno può essere considerato come una delle impurità del *syngas*, in quanto è un vero e proprio veleno taluni microrganismo. Infatti gli enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare sono disattivati anche da livelli molto bassi di ossigeno. Inoltre l'effetto tossico dell'ossigeno si esplica anche tramite l'aumento del valore del potenziale redox nel *medium* di fermentazione (Ramachandriya et al., 2016). Nel caso in cui non si riuscisse ad evitarne la presenza nel *syngas*, l'ossigeno può essere rimosso facendo passare il gas attraverso un letto di rame ridotto oppure attraverso un catalizzatore al palladio. Questa ultima soluzione è da preferire nel caso in cui sia presente nella corrente gassosa anche una elevata concentrazione di acetilene, che altrimenti reagirebbe con il rame per dare acetiluro di rame, formando una pericolosa atmosfera esplosiva (Daniell et al., 2012).

3.7 Limitazione sul trasferimento di materia

Una delle difficoltà maggiori dello sviluppo del processo su larga scala è quella di superare i problemi relativi al trasferimento di materia. La bassa solubilità dei substrati gassosi in fase liquida è fra le maggiori problematiche. Infatti i maggiori componenti del *syngas*, CO e H_2, hanno una solubilità in soluzione acquosa pari rispettivamente al 77 e al 68% di quella dell'ossigeno a 35°C (Abubackar et al., 2011). Inoltre il processo coinvolge tre fasi: il *syngas*, contenente i substrati gassosi, il *medium* liquido e le cellule microbiche: ognuna di queste fasi porta con sé una possibile resistenza al trasporto di materia (Wainaina et al., 2017). Una limitazione sul *mass-transfer* può verificarsi durante uno qualsiasi degli *step* seguenti: trasferimento del gas in fase liquida, diffusione nel medium di coltura e nel film di liquido stagnante attorno alla cellula, raggiungimento del sito cellulare di utilizzo del substrato. In realtà, operando con gas poco solubili, la resistenza maggiore si ha durante il trasferimento del gas in fase liquida (Mohammadi et al., 2011).

Sono state individuate due condizioni di processo: la prima è una situazione di limitazione da trasferimento di materia, la seconda di una limitazione cinetica (Wainaina et al., 2017). La prima si verifica quando nel sistema è presente una elevata concentrazione cellulare: teoricamente il *rate* di reazione potrebbe essere molto elevato, ma il sistema non riesce a rifornire adeguatamente le cellule di substrato. La concentrazione di soluto in fase liquida è pressoché nulla e il sistema si dice controllato dal *mass-transfer*: quindi la concentrazione cellulare e la velocità di reazione dipendono dalla capacità del reattore di fornire il substrato. La seconda situazione si ha quando nel sistema non è presente una concentrazione cellulare tale da utilizzare la quantità di substrato che viene adeguatamente fornita: in questo caso il sistema si definisce cineticamente controllato, in quanto la velocità di reazione dipende esclusivamente dal numero di cellule presenti nel sistema. Ciò comporta un incremento della concentrazione in fase liquida del substrato fino al raggiungimento del limite di saturazione: così facendo non si fornisce più una adeguata *driving force* al *mass-transfer*, di fatto

rallentandolo e/o bloccandolo. Inoltre eventuali elevate quantità di substrato in soluzione possono causare anche fenomeni di inibizione (Wainaina et al., 2017).

L'*overall mass-transfer rate* di un gas in fase liquida è dato dal prodotto fra il coefficiente volumetrico di trasferimento di materia, l'area disponibile al *mass-transfer* e la forza motrice del fenomeno (Abubackar et al., 2011):

$$Q_S = \frac{K_L a}{H}(P_S{}^G - P_S{}^L) \tag{3.11}$$

A causa della bassa solubilità del componente gassoso in fase liquida, la concentrazione dello stesso nel *medium* può essere trascurata rispetto a quella in fase gassosa. Quindi il bilancio può essere così riscritto (Munasinghe et al., 2010):

$$\left(\frac{dN_S}{dt}\right) = -\frac{K_L a}{H}\left(P_S{}^G - P_S{}^L\right)V_L \tag{3.12}$$

La differenza di pressione parziale del substrato gassoso rappresenta la forza motrice per il trasferimento di materia e controlla la solubilità del gas. Una possibile soluzione al problema del *mass-transfer* sarebbe quella di aumentare la pressione del sistema. Tuttavia così facendo, si possono innescare meccanismi di inibizione, specialmente utilizzando substrati come il CO (Munasinghe et al., 2010). Una correlazione fra utilizzo di substrato e inibizione causata dallo stesso è rappresentata dal modello di Andrews o Haldane (Abubackar et al., 2011):

$$q_S = \frac{q_S^{MAX} P_S{}^L}{K_S + P_S{}^L + \frac{(P_S{}^L)^2}{K_i}} \tag{3.13}$$

Il trasferimento di materia di un gas in fase liquida può essere migliorato aumentando la solubilità del gas oppure diminuendo la serie di resistenze che si oppongono al fenomeno. Un metodo per poter raggiungere questo risultato è quello di diminuire il diametro delle bolle di gas: tramite questa scelta si ottiene un doppio vantaggio poiché si riescono ad aumentare sia la superficie disponibile per il trasferimento di materia che il tempo di permanenza del gas nel liquido. Una ulteriore soluzione potrebbe essere quella di aumentare la portata di gas che si immette nel fermentatore, la cui conversione si mantiene ad un buon livello operando un opportuno riciclo del gas inutilizzato (Mohammadi et al., 2011).

Diverse soluzioni reattoristiche sono state analizzate per poterne confrontare gli effetti sul coefficiente volumetrico di trasferimento di materia ($K_L a$), che rappresenta un modo per poter analizzare le performance di diverse configurazioni sotto le stesse condizioni fluidodinamiche (Munasinghe et al., 2010). Alcuni valori sono sintetizzati in tabella 3.1 (Bredwell et al., 1999). Per poter ottenere una buona conversione del *syngas*, la scelta del fermentatore dovrà ricadere su una soluzione che combini sia una buona densità cellulare che un adeguato trasferimento di materia (Abubackar et al., 2011).

Tabella 3.1: Confronto fra K_La di differenti configurazione reattoristiche (Bredwell et al., 1999).

Reattore	N, rpm	Microrganismo	Gas	K_La, h^{-1}
CSTR	300	*C. ljungdahlii*	*Syngas*	35,0 (CO)
CSTR	300	*R. rubrum*	*Syngas*	28,1 (CO)
CSTR	450	*R. rubrum*	*Syngas*	101,0 (CO)
STR *microbubble sparger*	300	Coltura mista	*Syngas*	104,0 (CO) 190,0 (H_2)
Packed bubble column	-	*R. rubrum*	*Syngas*	2,1
Trickle bed	-	*R. rubrum*	*Syngas*	55,5

Utilizzando dei CSTR per poter aumentare il coefficiente volumetrico di trasferimento di materia sono state proposte differenti soluzioni. Per esempio si può decidere di lavorare con vari tipi di agitatori: fra tutti, i maggiori valori sono stati raggiunti tramite l'utilizzo di un *impeller* di tipo Rushton. Un'altra possibile soluzione è quella di lavorare con un *microsparger* che porta alla rottura del flusso di *syngas* in microbolle. Lo stesso effetto si può ottenere aumentando la velocità di rotazione degli agitatori: purtroppo su larga scala questa soluzione non è economicamente sostenibile, in quanto su grandi volumi si produrrebbero elevati consumi energetici. Inoltre in questo modo aumenterebbero anche gli stress fluidodinamici a carico delle cellule microbiche, che andrebbero a danneggiare i batteri più sensibili (Mohammadi et al., 2011).

Anche altre configurazioni reattoristiche sono state analizzate, come ad esempio i reattori a bolle, che hanno dimostrato di avere valori del K_La maggiori e costi operativi e di mantenimento inferiori rispetto ai CSTR (Mohammadi et al., 2011). Un risultato ancora migliore si è ottenuto, anche ad alte portate di gas, con i reattori monolitici ceramici: tutto ciò grazie alla modifica del flusso da parte della struttura del reattore, che permette anche di raggiungere una elevata densità cellulare. Le conseguenze dirette di questa configurazione sono un incremento dell'efficienza e della velocità di formazione del prodotto. Inoltre i reattori *trickle-bed* hanno dimostrato essere una valida alternativa. In questo tipo di reattori le cellule sono immobilizzate su del materiale impaccato e vengono circondate completamente dal gas, mentre la fase liquida viene fatta percolare (Wainaina et al., 2017). Infine anche l'utilizzo di membrane polimeriche nei reattori ha la capacità di aumentare il *mass-transfer*. Negli *hollow-fiber membrane biofilm reactors (HFMBfR)*, il substrato gassoso viene pressurizzato e direttamente diffuso nel *medium* di coltura attraverso la membrana. I microrganismi crescono utilizzando la membrana come supporto e come sistema di diffusione del gas, creando un biofilm direttamente immerso nel brodo di coltura. In questo modo il substrato gassoso viene utilizzato dai microrganismi nel biofilm, risultando quindi in un aumento delle rese di fermentazione. Ovviamente la membrana utilizzata deve essere in grado di sostenere la pressione esercitata dal gas su di essa (Yasin et al., 2015).

Infine anche l'aggiunta di additivi nella fase liquida ha dimostrato di avere un effetto positivo sul trasferimento di materia. Per esempio, utilizzando degli elettroliti in soluzione, il coefficiente di trasferimento di materia di CO in acqua può essere aumentato. Ciò è possibile grazie all'aumento dell'area superficiale disponibile, in quanto si riduce la coalescenza delle bolle. Ovviamente solo i composti compatibili con la crescita dei microrganismi possono

essere impiegati per tale scopo (Wainaina et al., 2017). Oltre agli elettroliti, anche l'aggiunta di micro/nanoparticelle alla fase liquida può comportare un aumento del trasferimento di materia, grazie all'effetto *shuttle*. Il gas si adsorbe sul film stagnante di liquido attorno alla particella, per la presenza di alcuni gruppi funzionali posti sulla superficie della stessa, e poi si desorbe direttamente nel liquido, facilitando il trasferimento nel liquido (Wainaina et al., 2017). I gruppi funzionali adatti a tale scopo sono metile, nitrilpropile, carbossipropile e mercaptopropile (Zhu et al., 2008): da ciò si è dedotto che il gruppo idrossilico è il diretto responsabile dell'adsorbimento di CO dal *syngas* e del suo successivo rilascio in soluzione (Mohammadi et al., 2011).

Capitolo 4
Rhodospirillum rubrum

4.1 Introduzione

L'utilizzo del *syngas* come substrato per la fermentazione incontra alcune difficoltà non trascurabili, ad esempio la presenza di inquinanti e di inibitori della crescita microbica. Uno degli aspetti più influenti è rappresentato dalla tossicità del monossido di carbonio (CO), uno dei componenti principali del *syngas*, per la maggior parte degli organismi viventi. Nonostante ciò una serie di microrganismi, sia aerobi che anaerobi, sono in grado di sfruttare il CO, o in generale la componente C1 del *syngas*, come fonte di carbonio e/o di energia tramite ossidazione del substrato. Esistono tre classi di microrganismi capaci di ossidare il CO: i fototrofi, gli acetogeni e i carbossidotrofi aerobi (Drzyga et al., 2015). Fra i batteri fototrofi, i *purple non-sulfur bacteria* (PNSB) sono i microrganismi che hanno più attirato attenzione per le proprie capacità di adattamento e la elevata versatilità metabolica. Infatti essi sono capaci di crescere in assenza di luce, sia tramite respirazione che fermentazione. Esposti ad una sorgente luminosa, sintetizzano un sistema di pigmenti responsabili della cattura della luce. In questo modo riescono ad effettuare la fotosintesi, sia in aerobiosi che in aerobiosi. Inoltre questa specie di microrganismi è capace di produrre H_2 tramite la reazione di *water-gas shift*, grazie soprattutto alla presenza di un enzima particolare: la CO-deidrogenasi (CODH). Il microrganismo maggiormente studiato e caratterizzato, appartenente a questa specie batterica, è *Rhodospirillum rubrum*. Infatti, essendo capace di crescere in numerose condizioni, fra cui quelle citate in precedenza, si presta in maniera ottimale alla fermentazione del *syngas* (Drzyga et al., 2015). Inoltre, una ulteriore e fondamentale caratteristica di tale batterio, è quella di riuscire a produrre PHA, sotto forma di granuli citoplasmatici.

Alcuni esempi di termini di paragone presenti in letteratura sono riassunti in tabella 4.1.

4.2 I primi studi

Le particolari ed uniche proprietà del microrganismo hanno da sempre attratto l'interesse della ricerca. Infatti già a partire dagli anni '70, alcuni studi sono stati effettuati con lo scopo di comprendere il metabolismo del batterio in differenti condizioni di crescita. Ad esempio si è analizzata la capacità di *Rhodospirillum rubrum* di utilizzare il piruvato come fonte di carbonio in condizioni di anaerobiosi in assenza di luce. Si è dimostrato come il batterio sia capace non solo di utilizzare il piruvato come fonte di energia, ma anche di incorporarlo a livello di materiale cellulare, producendo contemporaneamente PHB. Oltre a ciò si è riscontrata anche la produzione di formato, acido acetico e acido formico, oltre che di acetato, anidride carbonica e idrogeno. Più del 90% del piruvato fornito alla coltura è stato utilizzato per la fermentazione, conclusasi dopo all'incirca 100 h. Inoltre è stato studiato anche l'effetto di diverse concentrazioni di substrato sulla crescita del batterio. Il valore massimo di densità cellulare raggiunto è stato di $4x10^8$ cellule/ml, con una concentrazione di piruvato di 44 μmol/ml. Valori superiori di substrato non hanno portato ad incrementi della densità cellulare. Per quanto riguarda la produzione di ATP, si sono registrati valori di circa 1 mole di ATP prodotta per mole di piruvato fermentata. Infine è stata anche dimostrata la capacità del batterio di produrre H_2 (Uffen, 1973).

Altri studi si sono concentrati sulle proprietà di crescita del batterio su differenti tipologie di substrato, che non fossero il piruvato, in assenza di luce e in anaerobiosi. In questo lavoro si è analizzata la capacità di *Rhodospirillum rubrum* di crescere su differenti tipi di zuccheri e substrati non fermentabili. Da ciò si è dimostrato come il batterio riesca a crescere utilizzando il fruttosio, senza l'ausilio di ulteriori agenti ossidanti, raggiungendo un valore massimo di assorbanza a 660 nm pari a 0,52. Al contrario, altri zuccheri come glucosio, saccarosio, ribosio e xilosio, non sono stati fermentati. Inoltre si è provato che l'aggiunta di accettori di elettroni, come ad esempio dimetilsolfossido (DMSO) o trimetilammina-n-ossido (TMAO), ha un effetto positivo sulla crescita del microrganismo: infatti sono stati raggiunti valori di assorbanza a 660 nm, rispettivamente di, 0,74 e 0,68, registrando anche una diminuzione del tempo di duplicazione cellulare. È stata dimostrata la capacità di *Rhodospirillum rubrum* di crescere in anaerobiosi sfruttando, oltre che fruttosio, anche malato, succinato e acetato, ma solo in presenza di un accettore di elettroni (DMSO). Infine i prodotti ottenuti dalla fermentazione del fruttosio risultano essere acetato, propionato, formato, succinato, alcune tracce di butirrato, CO_2 e H_2. Aggiungendo DMSO al fruttosio, gli unici prodotti al termine della fermentazione sono acetato e CO_2. In particolar modo, la concentrazione di acetato è risultata anche essere funzione del tempo: infatti il batterio ha dimostrato di utilizzare l'acetato prodotto come fonte di carbonio, una volta che la concentrazione di fruttosio non riesca più a sostentare la crescita. Infine il maggior prodotto di fermentazione durante la crescita su succinato più DMSO è risultata essere la CO_2 (Schultz and Weaver, 1982).

In seguito si è analizzata la possibilità di sintetizzare PHA come granuli citoplasmatici in condizione di eccesso di carbonio e di limitazione da parte di uno dei nutrienti necessari alla crescita (generalmente azoto o fosforo). In particolar modo ci si è soffermati sulla capacità di *Rhodospirillum rubrum* di produrre PHA in anaerobiosi e presenza di luce, in condizioni di azoto limitante. Particolare attenzione è stata posta anche alla cinetica di produzione del polimero. Infatti si è riscontrato che la produzione di polimero all'inizio della fase stazionaria e che all'incirca il 50% di acetato viene utilizzato per la crescita microbica e la formazione del polimero: nelle condizioni sperimentali in oggetto si è raggiunta una resa in PHA di 200 mg/L. Inoltre è stata dimostrata la possibilità di produrre un copolimero, fornendo come substrati differenti specie carboniose. Tale risultato ha anche provato che le polimerasi batteriche in realtà non sono strettamente specifiche: infatti tracce di β-idrossibutirrato, β-idrossivalerato e β-idrossiesanoato sono state rinvenute nel polimero sintetizzato, per ogni tipologia e per ogni concentrazione di substrato utilizzato. Oltretutto è stata anche notato che la resa cellulare subiva una diminuzione all'aumentare della concentrazione e della lunghezza della catena carboniosa del substrato utilizzato (Brandl et al., 1989)

Sempre in presenza di luce e in condizione di azoto limitante, si è studiato l'effetto del pH di fermentazione sulla produzione di PHA (Hashimoto et al., 1993). Dapprima in questo lavoro si è attestata la capacità di *Rhodospirillum rubrum* di produrre PHB solo fornendo acetato come substrato. In seguito si è esaminata la modalità secondo la quale il pH influisce sulla produzione di PHB. Da ciò è stato rinvenuto che le massime quantità di polimero ottenute sono 0,34 e 0,35 g_{PHB}/g_{CDW}, rispettivamente per valori di pH pari a 7,0 e 8,0. Inoltre la massima velocità di produzione di PHB è stata osservata per un pH pari a 7,0, quindi suggerendo che fosse la condizione più favorevole per la sintesi del polimero. Infine, una volta individuato il pH ottimale di fermentazione, è stata anche analizzata l'influenza della concentrazione di acetato sulla produzione di PHB. In generale la quantità di polimero prodotta è risultata essere tanto maggiore quanto maggiore la quantità di acetato. In particolar modo, la massima resa ottenuta è stata di 0,67 g_{PHB}/g_{CDW} (Hashimoto et al., 1993).

4.3 La crescita su CO e la *syngas fermentation*

Oltre alla crescita su substrati canonici, come già accennato in precedenza, *Rhodospirillum rubrum* ha attirato l'attenzione della ricerca grazie alla capacità di crescere su CO: per tale motivo è considerato uno dei microrganismi più adatti alla fermentazione del *syngas*. Infatti in condizioni di anaerobiosi, il batterio riesce ad utilizzare il CO come fonte di energia e di carbonio, in assenza e/o presenza di luce. Ciò accade perché, esponendo il batterio a tale gas, viene indotta la sintesi di alcuni enzimi, la cui azione sinergica fa avvenire reazione di *water-gas shift*. Inoltre parte della CO_2 prodotta viene assimilata come materiale cellulare, contemporaneamente si verifica un arricchimento in H_2 del *syngas* di partenza. In questo modo si riesce a sfruttare l'azione del batterio per la trasformazione della corrente gassosa in prodotti ad alto valore aggiunto (Do et al., 2007).

Già a partire dagli anni '90, alcuni studi si sono concentrati sulla capacità di *Rhodospirillum rubrum* di utilizzare il monossido di carbonio come substrato per la crescita. Ciò ha portato a comprendere che l'ossidazione del CO, in condizioni di anaerobiosi, avviene per la presenza di una CO-deidrogenasi (CODH), dove il nickel funge da cofattore. L'attività principale di questo enzima è quella di riuscire a convertire le singole unità carboniose, assieme all'acetil-CoA, in acetato o metano, riducendo contemporaneamente lo ione solfato. In particolar modo, in *Rhodospirillum rubrum*, la presenza di CO comporta la sintesi di alcuni enzimi, fra cui una Ni-CODH, una idrogenasi CO-tollerante e un *Fe-S associated enzyme*. Tali enzimi sono tutti coinvolti nell'ossidazione del CO. Infine è stato anche dimostrato che l'eventuale assenza di Ni nel medium di coltura comporta una netta diminuzione della capacità di crescita del batterio, sottolineandone l'importanza nel processo di ossidazione del CO (Kerby et al., 1995).

Oltre alla crescita su CO, si è cercato di capire quale fosse il ruolo che l'intensità luminosa ricopre durante la crescita di *Rhodospirillum rubrum*. Infatti, essendo un microrganismo fotosintetico, l'intensità luminosa può essere considerata un vero e proprio substrato per la crescita. Ciò accade perché, per questa classe di batteri, la generazione di ATP avviene tramite fosforilazione fotochimica di ADP. Quindi il fenomeno può essere descritto tramite l'equazione di Monod, dove la velocità di crescita è dipendente dalla intensità luminosa. Bisogna però specificare che una tale approssimazione è valida solo nel momento in cui tutta la coltura viene investita mediamente dalla stessa intensità luminosa. Ciò viene ottenuto tramite una opportuna agitazione del sistema, in maniera tale che la luce incidente non venga filtrata dalla elevata densità cellulare. La relazione che descrive il fenomeno è mostrata nella equazione (4.1) (Klasson et al., 1993).

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} I}{I + K_S}. \tag{4.1}$$

I timori crescenti per i possibili danni ambientali causati dall'attività antropica e la ricerca di forme alternative di energia staccate da quelle fossili, hanno spinto la ricerca verso la produzione di *biofuel*. Un possibile substrato utilizzabile per questo processo è il *syngas* derivante dalla gassificazione di biomasse. I *purple non-sulfur bacteria* sono capaci di produrre H_2 tramite la reazione di *water-gas shift*, con conseguente ossidazione di CO. In particolar modo, in condizioni di anaerobiosi ciò avviene tramite, si basa la combinazione di due reazioni complementari. Esse sono:

$$CO + H_2O + 2Fd_{ox} \rightarrow CO_2 + 2Fd_{red} + 2e^- + 2H^+ \quad (4.2)$$

$$H^+ + 2e^- + 2Fd_{red} \rightarrow H_2 + 2Fd_{ox} \quad (4.3)$$

Fra i *purple non-sulfur bacteria*, *Rhodospirillum rubrum* è considerato il microrganismo più adatto per tale scopo, sia per le alte velocità di utilizzo del CO che per la elevata resa in H_2 (Najafpour et al., 2004).

In questa ottica si inserisce uno studio riguardante l'effetto della concentrazione di acetato sulla crescita di *Rhodospirillum rubrum* su *syngas* e la produzione di H_2 in presenza di luce. Si è dimostrato come una concentrazione di acetato maggiore di 2 g/L non comportasse un aumento della densità cellulare. Inoltre è stata anche provata una diminuzione della conversione di acetato dal 73 al 23% passando da una concentrazione di 3 g/L ad una di 1,5 g/L, quindi testimoniando un fenomeno di inibizione da substrato. Inoltre, a conferma di ciò, è stato anche provato come la concentrazione di acetato influisca sulla conversione di CO. Infatti la conversione di quest'ultimo, per concentrazione di acetato pari a 1-2 g/L, è risultata essere del 90 e 97%, rispettivamente. Per una concentrazione di acetato pari a 3 g/L, la conversione di CO è precipitata al 30%. A conferma di ciò, anche la produzione di H_2 è risultata essere massima quando la concentrazione di acetato utilizzata risultava essere compresa fra 1 e 2 g/L. In particolar modo, il miglior risultato si è avuto con una concentrazione di acetato pari a 1,5 g/L, arrivando a produrre 0,047 mmol/ml_{MEDIUM} di H_2. Infine sono state effettuate anche alcune prove per individuare i valori dei parametri impiegati nei modelli di Monod e di Andrews, ciò per sottolineare ulteriormente come la crescita su acetato sia caratterizzata da inibizione (Najafpour et al., 2004).

Oltre che per la produzione di H_2, la crescita di *Rhodospirillum rubrum* su *syngas* può essere utilizzata per la sintesi di PHA. In questa ottica si inserisce uno studio riguardante esattamente la crescita di *Rhodospirillum rubrum* su *syngas* per la produzione di H_2 e poliidrossialcanoati (Do et al., 2007). Nelle condizioni in cui è stato effettuato l'esperimento si è dimostrata la possibilità di utilizzare il *syngas* come substrato per la crescita. Si è registrata la produzione di un polimero accumulato fino al 38% del peso secco delle cellule. Inoltre il copolimero sintetizzato è risultato essere composto per l'86% da β-idrossibutirrato e per il 14% da β-idrossivalerato. Oltretutto è stata anche dimostrata la capacità del batterio di abbattere la quantità di CO nella corrente gassosa, fino al di sotto della concentrazione considerata tossica (0,9 nM). Infine è stato anche confermato un aspetto già noto, ovvero quello relativo alla limitazione nel trasferimento di materia gas-liquido del CO, che se reso più agevole, aumenterebbe sensibilmente le rese di fermentazione.

Una volta appurate le proprietà di *Rhodospirillum rubrum*, particolare attenzione è stata posta sulla comprensione dei percorsi metabolici che il batterio affronta durante la crescita su *syngas*. Il batterio riesce ad incorporare parte dell'anidride carbonica prodotta, sviluppando materiale cellulare tramite il ciclo di Calvin-Benson-Bassham (CBB). A seconda delle condizioni di crescita, tramite questo ciclo si possono intraprendere differenti percorsi metabolici. Infatti in condizioni fotoautotrofe si occupa di fissare la CO_2, utilizzata come fonte di carbonio, all'interno del materiale cellulare. Invece in condizioni fotoeterotrofe, il ciclo CBB svolge un ruolo importante nel bilanciare il potenziale redox. A questo proposito è stato dedicato uno studio in cui è stato confermato che la CO_2 nel *syngas* viene effettivamente inglobata nel materiale cellulare (Revelles et al., 2016). Tramite una analisi al ^{13}C si è dimostrato, che il CO viene direttamente assimilato nella biomassa (e nel biopolimero) dopo essere stato ossidato a CO_2. Inoltre è stato provato che, in assenza di luce, il batterio non è

capace di crescere in mancanza di *syngas*, nonostante siano presenti altre fonti di carbonio (acetato, estratto di lievito). Quindi tutto ciò suggerisce che *Rhodospirillum rubrum* è capace di utilizzare il CO come fonte di energia per la crescita al buio. Grazie alla ossidazione del CO e alla contemporanea riduzione di protoni, si ha come risultato la produzione di H_2 e la generazione di un gradiente protonico utilizzato per la sintesi di ATP, e quindi di energia. Oltretutto è stato anche dimostrato che la luce, in accordo con precedenti studi, ha un effetto positivo sulla crescita del batterio. Inoltre si è analizzato l'effetto di differenti substrati organici (malato e acetato) sulla crescita del batterio e sulla produzione di PHA. *Rhodospirillum rubrum* ha una maggiore velocità di crescita quando il malato viene fornito come substrato piuttosto che acetato, ma che nel primo caso, vi è una minima produzione di polimero. Inoltre la produzione di PHA è risultata non essere influenzata dalla presenza/assenza di luce, testimoniando la completa autonomia fra il processo fotosintetico e quello di sintesi del biopolimero. Infine, sempre nello stesso studio, sono indicati i possibili percorsi metabolici che portano dalla assimilazione del CO fino alla produzione del biopolimero, in presenza di acetato e *syngas*. Oltretutto, sempre dallo stesso gruppo di ricerca proviene il protocollo che detta le linee guida per la produzione di PHA a partire da *syngas*, ed utilizzato in larga parte in questo lavoro di tesi (Revelles et al., 2015).

Tabella 4.1: Termini di paragone in letteratura.

% PHB	**OD**	**Fonte di carbonio**	**Condizioni operative**	***Reference***
25,5	0,7	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + fruttosio	Anaerobiosi, buio, fed-batch	(Heinrich et al., 2015)
7,1	0,6	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + fruttosio	Anaerobiosi, buio, fed-batch	(Heinrich et al., 2016)
-	0,64	CO 25%	Anaerobiosi, buio	(Kerby et al., 1995)
	1,15	CO 50%		
38	1	*Syngas* (56,0% N_2, 17,2% CO, 16,3% CO_2, 8,8% H_2)	Anaerobiosi, luce, fed-batch	(Do et al., 2007)
		Fruttosio + DMSO	Anaerobiosi, buio	(Schultz and Weaver, 1982)
	0,8	Acetato di sodio + DMSO		
	0,4			
	0,5	Succinato di sodio + DMSO		
	0,6			
		Malato di sodio + DMSO		
19,2	2,1	Acetato di sodio (30 mM)	Anaerobiosi, luce	(Brandl et al., 1989)

Capitolo 5
Materiali e metodi

5.1 Introduzione

In questo capitolo si elencheranno i materiali ed i metodi utilizzati per sviluppare le esperienze in questo lavoro di tesi.

5.2 Materiali

5.2.1 Composizione g/L terreno di coltura ATCC 11170.

Tabella 5.1: Composizione terreno di coltura ATCC 11170.

Reagente	Concentrazione, g/L
K_2HPO_4	1,0
$MgSO_4$	0,5
Estratto di lievito	10,0
Agar (se necessario)	20,0

5.2.2 Composizione g/L terreno di coltura *SYN MEDIUM*.

Tabella 5.2: Composizione terreno di coltura *SYN MEDIUM*.

Reagente	Concentrazione, g/L
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,25
CaCl x $2H_2O$	0,132
NH_4Cl	1
MOPS	2,1
$NiCl_2$ (stock 0,1 M)	200 µL/L
Iron chelated molybdenum solution	10 mL/L

Per preparare le soluzioni, i reagenti vanno aggiunti direttamente in un becher, contenente circa il 70% del volume finale di acqua deionizzata. Il tutto deve essere costantemente agitato.

Per evitare l'eventuale precipitazione di alcuni reagenti, essi sono da aggiungere nell'ordine indicato nelle tabelle, accertandosi prima di passare al successivo, che il precedente si sia completamente disciolto. Una volta terminata l'aggiunta dei reagenti, si passa alla regolazione del pH, assicurandosi che sia in un intervallo compreso fra 7,0 e 7,2. Infine si portano a volume le soluzioni.

5.2.3 Reagenti da inserire in bottiglia per la preparazione dei campioni

Tabella 5.3: Quantità di reagenti da inserire in bottiglia.

Reagente	Quantità
SYN MEDIUM	20 mL
Biotina (stock 100x, 200 µg/L)	200 µL
Estratto di lievito (stock 20 g/L)	1 mL
Buffer fosfato (stock 1,91 M)	100 µL
$C_2H_3NaO_2$ (stock 1 M)	200 µL
$NaHCO_3$ (stock 0,5 M)	500 µL
Na_2S x $9H_2O$ (stock 1%)	200 µL

[N.B.] Durante la preparazione del campione, si deve prestare attenzione ad inoculare la coltura subito dopo l'aggiunta della bicarbonato di sodio. Il Na_2S deve essere aggiunto come ultimo componente.

5.2.4 Stock di reagenti

Tabella 5.4: Composizione della soluzione "*iron chelated molybdenum"* (pH 7,1).

Reagente	Concentrazione, g/L
H_3BO_3	0,28
Na_2EDTA	2
Citrato Ferrico	0,4
Na_2MoO_4	0,1

Tabella 5.5: Composizione della soluzione *buffer* fosfato (1,91 M, pH 7,0).

Reagente	Concentrazione, g/L
K_2HPO_4	161,43
KH_2PO_4	126,09

[N.B.] Gli stock di biotina, Na_2S e $NaHCO_3$ sono da conservare in frigorifero, avendo cura che sia la biotina che il Na_2S siano al buio, a causa della loro fotosensibilità.

5.3 Metodi

5.3.1 Degassamento e sterilizzazione

Le condizioni di anaerobiosi di questo lavoro di tesi richiedono che tutte le soluzioni, prima di essere utilizzate, debbano essere degassate: ciò può essere ottenuto facendo flussare azoto per circa 30 minuti ogni 20 mL circa di soluzione (Fig. 5.1). Inoltre si richiede una condizione di sterilità dei materiali utilizzati e dei luoghi in cui si svolgono le attività. Per questo motivo tutte le operazioni a contatto diretto con il campione si svolgono all'interno di una cappa a flusso laminare *biohazard* di tipo 2, quindi idonea alla manipolazione di patogeni a basso/medio rischio biologico. I materiali utilizzati devono essere sterilizzati preventivamente in autoclave per 30 minuti a 121°C (Fig. 5.2). Alcune soluzioni di sostanze particolarmente sensibili alla degradazione termica ($NaHCO_3$, Na_2S, $C_2H_3NaO_2$, biotina) sono da sterilizzare tramite filtrazione, mediante filtro da 0,2 µm circa.

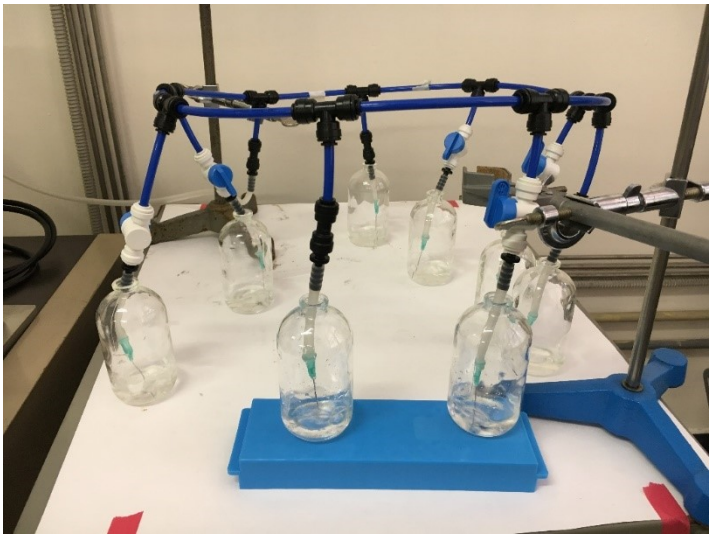

Figura 5.1: Stazione di degassaggio.

Figura 5.2: Autoclave da laboratorio.

5.3.2 Preparazione colture

Una volta terminata la preparazione del materiale, si può passare all'allestimento delle colture. L'ordine di inserimento dei reagenti è già stato indicato precedentemente (Tab. 5.3). I microrganismi sono inoculati in maniera tale da avere una densità ottica a 660 nm (OD_{660}) pari a 0,05. Per ottenere ciò, una volta misurata la densità ottica della coltura di partenza, se ne può facilmente calcolare il volume da prelevare e trasferire. Ciò è ottenuto poiché la densità ottica è una misura indiretta della concentrazione microbica e quindi può essere utilizzata come tale. Allora si ha:

$$V_i = \frac{C_f V_f}{C_i} = \frac{0{,}05 \times 20mL}{OD_0}. \tag{5.1}$$

Dopo aver trasferito la coltura, si passa all'inserimento del gas all'interno della stessa. A seconda che la prova sia da considerarsi *batch* o *fed-batch*, cambia il modo in cui il gas viene fornito. Infatti nel primo caso si inserisce il volume di gas desiderato tramite una siringa dotata di apposito filtro e valvola a tre vie. La valvola è necessaria per poter regolare e indirizzare il flusso proveniente dalla linea gas (collegata ad una bombola 50% N_2, 50% CO). Considerando la composizione del gas di partenza e lo spazio di testa in bottiglia (100 mL), per poter raggiungere la concentrazione di CO desiderata (espressa in percentuale rispetto allo spazio di testa) si dovrà inserire un volume di gas pari al doppio di quello nominale. Ad esempio volendo creare una atmosfera al 30% di CO, si dovranno inserire in bottiglia 60 ml di miscela di gas. Invece nel secondo caso, ovvero passando alla configurazione *fed-batch* al 50% di CO, ci si deve dapprima assicurare che in bottiglia ci sia una atmosfera satura di gas. Per fare ciò si fa flussare il gas proveniente dalla linea per 1,5 minuti (Fig. 5.3): a tale tempo corrispondono all'incirca 15 ricambi di gas in bottiglia (lavaggi). Infatti nelle condizioni di processo, un singolo lavaggio si ottiene in circa 10 secondi. Essendo una configurazione *fed-*

batch, l'operazione deve essere effettuata ad intervalli regolari di tempo (in questo caso 24 ore). Una volta terminato l'inserimento del gas nelle bottiglie, le colture microbiche vengono coltivate (Fig. 5.4) all'interno di un incubatore (Fig. 5.5) a 30°C e 200 rpm.

[N.B] A causa delle caratteristiche chimico-fisiche del monossido di carbonio, tutte operazioni a contatto diretto con il gas sono svolte utilizzando una maschera a pieno facciale con filtro e rilevatore portatile di concentrazione di gas con allarme acustico (Fig. 5.6).

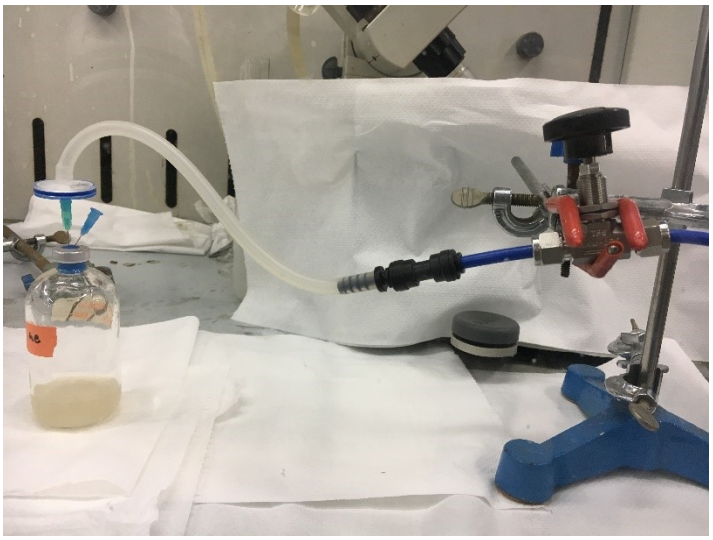

Figura 5.3: Stazione di rifornimento gas.

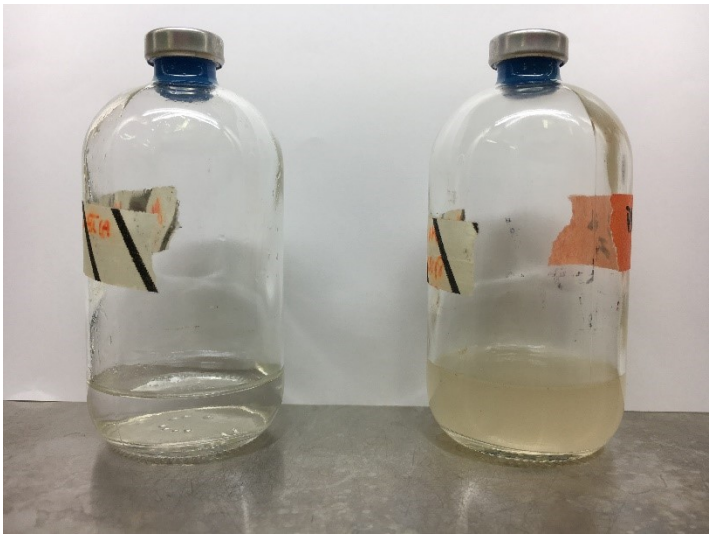

Figura 5.4: Bottiglie contenenti terreno sterile (sinistra) e coltura microbica (destra).

Figura 5.5: Incubatore da laboratorio.

Figura 5.6: Rilevatore portatile di concentrazione di gas con allarme acustico (sinistra) e maschera a pieno facciale con filtro (destra).

5.3.3 Isolamento su terreno solido

Un modo per poter essere sicuri di lavorare con il solo microrganismo prescelto (*Rhodospirillum rubrum* in questo caso) è di procedere all'isolamento della coltura microbica su terreno solido. Per fare ciò si riscalda del terreno con agar aggiunto preventivamente sterilizzato, in maniera tale da liquefarlo nuovamente. Dopo di ciò si pone una certa quantità di terreno liquefatto all'interno di una piastra di Petri (Fig.5.7), coprendone l'intera superficie, e se ne attende la solidificazione. Successivamente si preleva un campione di coltura, lo si pone sulla superficie solida e, tramite una bacchetta sterile, si disseminano i microrganismi. Infine si chiude la piastra e la si pone in un incubatore a 30°C e 200 rpm.

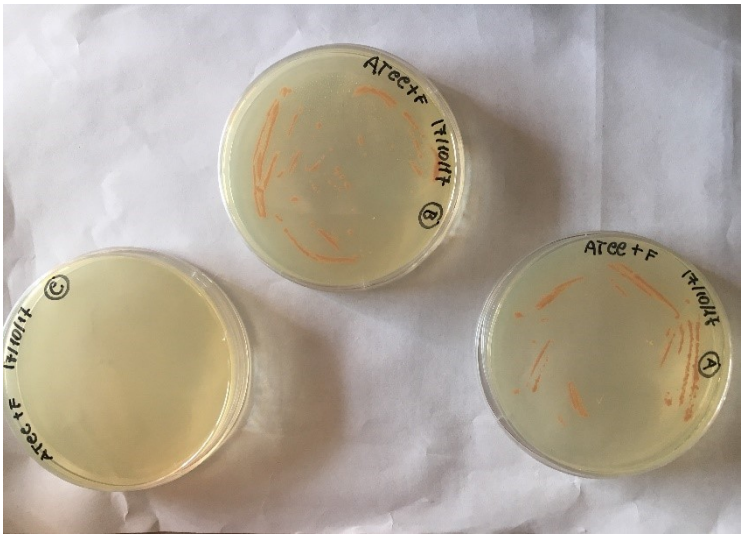

Figura 5.7: Isolamento su terreno solido con piastra di Petri.

5.3.4 Curve di crescita microbica

La crescita microbica può essere monitorata prelevando, ad intervalli regolari di tempo, un campione di coltura, analizzandone la densità ottica ad una certa lunghezza d'onda tramite uno spettrofotometro UV-visibile (Fig. 5.8). In questo lavoro di tesi la rilevazione della densità ottica è stata effettuata ogni 24 ore ad una lunghezza d'onda di 660 nm. Terminate le misure di densità ottica, la curva di crescita microbica si ottiene grazie ad un grafico che riporta sull'asse delle ascisse il tempo e sull'asse delle ordinate il valore di OD_{660} tal quale, oppure il logaritmo del rapporto fra la popolazione microbica al tempo "t" e quella al tempo "t_0" ($\ln(X/X_0)$). Una curva di questo tipo rende più agevole l'individuazione delle differenti fasi di crescita microbica.

Figura 5.8: Spettrofotometro UV-visibile.

5.3.5 Calcolo dei parametri di crescita

I parametri di crescita (velocità massima di crescita, numero di generazioni, tempo di generazione, costante della velocità di crescita) sono utili alla caratterizzazione del microrganismo. La velocità massima di crescita può essere facilmente ricavata tramite il calcolo della pendenza del tratto di curva di crescita microbica relativa alla fase esponenziale. Una volta determinata la velocità massima di crescita, gli altri parametri direttamente collegati ad essa possono essere facilmente calcolati. Uno di essi, g, rappresenta il tempo di generazione della popolazione cellulare e viene calcolato come segue:

$$g = \frac{0{,}301}{\mu_{MAX}} \ . \tag{5.2}$$

Una volta calcolato il tempo di generazione, si può passare direttamente al calcolo del numero di generazioni (n) compiute durante il periodo di crescita esponenziale (t, calcolato in ore):

$$n = \frac{t}{g} \ . \tag{5.3}$$

Infine un altro parametro collegato alla velocità di crescita è la costante della velocità di crescita (k, h^{-1}): tale valore rappresenta il numero di generazioni effettuate in un'unità di tempo da una coltura in fase di crescita esponenziale, e viene determinato da:

$$k = \frac{0{,}693}{g} \ . \tag{5.4}$$

5.3.6 Analisi del gas di testa al gascromatografo (GC)

Il gas di testa può essere analizzato tramite un gascromatografo che restituisce le percentuali molari del gas immesso in colonna. Il campione di gas viene prelevato con una *sample bag* tramite un ago, in cui preventivamente viene fatto il vuoto utilizzando una apposita pompa (Fig. 5.9), per evitare che la prova sia contaminata da residui gassosi precedenti. Nel caso si consideri una coltura in modalità *batch*, l'analisi al GC viene effettuata una volta raggiunta la fase di declino. Invece per una coltura in modalità *fed-batch*, l'analisi si effettua ad intervalli di tempo regolari.

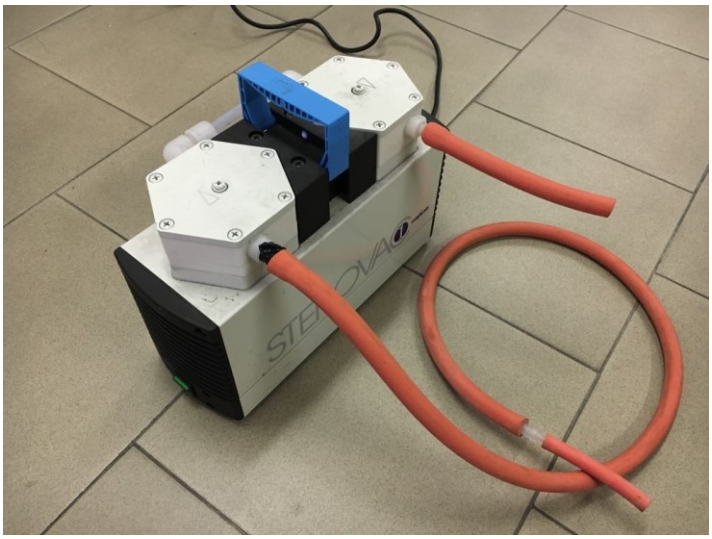

Figura 5.9: Pompa a vuoto. Capo lungo di aspirazione, capo corto di mandata.

5.3.7 Misura della pressione nei campioni

La misura della pressione dei campioni si effettua tramite un manometro (Fig. 5.10) fissato su di un supporto, collegato ad un ago da inserire all'interno della bottiglia contenente la coltura microbica. In particolar modo, per quanto riguarda le prove *fed-batch*, la pressione viene misurata sia subito prima che subito dopo il reinserimento del gas. Ripetendo l'operazione per ogni campione, si è notato che, con la metodologia utilizzata, si sono raggiunti valori di pressione pressoché simili. Perciò si sono potuti stabilire due valori di pressione media rappresentativi del sistema, sia prima che dopo il reinserimento del gas. Inoltre conoscendo tali valori, si può ottenere un dato preliminare sul volume di gas prodotto giornalmente dalla coltura.

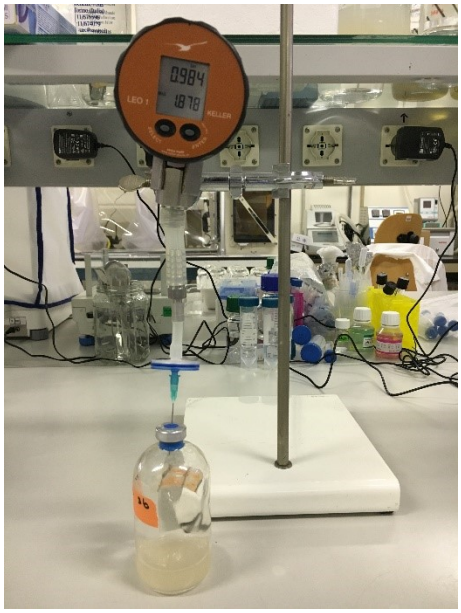

Figura 5.10: Sistema per la misura della pressione.

5.3.8 Misura del volume di gas prodotto in modalità *fed-batch*

Il dato relativo alla produzione di gas in modalità *fed-batch* può essere ottenuto sia da un punto di vista teorico che pratico. Teoricamente esso può essere calcolato ipotizzando che nello spazio di testa in bottiglia vi sia una miscela di gas perfetti. In questo modo, misurando la differenza di pressione media del sistema e la variazione del numero di moli si può facilmente risalire alla differenza di volume del sistema tra le condizioni iniziali e finali, che corrisponde al volume del gas prodotto. Dal punto di vista pratico, il dato di produzione può essere ottenuto misurando lo spostamento di liquido causato dal gas nelle condizioni iniziali e finali della coltura. Ciò può essere facilmente ottenuto tramite la costruzione di un semplice flussometro (Fig. 5.11).

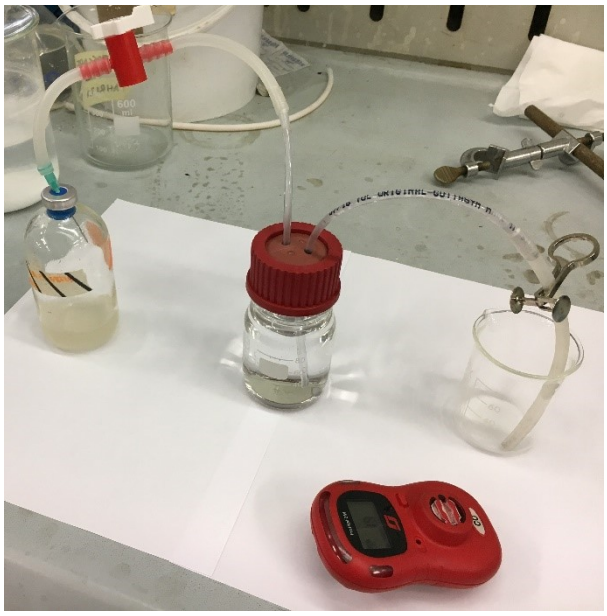

Figura 5.11: Sistema per la misura del volume di liquido spostato dal gas in pressione.

5.3.9 Quantificazione PHB

Tramite l'analisi per la quantificazione del PHB si può risalire alla quantità di polimero presente nella coltura microbica, in maniera tale da poterne poi calcolare sia la massa che la percentuale rispetto al peso secco della intera biomassa. Dapprima si centrifuga la coltura per 15 minuti a 4000 rpm (Fig. 5.12), in maniera tale da suddividere il terreno di coltura esausto dalla biomassa. A questo punto si indirizza il *medium* esausto ad una successiva analisi (pH, quantità di acetato), mentre la biomassa viene essiccata per 30 minuti a 90°C. Quindi si fa reagire la biomassa con 1 ml di H_2SO_4 al 96% per 30 minuti a 90°C (Fig. 5.13). Tramite questo passaggio l'ambiente estremamente acido scioglie le membrane microbiche e idrolizza il PHB in acido crotonico. Tutto ciò è necessario poiché la quantità di acido crotonico (e quindi di PHB) viene determinata tramite analisi HPLC, dove il composto di interesse presenta un picco di assorbanza a 210 nm dopo un tempo di eluizione di circa 23 minuti. Per poter effettuare l'analisi bisogna accertarsi che il campione abbia un pH maggiore di 1: perciò vanno effettuate due diluizione successive. Nella prima si diluisce la soluzione di partenza in 4 mL di soluzione 5 mM di H_2SO_4. Successivamente si prelevano 200 µL dalla soluzione intermedia e li si inserisce in ulteriori 5 mL di soluzione 5 mM di H_2SO_4. Così facendo si è sicuri che il pH del campione rispetti le specifiche richieste. Quindi si preparano i *vials* da analizzare, filtrando la soluzione finale tramite filtri da 0,2 µm in PTFE, poiché più resistenti

all'ambiente acido. Il *report* finale della analisi fornisce il valore dell'area del picco relativa al componente desiderato. Tramite una apposita retta di taratura, tale valore viene convertito in una concentrazione espressa in mg/mL di PHB.

Figura 5.12: Centrifuga da laboratorio.

Figura 5.13: Particolare della procedura per la quantificazione del PHB.

5.3.10 Estrazione PHB

Dapprima la biomassa si centrifuga per 15 minuti a 4000 rpm, analogamente alla procedura di quantificazione per la quantificazione del PHB. In seguito la biomassa viene pretrattata a 120 °C per 30 minuti. A questo punto si centrifuga ancora per 5 minuti a 4000 rpm. In seguito si aggiungono 1 mL di H_20 deionizzata e 1 mL di cloroformio e si fa reagire la biomassa per 2 ore a 60°C. In questo modo il solvente riesce a solubilizzare il PHB. Al termine della reazione si effettua una ultima centrifuga (5 minuti, 4000 rpm), con lo scopo di separare la fase organica, contenente solvente e PHB, da membrane cellulari e fase acquosa (Fig. 5.14). Una volta separate le tre fasi, si preleva la fase organica e la si diluisce con 5 volumi di esano (in

questo caso 5 mL). L'esano ha la funzione di antisolvente: infatti permette la solubilizzazione e la precipitazione del solo PHB. Si refrigera la soluzione per 24 ore, al termine delle quali la si centrifuga una prima volta per 5 minuti a 4000 rpm. Si rimuove l'esano precedentemente aggiunto, e se ne aggiunge 1 mL. A questo punto si centrifuga nuovamente (5 minuti, 4000 rpm), si rimuove l'esano e si aggiunge 1 mL di cloroformio. A questo punto si lascia evaporare il solvente. Questa serie di passaggi viene effettuata per garantire una buona purezza del PHB estratto, data la possibile contaminazione da parte di residui microbici.

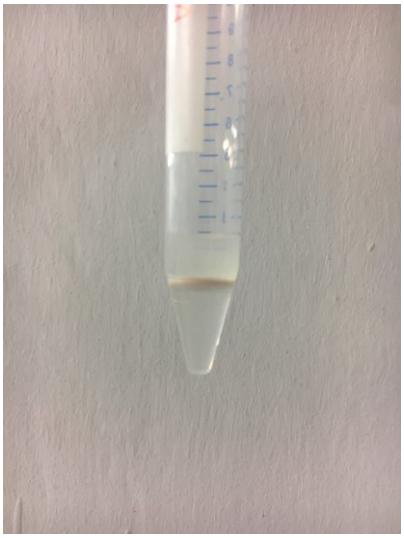

Figura 5.14: Separazione di fase dopo la reazione con cloroformio e successiva centrifuga: fase acquosa (in alto), membrane cellulare (nel mezzo), fase organica (in basso).

5.3.11 Analisi del terreno di coltura

Il terreno di coltura esausto e separato dalla biomassa per centrifugazione, va incontro ad un ulteriore analisi. In questo modo se ne possono misurare sia il pH, tramite pH-metro (Fig. 5.15) che il contenuto residuo di acetato di sodio. Quest'ultimo si determina con una analisi HPLC, dove si osserverà un picco dopo un tempo di eluizione di circa 13 minuti. Analogamente a quanto fatto per il PHB, grazie ad una apposita retta di taratura si può risalire alla concentrazione di acetato di sodio residuo in soluzione, conoscendo l'area del picco nel *report* finale della analisi.

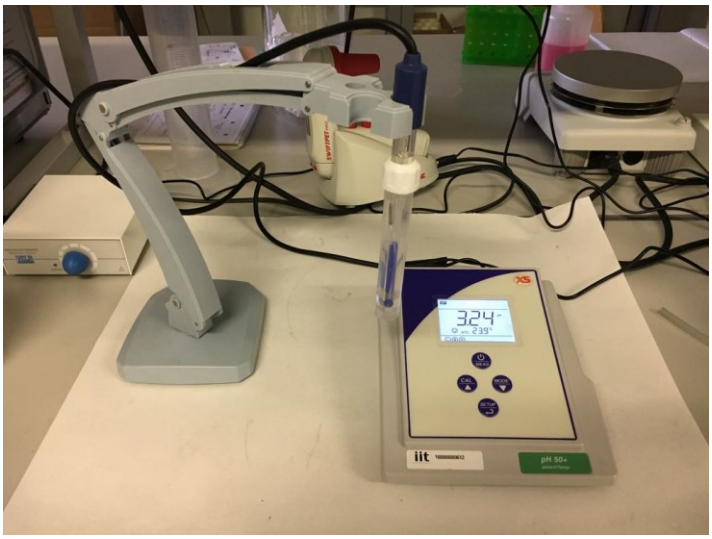

Figura 5.15: pH-metro.

5.3.12 Rette di taratura

Le rette di taratura vengono utilizzate per poter correlare fra loro grandezze che non sono direttamente collegate fra di loro o per sopperire alla mancanza di eventuali relazioni matematiche che possano fare da ponte di collegamento fra le suddette grandezze.

5.3.12.1 Area picco HPLC – Concentrazione PHB

Tale retta viene utilizzata per correlare direttamente l'area del picco nel *report* finale della analisi HPLC con la concentrazione di PHB in mg/mL. Essa viene ottenuta analizzando dei campioni di soluzione di PHB puro a concentrazioni differenti, in maniera tale da essere certi che l'unico picco presente nel cromatogramma sia quello relativo al componente di interesse. Le concentrazioni delle soluzioni e dei valori di area del picco utilizzati per realizzare la retta di taratura sono indicati in tabella 5.6. Si riporta il grafico della retta di taratura (Fig. 5.16)

Tabella 5.6: Valori utilizzati per la retta di taratura area picco HPLC – Concentrazione PHB.

Concentrazione soluzione, mg/mL	Area picco
0,08	8462631
0,04	4161808
0,02	2051654
0,01	997067
0,005	486560
0,0025	230247
0,00125	102237
0,000625	48109

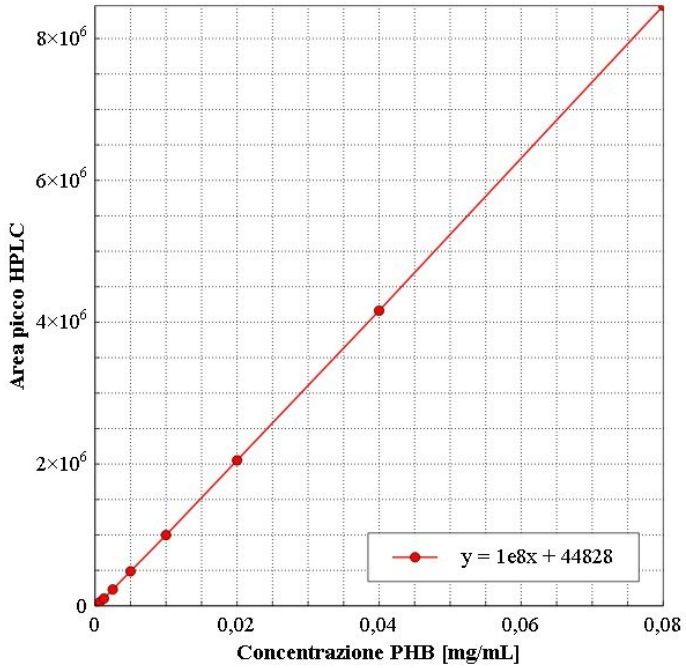

Figura 5.16: Retta di taratura area picco HPLC – Concentrazione PHB. L'equazione della retta è riportata direttamente sul grafico. Il valore di R^2 è pari a 0,9999.

5.3.12.2 Area picco HPLC – Concentrazione acetato di sodio

Una procedura analoga alla precedente viene seguita anche per determinare la retta di taratura che correla la concentrazione di acetato di sodio (espressa in mM) al valore dell'area del picco nel *report* finale della analisi HPLC. Le concentrazioni delle soluzioni e dei relativi valori di area del picco utilizzati per realizzare la retta di taratura sono indicati in tabella 5.7. Inoltre si riporta il grafico della retta di taratura ottenuta (Fig. 5.17).

Tabella 5.7: Valori utilizzati per la retta di taratura area picco HPLC – Concentrazione acetato di sodio.

Concentrazione soluzione, mM	Area picco
5	10608
7,5	15945
15	33372
45	90194

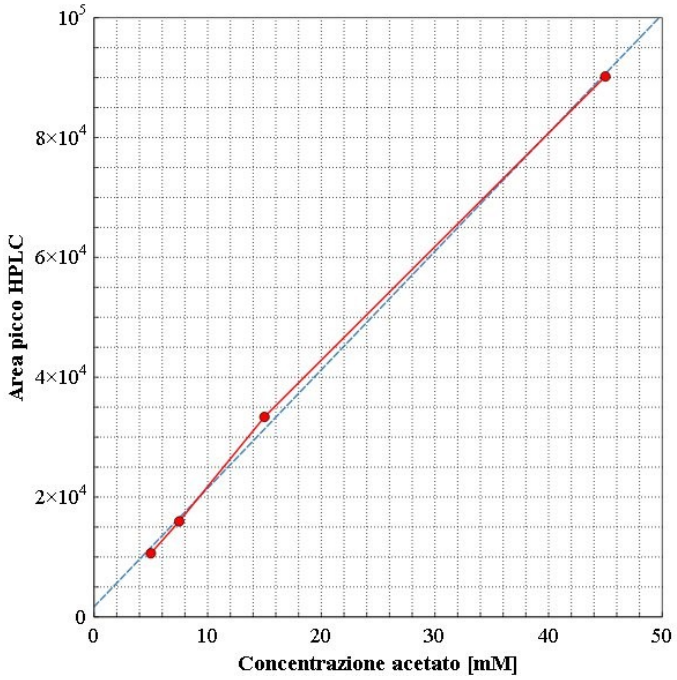

Figura 5.17: Retta di taratura area picco HPLC – Concentrazione acetato di sodio. L'equazione della retta è riportata direttamente sul grafico. Il valore di R^2 è pari a 0,9986.

5.3.12.3 OD_{660} – peso secco per *Rhodospirillum rubrum*

La retta di taratura che correla il valore di OD_{660} alla massa presente nel campione di *Rhodospirillum rubrum* permette di conoscere la quantità di biomassa senza l'utilizzo di una bilancia, basandosi su una misura indiretta. In questo modo si riesce ad avere una misura più precisa, che non sia inficiata dall'errore legato allo strumento. Per fare ciò si allestisce una coltura di 4 prove in triplicato, dove ad intervalli regolari di tempo (in questo caso ogni 24 ore) si effettua la lettura di OD_{660}. Dopo la lettura della densità ottica, una prova (e quindi tre campioni) viene centrifugata, separando la biomassa dal terreno di coltura. In seguito si lasciano essiccare i campioni per 24 ore a 90°C per eliminare ogni traccia di umidità. Infine si può pesare la biomassa. Ripetendo tale operazione per tutte le prove si ottengono i dati necessari alla creazione della retta di taratura. I valori di OD_{660} e dei relativi valori di peso utilizzati per realizzare la retta di taratura sono indicati nelle tabelle 5.8 e 5.9. Inoltre si riporta il grafico della retta di taratura ottenuta (Fig. 5.18).

Tabella 5.8: Valori di OD_{660} utilizzati per la retta di taratura OD_{660} – peso secco.

Campione	Media	Deviazione standard	Errore, %
0	0,05	0,00	0
1	0,62	0,03	4,45%
2	1,24	0,05	4,05%
3	1,67	0,09	5,18%
4	2,34	0,13	5,77%

Tabella 5.9: Valori di peso secco utilizzati per la retta di taratura OD_{660} – peso secco.

Campione	Media, mg	Deviazione standard	Errore, %
0	0,00	0,00	0,00%
1	4,47	0,60	13,49%
2	9,97	0,72	7,26%
3	14,07	1,10	7,80%
4	17,77	0,59	3,30%

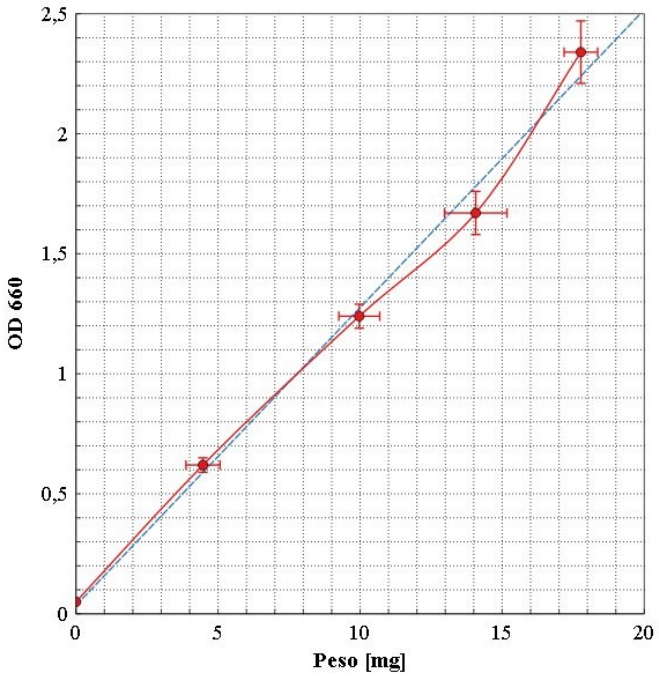

Figura 5.18: Retta di taratura OD_{660} – Peso secco. L'equazione della retta è riportata direttamente sul grafico. Il valore di R^2 è pari a 0,9923.

NOTA: L'errore sulla misura viene determinato tramite il rapporto fra la deviazione standard e la media della misura.

Capitolo 6
Preadattamento di *Rhodospirillum rubrum*

6.1 Introduzione

La fase di preadattamento ha come scopo quello di studiare il comportamento della coltura, variando determinate parametri operativi, come ad esempio pH, temperatura o concentrazione di substrato. Inoltre, tale fase ha lo scopo di ricercare le migliori condizioni operative da utilizzare poi in una successiva fermentazione in reattore. In particolar modo, lavorando con un sistema biologico, variare parametri come il pH o la temperatura potrebbe comportare una fuoriuscita del sistema dalle condizioni ottimali di crescita: perciò in questo caso l'attenzione è stata focalizzata sugli effetti della variazione della concentrazione di CO, espressa come percentuale volumica nello spazio di testa delle bottiglie utilizzate durante le prove.

Precisamente il lavoro esposto nel presente capitolo si focalizza principalmente sulla analisi di tre colture microbiche adattate rispettivamente a concentrazioni di CO pari al 30%, 40% e 50%. La coltura adattata viene analizzata sia alla stessa concentrazione di adattamento, che ad una percentuale variata del ±10% rispetto al valore di adattamento.

Tutte le prove sono effettuate in triplicato.

6.2 Analisi della densità ottica

Per quanto riguarda l'analisi della densità ottica e delle relative curve di crescita, l'andamento generalmente mostra che, per qualsiasi concentrazione di CO utilizzata, la densità ottica raggiunge il valore massimo relativo dopo circa 72 ore di fermentazione. Dopo questa fase si osserva una diminuzione dell'assorbanza, indicando che la coltura microbica ha quindi raggiunto la fase di declino.

Aumentando la concentrazione di CO a cui sono sottoposte le colture, si osserva che i valori di densità ottica registrano una crescita graduale. Il massimo valore assoluto di densità ottica raggiunto è pari a 0,65 (Fig. 6.9), ottenuto con una coltura adattata ad una atmosfera al 50% di CO e sottoposta ad un valore pari al 60% di CO. Ciò dimostra quanto il microrganismo, nonostante la natura inibitoria del substrato, sia capace di metabolizzare il CO anche a concentrazioni elevate, quando invece altre specie microbiche ne soffrono la tossicità. In effetti è stato dimostrato che *Rhodospirillum rubrum* è capace di crescere anche in una atmosfera composta per il 100% da CO (Kerby et al., 1995).

Alcuni termini di confronto con il presente studio possono essere trovati in letteratura (Tab. 6.1).

Tabella 6.1: Termini di paragone in letteratura.

OD	Fonte di carbonio	Condizioni operative	*Reference*
0,7	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + fruttosio	Anaerobiosi, buio	(Heinrich et al., 2015)
0,6	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + fruttosio	Anaerobiosi, buio	(Heinrich et al., 2016)
0,64	CO 25%	Anaerobiosi, buio	(Kerby et al., 1995)
1,15	CO 50%		
1	*Syngas* (56,0% N_2, 17,2% CO, 16,3% CO_2, 8,8% H_2)	Anaerobiosi, luce	(Do et al., 2007)
0,8	Fruttosio + DMSO	Anaerobiosi, buio	(Schultz and Weaver, 1982)
0,4	Acetato di sodio + DMSO		
0,5	Succinato di sodio + DMSO		
0,6	Malato di sodio + DMSO		
2,1	Acetato di sodio	Anaerobiosi, luce	(Brandl et al., 1989)
0,65	Acetato di sodio + CO 60%	Anaerobiosi, buio	Presente lavoro

In questa fase preliminare di preadattamento (Fig. da 6.1 a 6.9), considerando concentrazioni di CO simili a quelle in letteratura, si sono raggiunti valori di OD_{660} di circa 0,29 e 0,60, rispettivamente per percentuali di CO pari al 20% e 50%. Una così forte differenza fra i valori registrati si può spiegare considerando diverse condizioni di adattamento e/o evoluzione delle colture utilizzate, oppure le differenze, più o meno marcate fra le condizioni sperimentali. Ciò sottolinea ulteriormente l'estrema sensibilità del microrganismo ad una qualsiasi variazioni dei parametri di processo.

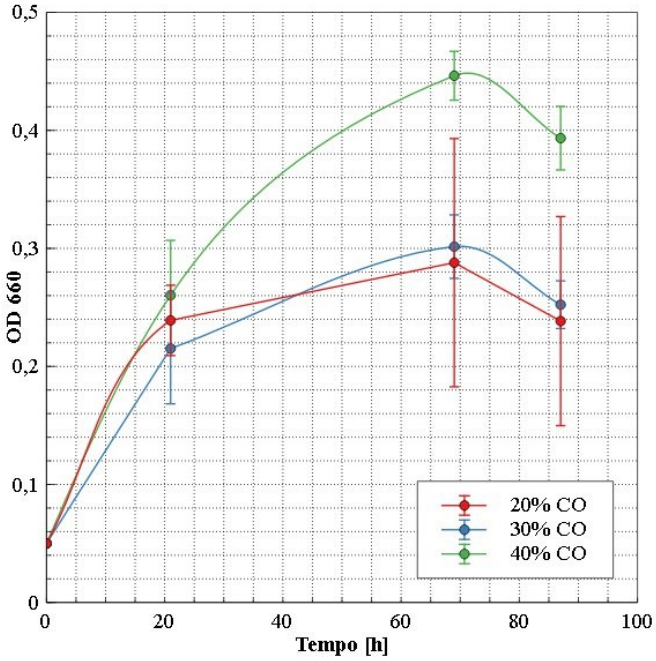

Figura 6.1: Curve di crescita coltura adattata al 30% di CO.

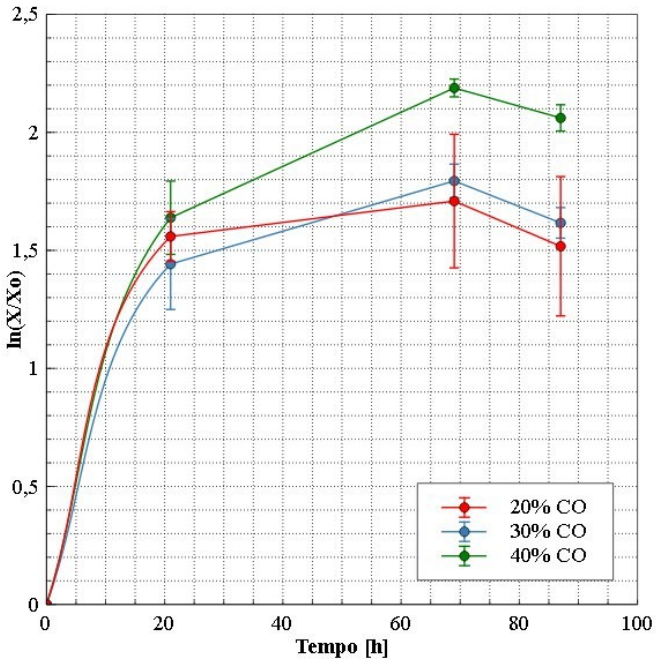

Figura 6.2: Curve di crescita linearizzate coltura adattata al 30% di CO.

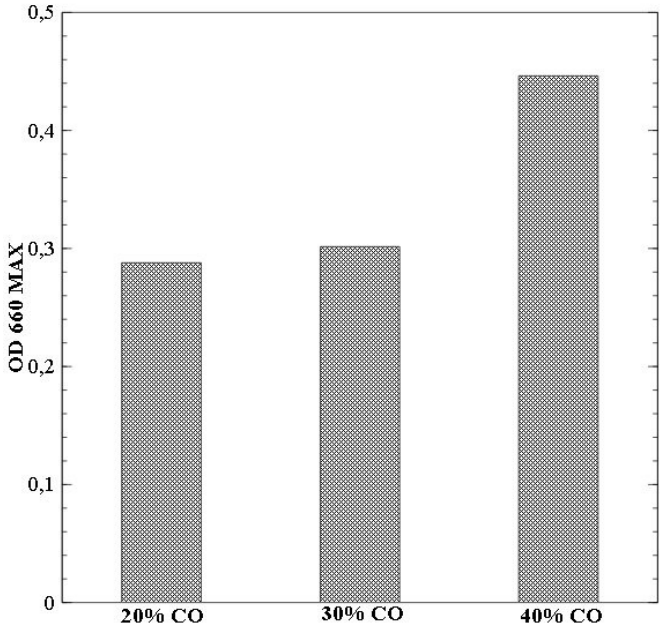

Figura 6.3: Densità ottiche massime per la coltura adattata al 30% di CO.

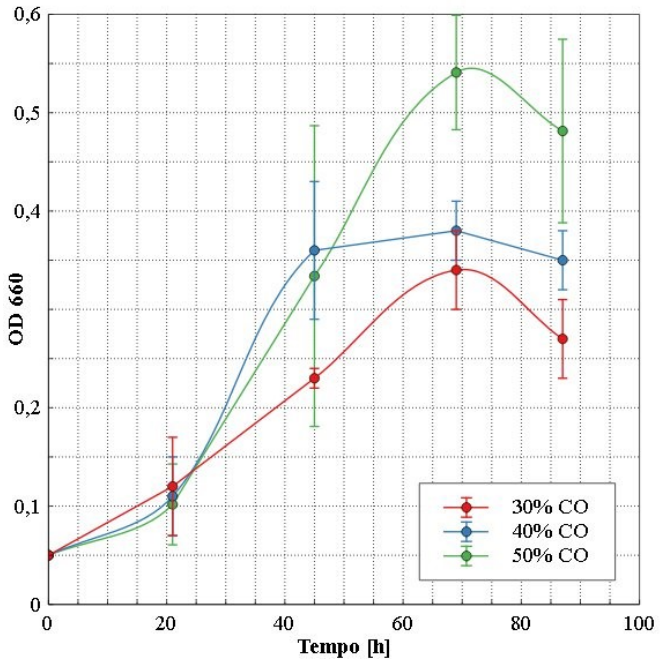

Figura 6.4: Curve di crescita coltura adattata al 40% di CO.

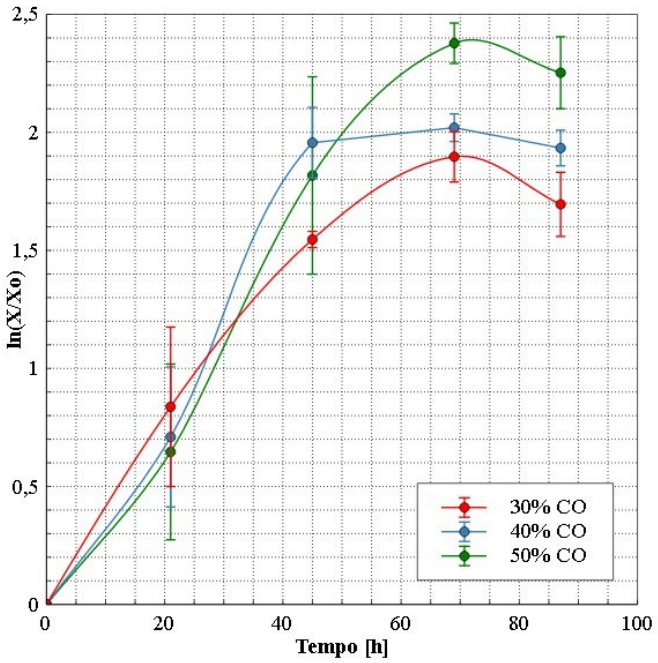

Figura 6.5: Curve di crescita linearizzate coltura adattata al 40% di CO.

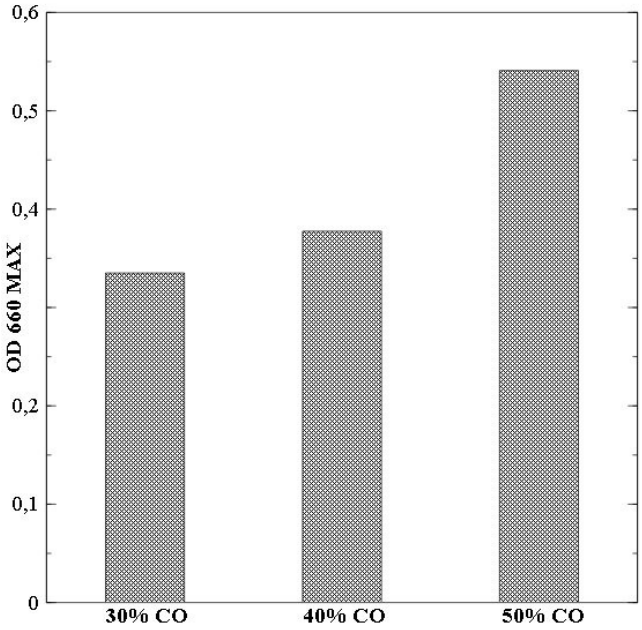

Figura 6.6: Densità ottiche massime per la coltura adattata al 40% di CO.

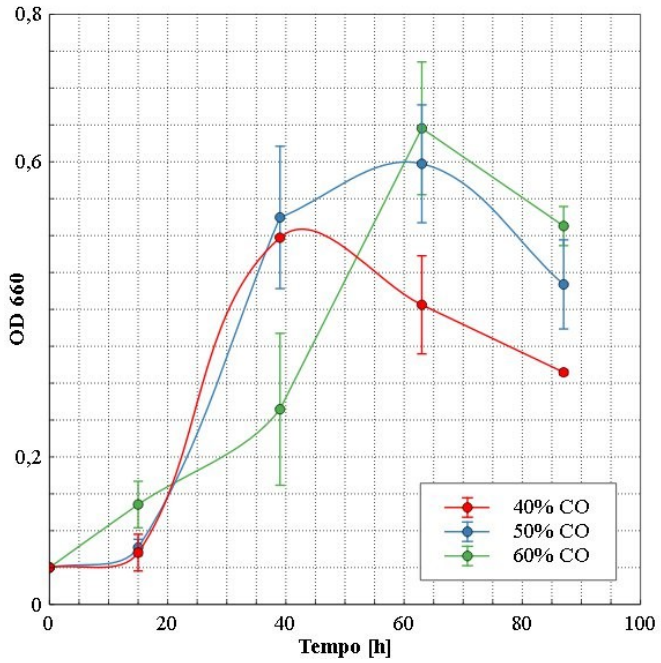

Figura 6.7: Curve di crescita coltura adattata al 50% di CO.

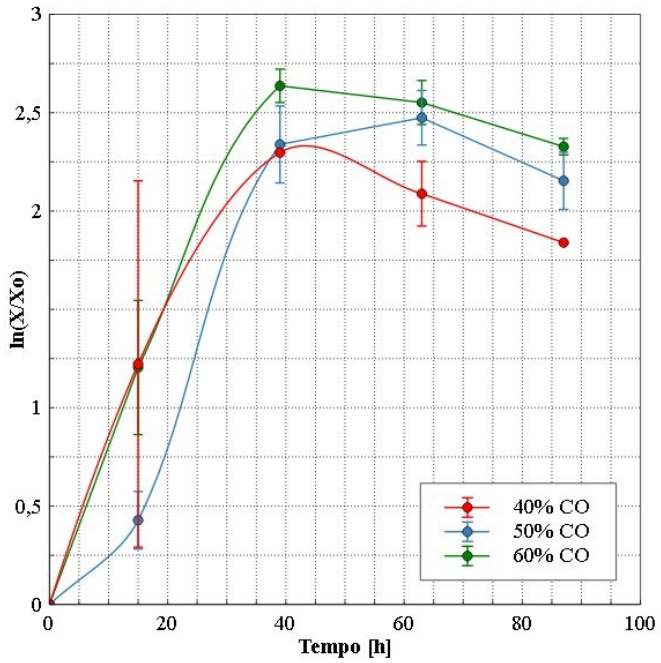

Figura 6.8: Curve di crescita linearizzate coltura adattata al 50% di CO.

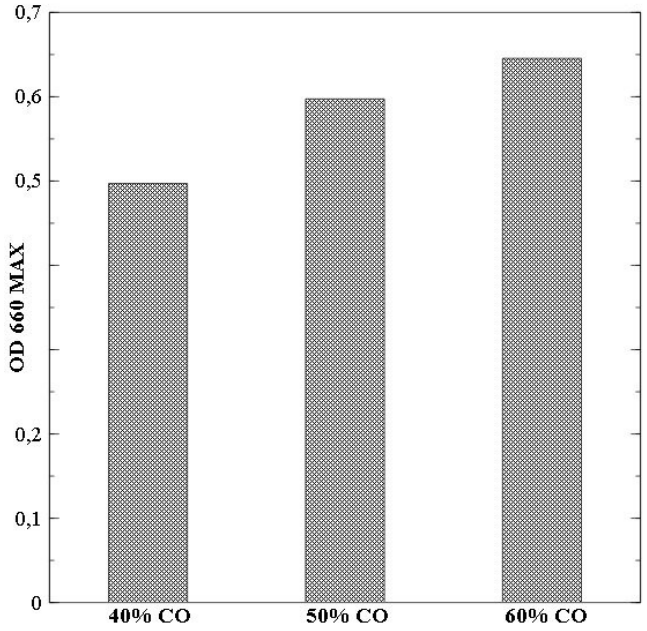

Figura 6.9: Densità ottiche massime per la coltura adattata al 50% di CO.

Per quanto riguarda le velocità massima di crescita (Fig. da 6.10 a 6.12), si riscontra un andamento simile, seppur con valori differenti, per le colture adattate al 40% e al 50% di CO. Infatti fermentando il microrganismo a concentrazioni di CO pari a quelle di adattamento, la velocità di crescita massima ha un valore maggiore anche rispetto a concentrazioni maggiori (rispettivamente 50% e 60% di CO). Ciò può essere spiegato dal fatto che, avendo adattato il microrganismo ad una determinata concentrazione di CO e continuando a coltivarlo sotto le medesime condizioni, il batterio si trova già predisposto all'espressione dei geni adatti a quella determinata condizione ambientale. Paradossalmente, aumentando la concentrazione di substrato si osserva una diminuzione della velocità massima di crescita presumibilmente perché il microrganismo affronta una preliminare fase di adattamento. Una situazione opposta si è verificata nella prova eseguita adattando il batterio ad una concentrazione di CO pari al 30%. In questo caso la velocità di crescita massima è risultata inferiore sia a concentrazione minori che maggiori di CO (20% e 40% rispettivamente). La situazione appena descritta testimonia ulteriormente la sensibilità del microrganismo, che si traduce in una differenza sostanziale di comportamento, anche in condizioni di coltura simili.

Il valore più elevato di velocità di crescita massima ottenuto è di 1,910 h^{-1} (Fig. 6.12), registrato per la coltura adattata al 50% di CO e coltivata sempre al 50% di CO. Tale valore risulta più di due volte di quello registrato per la coltura adattata al 40% di CO, ma coltivata in una atmosfera al 50% (0,865 h^{-1}). Ciò rimarca ulteriormente l'importanza della fase di adattamento del batterio ad una data condizione di coltura. In letteratura si trovano alcuni termini di paragone per la velocità massima di crescita. Un valore massimo di 0,29 h^{-1} è stato calcolato in uno studio sugli effetti della concentrazione di acetato su *Rhodospirillum rubrum* (Najafpour et al., 2004). Dalla analisi dei parametri di crescita (Tab. da 6.2 a 6.4) si nota come i tempi di generazione delle varie colture abbiano un andamento opposto alle velocità di crescita massime registrate. Infatti, essendo inversamente proporzionali alla velocità di crescita massima, come indicato nella equazione (5.2), sono tanto minori quanto maggiori sono i valori di μ_{MAX}. Infatti, a conferma di ciò, il valore minimo di tempo di generazione (0,158 h) si registra per la coltura in cui si ha la velocità massima più alta. In un precedente

lavoro (Kerby et al., 1995), i tempi di generazione risultano essere direttamente proporzionali alla concentrazione di CO utilizzata, passando da un minimo di 4,8 h fino ad un massimo di 8,4 h, per colture in atmosfere rispettivamente al 25% e 100% di CO. Una così marcata differenza potrebbe essere spiegata da diverse situazioni di adattamento della coltura e/o di eventuale evoluzione del ceppo.

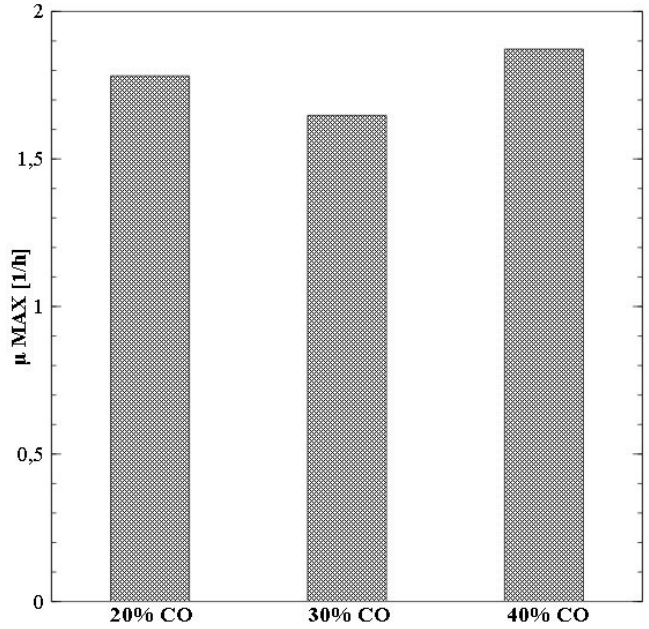

Figura 6.10: Velocità massime di crescita per la coltura adattata al 30% di CO.

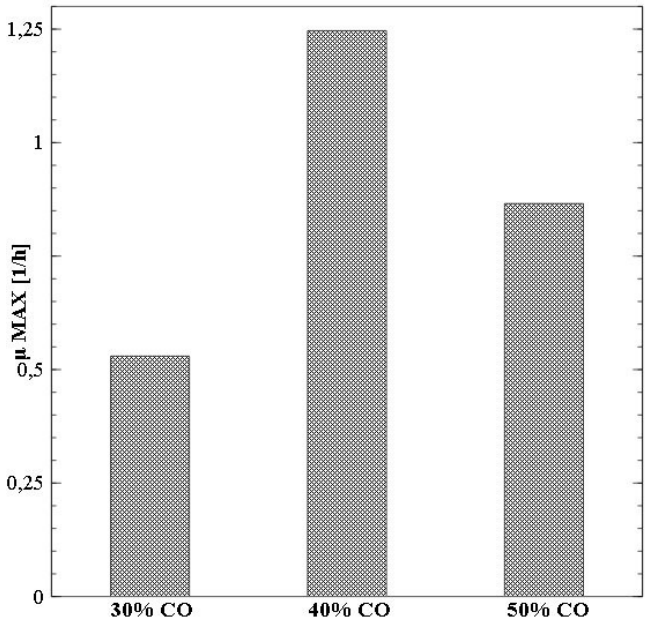

Figura 6.11: Velocità massime di crescita per la coltura adattata al 40% di CO.

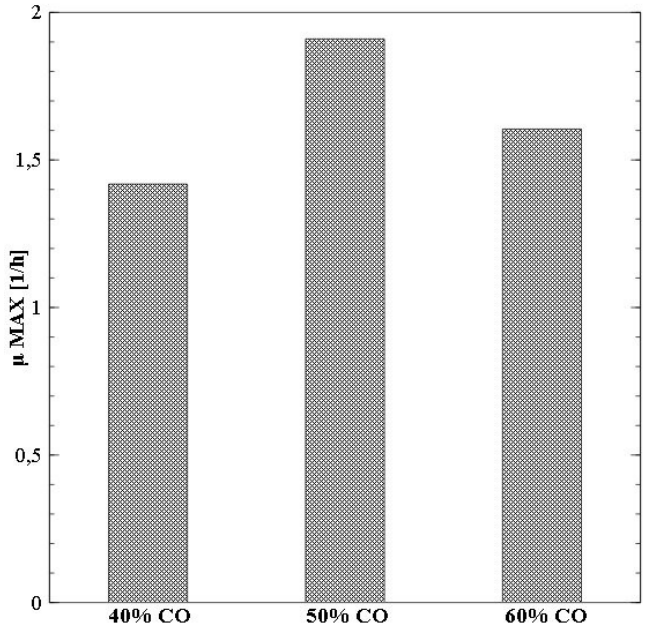

Figura 6.12: Velocità massime di crescita per la coltura adattata al 50% di CO.

Tabella 6.2: Parametri di crescita coltura adattata al 30% di CO.

% CO	μ_{MAX}, h^{-1}	g, h	k, h^{-1}	n
20	1,782	0,169	4,102	124,307
30	1,648	0,183	3,794	114,974
40	1,872	0,161	4,311	130,633

Tabella 6.3: Parametri di crescita coltura adattata al 40% di CO.

% CO	μ_{MAX}, h^{-1}	g, h	k, h^{-1}	n
30	0,530	0,568	1,219	84,459
40	1,246	0,241	2,870	99,388
50	0,866	0,348	1,993	138,044

Tabella 6.4: Parametri di crescita coltura adattata al 50% di CO.

% CO	μ_{MAX}, h^{-1}	g, h	k, h^{-1}	n
40	1,382	0,218	3,182	179,060
50	**1,910**	**0,158**	4,398	152,311
60	1,605	0,187	3,695	127,953

6.3 Analisi del gas di testa al gascromatografo

Il gas di testa sviluppato durante la coltura può essere analizzato da un punto di vista qualitativo, determinandone in questo modo le componenti.

Ciò che subito risalta è la capacità del batterio di convertire interamente il CO fornito come substrato. In particolar modo, in una prova preliminare su una coltura adattata e coltivata al 40% di CO, si è evidenziato che la quantità di CO si azzera all'incirca dopo 96 ore di fermentazione, ovvero quando si riscontra una diminuzione della densità ottica. Ciò testimonia come la fase di declino cellulare si raggiunga una volta terminata la fonte di carbonio fornita alla coltura. Sempre dalla stessa analisi si è notato che la quantità di H_2 prodotta dopo 24 ore dall'inizio della fermentazione è molto minore rispetto a quella riscontrata al termine della stessa. Ciò può essere spiegato ipotizzando che il microrganismo abbia affrontato una fase di latenza nelle prime 24 ore di fermentazione. Quindi la produzione di H_2 è un fenomeno per la maggior parte legato alla fase di crescita esponenziale, che testimonia l'effettiva capacità del batterio di svolgere la reazione di *water-gas shift*. Infatti tra le 24 e le 72 ore, la quantità di H_2 risulta essere dalle due alle dieci volte maggiori, a seconda della coltura. Anche ciò dimostra l'elevata sensibilità del microrganismo, che seppur in condizioni normalizzate, continua ad avere un comportamento altamente variabile.

La reazione di *water-gas shift* oltre a produrre H_2 genera anche CO_2. Infatti l'analisi effettuata sul gas di testa al termine della coltura testimonia come il batterio produca anche CO_2, generalmente in un rapporto 1:1 con H_2. Tale risultato trova conferma anche in un precedente lavoro (Kerby et al., 1995).

A titolo di esempio si riportano i rapporti molari fra i componenti chiave per la coltura adattata al 50% di CO e coltivata al 60% di CO (Tab. 6.5). In linea con quanto affermato in precedenza, si può osservare come il rapporto molare fra H_2 e CO_2 sia molto vicino all'unità. Una simile considerazione non può essere avanzata riguardo il rapporto fra H_2 e CO_2 prodotti e il CO consumato. Presumibilmente ciò può essere spiegato dal fatto che, non essendo un catalizzatore classico, il batterio utilizzi una parte del substrato per il proprio metabolismo invece che per la produzione di gas.

Tabella 6.5: Rapporti molari fra i componenti chiave al termine della fermentazione.

	Media	**Deviazione standard**	**Errore, %**
H_2/CO	0,33	0,08	24,45%
CO_2/CO	0,36	0,04	11,56%
H_2/CO_2	0,93	0,14	15,17%
(H_2 + CO_2)/CO	0,69	0,12	17,61%

6.4 Quantificazione del contenuto di PHB

Infine per la fase preliminare di preadattamento è stata effettuata una prova per quantificare il contenuto di PHB, nelle varie colture alle varie concentrazioni di CO. L'analisi è stata effettuata per completezza di trattazione, nonostante non fosse fra le prerogative della prova di preadattamento. Ciò perché la maggior parte delle fermentazioni dedite alla produzione di biopolimero è effettuata in modalità *fed-batch*.

Il contenuto di PHB, espresso in percentuale di polimero su peso secco della coltura, solo in un caso raggiunge valori apprezzabili (6,32% per la coltura adattata al 50% di CO e coltivata al 40% di CO). Presumibilmente ciò accade perché la coltura, una volta raggiunta la fase di declino e trovandosi in assenza di nutrienti, utilizza il biopolimero come fonte di sostentamento. Infatti è noto che il microrganismo produca la maggior parte del PHB all'inizio della fase stazionaria (Brandl et al., 1989): ed è in questo momento che la fermentazione dovrebbe essere terminata, per evitare che vengano intaccate le sacche citoplasmatiche di PHB.

6.5 Selezione parametri operativi

Confrontando i risultati ottenuti fra le colture utilizzate nella fase di preadattamento, si possono selezionare i parametri operativi su cui impostare la successiva fermentazione in modalità *fed-batch*. La scelta dei parametri si basa sulla ricerca del miglior compromesso fra la densità ottica massima e la velocità massima di crescita raggiunte dalla coltura.

Per quanto riguarda la densità ottica (Fig. 6.13), il massimo valore si registra per la coltura adattata al 50% di CO e fermentata al 60% di CO (≈0,65). La coltura adattata e fermentata al 50% di CO raggiunge un valore di poco inferiore (≈0,60). Infine le restanti colture hanno valori inferiori, quindi non sono accettabili.

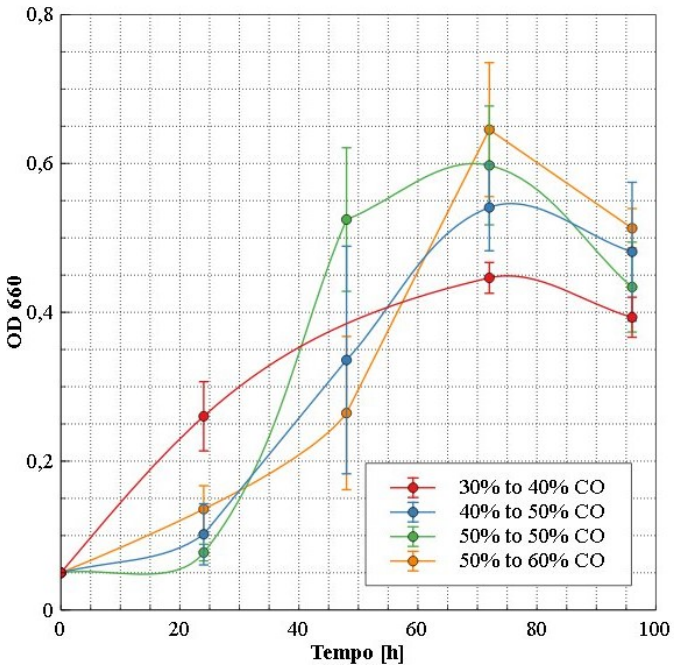

Figura 6.13: Confronto migliori risultati OD_{660}.

Inoltre, prendendo in considerazione le velocità massime di crescita per le colture precedentemente considerate (Fig. 6.14), si osserva che il miglior risultato si ottiene per la coltura adattata e fermentata al 50% di CO (≈1,91 h^{-1}). Un risultato simile si registra per la coltura adattata al 30% di CO e fermentata al 40% di CO (≈1,87 h^{-1}), che però ha un valore di OD_{660} non sufficiente (≈0,45). La coltura con il massimo valore di densità ottica registrato, raggiunge un valore inferiore di velocità massima di crescita (≈1,61 h^{-1}).

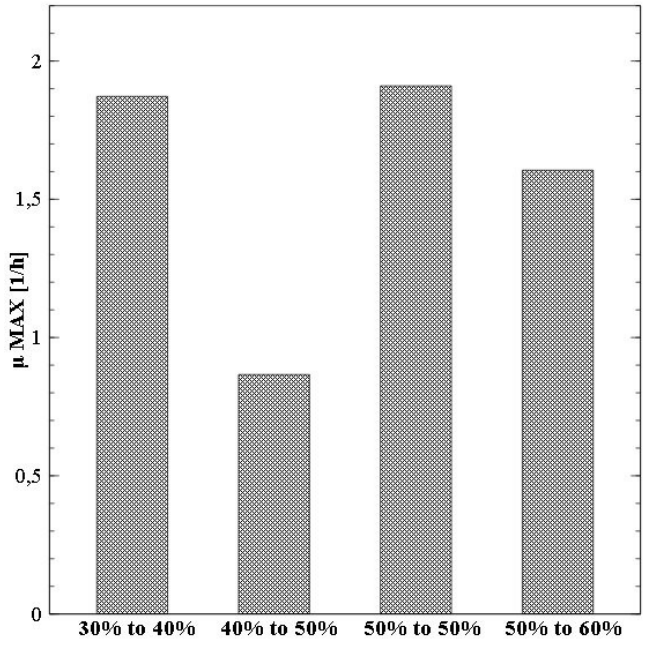

Figura 6.14: Confronto migliori risultati velocità massima di crescita.

In base alle considerazioni ed ai risultati precedentemente esposti, il miglior compromesso fra OD_{660} e velocità massima di crescita si raggiunge per la coltura adattata e fermentata al 50% di CO. Quindi tale condizioni operativa viene selezionata per la successiva prova di fermentazione in modalità *fed-batch*.

Capitolo 7
Fermentazione in modalità *fed-batch*

7.1 Introduzione

Una volta terminata la fase di preadattamento, analizzando i parametri di crescita e i valori di densità ottica, si è constatato che la condizioni ottimale (miglior compromesso densità ottica/velocità di crescita) per effettuare una fermentazione in modalità *fed-batch* fosse sottoporre il microrganismo ad una atmosfera al 50% di CO. Quindi si è allestita una fermentazione con le modalità appena esposte. La prova ha avuto una durata di 120 ore ed è stata considerata terminata una volta che la coltura ha dimostrato di aver raggiunto la fase stazionaria.

7.2 Analisi della densità ottica

Il comportamento della coltura in modalità *fed-batch* ha un comportamento differente rispetto alla precedente fase di preadattamento. Infatti ciò che subito risalta all'occhio è la mancanza di una fase di latenza nella curva di crescita microbica (Fig. 7.1). Già dopo 24 ore dall'inizio della prova il valore di OD_{660} raggiunge il proprio corrispettivo in modalità batch, il quale però viene registrato dopo 72 ore di fermentazione. Un simile comportamento si può spiegare ipotizzando che ci sia stata una possibile evoluzione del ceppo utilizzato. Le colture sono sempre state coltivate in una atmosfera al 50% di CO. Ciò probabilmente ha fatto in modo che, predisponendosi geneticamente, il microrganismo a questa concentrazione avesse una velocità maggiore di metabolizzazione del substrato. Quindi in questo modo si è potuto diminuire, se non azzerare, il tempo che la coltura trascorre in fase *lag*, passando direttamente alla fase esponenziale. Il massimo valore di densità ottica raggiunto è di 2,44.

Considerando la curva di crescita linearizzata (Fig. 7.2) si può subito riscontrare quanto detto pocanzi. La coltura è come se si trovasse direttamente in fase esponenziale, che presumibilmente si esaurisce già dopo 24 ore dall'inizio della fermentazione. In seguito la concentrazione cellulare ha un aumento continuo fino al termine della prova, anche se la relativa variazione subisce un assottigliamento progressivo, indicando che la coltura sta ormai raggiungendo la fase stazionaria.

Un ulteriore indizio che indica una probabile evoluzione del ceppo si può riscontrare anche nelle barre di errore relative: infatti esse testimoniano che, nonostante si monitorino popolazioni microbiche differenti, generalmente se ne osserva lo stesso andamento lavorando nelle medesime condizioni.

Una ultima considerazione riguarda la velocità massima ed i parametri di crescita registrati dalla coltura (Tab. 7.1). Il valore che si è raggiunto durante la fermentazione in modalità *fed-batch* è di 2,588 h^{-1}, nettamente maggiore del massimo valore registrato nella fase di preadattamento (1,910 h^{-1}). Anche questo aspetto può essere spiegato presumibilmente considerando il continuo adattamento o l'eventuale evoluzione del ceppo utilizzato.

La prova è effettuata in quadruplicato.

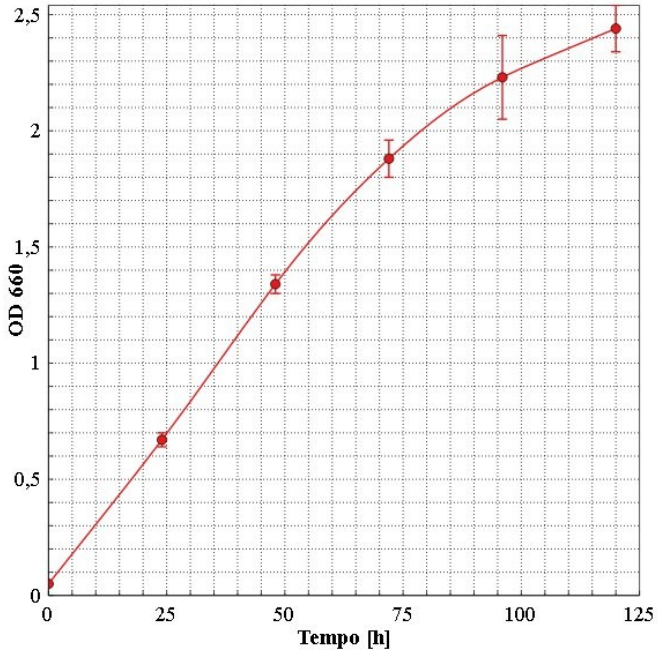

Figura 7.1: Curva di crescita fermentazione *fed-batch* al 50% di CO.

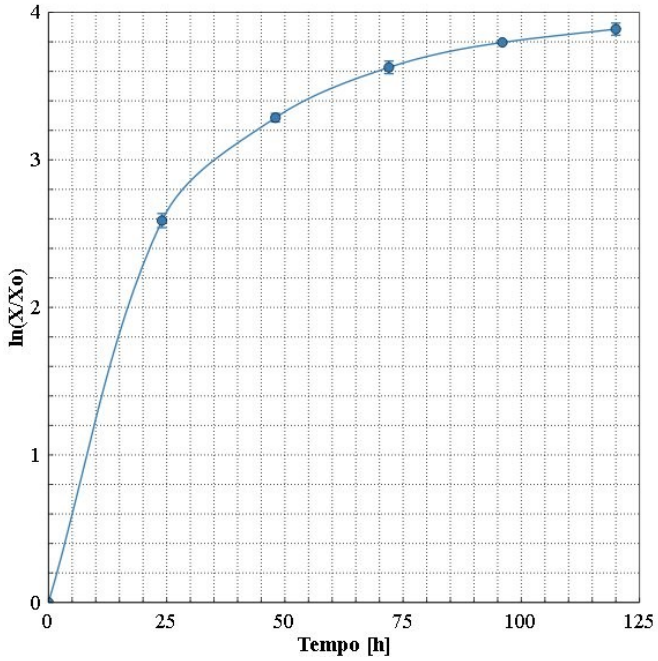

Figura 7.2: Curva di crescita linearizzata fermentazione *fed-batch* al 50% di CO.

Tabella 7.1: Parametri di crescita fermentazione *fed-batch* al 50% di CO.

μ_{MAX}, h^{-1}	g, h	k, h^{-1}	n
2,588	0,116	5,959	206,386

7.3 Analisi del gas di testa al gascromatografo

Innanzitutto, prima di procedere all'analisi al GC, si sono stabiliti i valori di pressione iniziale e finale del sistema (Tab. 7.2), così come viene specificato al paragrafo 5.3.7. Si è notato che il sistema mediamente registra una pressione iniziale di 1,36 bar e finale di 1,74 bar. Ovviamente la differenza di pressione fra le due condizioni considerate è una diretta conseguenza della produzione di gas da parte del microrganismo. La misura della pressione del sistema si è rivelata fondamentale per il calcolo della produttività del microrganismo durante tutta la durata della fermentazione. Infatti approssimando il gas di testa come un gas perfetto e conoscendone le pressioni e le percentuali molari, se ne è potuto utilizzare l'equazione di stato per il calcolo delle moli di ogni componente in ogni condizione.

La massima produttività di gas si registra dopo 48 ore dall'inizio della fermentazione, con un valore di 0,14 e 3,25 kg/(m^3_{MEDIUM} h), rispettivamente per H_2 e CO_2. Il minimo valore di produttività del gas si registra dopo 96 h dall'inizio della prova, in contemporanea con la massima produzione di PHB (vedi paragrafo 7.4). Presumibilmente il microrganismo può aver utilizzato l'energia proveniente dal substrato per sintetizzare il biopolimero, invece che per produrre gas (Tabelle da 7.3 a 7.7). Una ulteriore conferma di ciò potrebbe essere proprio il massimo valore di conversione di CO, ovvero 96,48%, raggiunto dopo 96 h di fermentazione. Infine il minimo valore di conversione (73,22%) si registra dopo le prime 24 h dall'inizio della prova, probabilmente a causa della presenza di un quantitativo minore di biomassa (Tab. 7.8).

Durante la fermentazione i rapporti molari fra i componenti chiave (H_2, CO_2 e CO) rispettano la stechiometria della reazione di *water-gas shift* (7.1). Infatti sia il rapporto H_2/CO che CO_2/CO (0,46 e 0,47, rispettivamente) equivalgono a circa 1 mole di prodotto per ogni mezza mole di CO consumata. Di conseguenza il rapporto molare fra i prodotti è di 1:1, quindi per 1 mole di CO consumata si producono 1 mole di H_2 e 1 mole di CO_2, in linea proprio con la stechiometria della reazione. Il rapporto finale fra prodotti (H_2 e CO_2) e reagente (CO) è di circa 0,93 (Tab. 7.9). Se la reazione fosse effettuata tramite catalisi classica, il rapporto sarebbe unitario. Poiché in questo caso si lavora con un microrganismo, probabilmente una parte del substrato viene utilizzata per la crescita e non per la produzione di componenti gassosi.

Si è anche stimata la produzione di gas durante la fermentazione, sia da un punto di vista teorico che sperimentale (Tab. 7.10). Teoricamente, approssimando il gas di testa come perfetto, dalle pressioni iniziali e finali misurate, si raggiunge un volume teorico di gas prodotto di 5 mL_{GAS}/mL_{BROTH}. Sperimentalmente, come dettagliatamente esposto al paragrafo 5.3.8, si ottiene un valore di 3,55 mL_{GAS}/mL_{BROTH}. La differenza fra i valori riscontrati è da imputare probabilmente all'errore derivante sia dal sistema di misura utilizzato, che dall'approssimazione riguardo il gas.

Infine si è calcolata la velocità di consumo del CO (7.2), considerando una conversione media del 90,5 %, come indicato in tabella 7.13. Il valore ottenuto è pari a $1{,}10\times10^{-4}$ mmol/h.

$$CO + H_20 \rightarrow H_2 + CO_2 \qquad (7.1)$$

Tabella 7.2: Pressione media del sistema durante la fermentazione.

Pressione	Media, bar	Deviazione standard	Errore, %
Iniziale	1,36	0,01	0,95%
Finale	1,74	0,04	2,33%
ΔP	0,38	0,04	11,75%

Tabella 7.3: Produttività dopo 24 h.

Componente	Media, kg/m^3_{MEDIUM} h	Deviazione standard	Errore, %
H_2	0,11	0,01	12,91%
CO_2	2,25	0,39	17,39%

Tabella 7.4: Produttività dopo 48 h.

Componente	Media, kg/m^3_{MEDIUM} h	Deviazione standard	Errore, %
H_2	**0,14**	0,01	10,76%
CO_2	**3,25**	0,35	10,91%

Tabella 7.5: Produttività dopo 72 h.

Componente	Media, kg/m^3_{MEDIUM} h	Deviazione standard	Errore, %
H_2	0,13	0,01	5,01%
CO_2	3,21	0,29	9,09%

Tabella 7.6: Produttività dopo 96 h.

Componente	Media, kg/m^3_{MEDIUM} h	Deviazione standard	Errore, %
H_2	**0,10**	0,04	37,78%
CO_2	**2,13**	0,73	34,20%

Tabella 7.7: Produttività dopo 120 h.

Componente	Media, $kg/m^3_{MEDIUM}\ h$	Deviazione standard	Errore, %
H_2	0,13	1,40E-04	12,91%
CO_2	2,82	0,21	17,39%

Tabella 7.8: Conversione di CO durante la fermentazione.

Ore	Media, %	Deviazione standard	Errore, %
24	**73,22%**	8,14%	11,12%
48	94,55%	3,20%	3,39%
72	92,37%	1,11%	1,20%
96	**96,48%**	1,64%	1,70%
120	90,50%	1,16%	1,28%

Tabella 7.9: Rapporti molari fra i componenti chiave durante la fermentazione.

	Media	Deviazione standard	Errore, %
H_2/CO	0,46	0,067	14,65%
CO_2/CO	0,47	0,078	16,56%
$H2/CO_2$	0,98	0,062	6,36%
$(H_2 + CO_2)/CO$	0,93	0,142	15,26%

Tabella 7.10: Stima della produzione giornaliera di gas durante la fermentazione.

	Volume, mL_{GAS}/mL_{BROTH}
Teorica	5
Reale	3,55

$$v_{CO} = -\frac{\Delta CO}{\Delta t} = 1{,}10 \times 10^{-4} \frac{mmol}{h} \ . \qquad (7.2)$$

7.4 Analisi del terreno di coltura

Contemporaneamente alla analisi del gas di testa, si è rivelata di interesse anche l'analisi del terreno di coltura durante la fermentazione. Tramite questa analisi se ne è potuta stabilire sia la variazione del pH, che la velocità di consumo di acetato di sodio da parte del microrganismo.

I valori di pH registrati spaziano da un massimo di 7,1, all'inizio della prova, fino ad un valore minimo di 6,75 dopo 120 ore di fermentazione (Fig. 7.3). Ovviamente le variazioni intermedie di pH sono una diretta conseguenza della attività metabolica del microrganismo.

Inoltre tramite analisi HPLC si è valutata la concentrazione di acetato di sodio residua nel *medium*, riuscendone quindi a valutare la conversione (Fig. 7.4). Calcolando la tangente alla curva rappresentante la conversione del reagente, se ne è potuta calcolare la velocità di consumo (7.3). Per la fermentazione in oggetto si ritrova un valore di $2{,}66 \times 10^{-2}$ mmol/h.

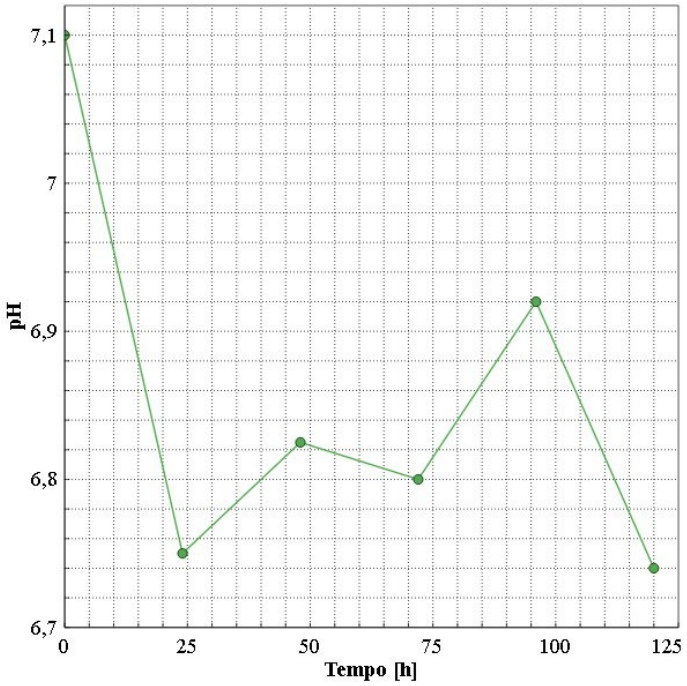

Figura 7.3: Variazione del pH durante la fermentazione.

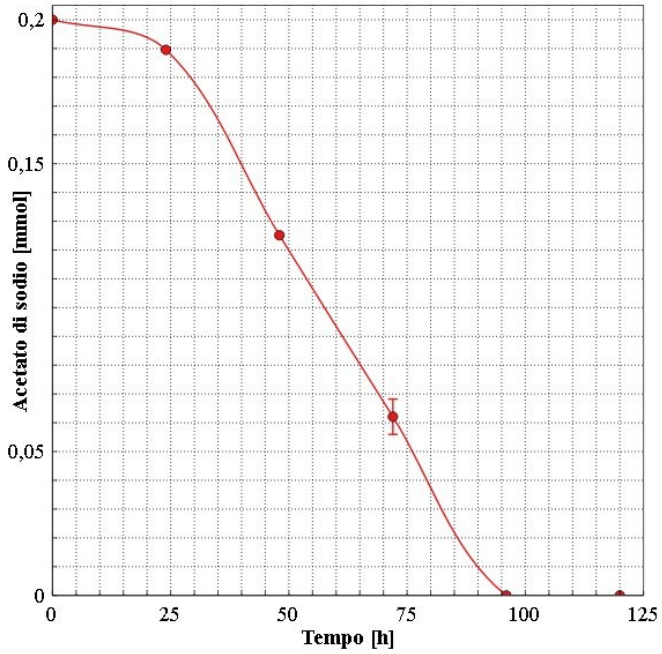

Figura 7.4: Conversione di acetato di sodio durante la fermentazione.

$$v_{ACETATO} = -\frac{\Delta[C_2H_3NaO_2]}{\Delta t} = 2{,}66 \times 10^{-3}\,\frac{mmol}{h}\ . \tag{7.3}$$

7.5 Cinetica di produzione e estrazione PHB

Dalla analisi riguardante la cinetica di produzione del PHB (Fig. 7.5) emerge che già nelle prime 24 ore di fermentazione il microrganismo inizia a produrre biopolimero. In particolar modo si raggiunge un valore di percentuale di PHB, espressa come mg PHB/mg DW, pari a 5,7%. In seguito la percentuale di PHB registra il suo valore massimo (9,2%) precisamente dopo 96 ore di fermentazione, in concomitanza con l'inizio della fase stazionaria, così come si riscontra in letteratura (Brandl et al., 1989). Oltre a ciò, sempre dopo 96 ore di fermentazione avviene la completa conversione di acetato di sodio, ovvero il substrato chiave per la produzione di PHB da parte di *Rhodospirillum rubrum*. Infatti una volta esaurito il substrato, la percentuale di PHB subisce una drastica diminuzione, giungendo al suo valore minimo (1,0%). Probabilmente ciò accade perché il microrganismo, esaurendo una delle fonti di carbonio del sistema, utilizza il PHB come fonte di energia, ovvero la sua funzione primaria.

In letteratura possono essere citati dei termini di paragone con il presente lavoro (Tab. 7.11). Subito si può notare come il microrganismo sintetizzi PHB in percentuali differenti a seconda delle differenti condizioni di fermentazione. Ciò che subito risalta è che la maggior parte delle fermentazioni viene effettuata in modalità *fed-batch*, come d'altronde accade per ogni processo che coinvolga microrganismi con lo scopo di produrre un qualcosa di interesse industriale. Una possibile spiegazione alle differenze di produzione ricade ancora fra le diverse condizioni di adattamento e/o evoluzione dei ceppi utilizzati.

Infine si è passati alla estrazione del PHB tramite la procedura descritta al paragrafo 5.3.10. In base alla densità ottica raggiunta e alla percentuale di PHB determinata in precedenza, si è

raggiunta una produzione di polimero pari a 5,39 mg. Tramite la procedura di estrazione se ne sono ottenuti 4,20 mg. Probabilmente tramite tale procedura non si è ottenuta una resa maggiore a causa della presenza di eventuali errori durante le operazioni effettuate. Infatti la procedura è composta da una serie di operazione di separazione, anche manuali, che possono essere facilmente influenzati da errori operativi.

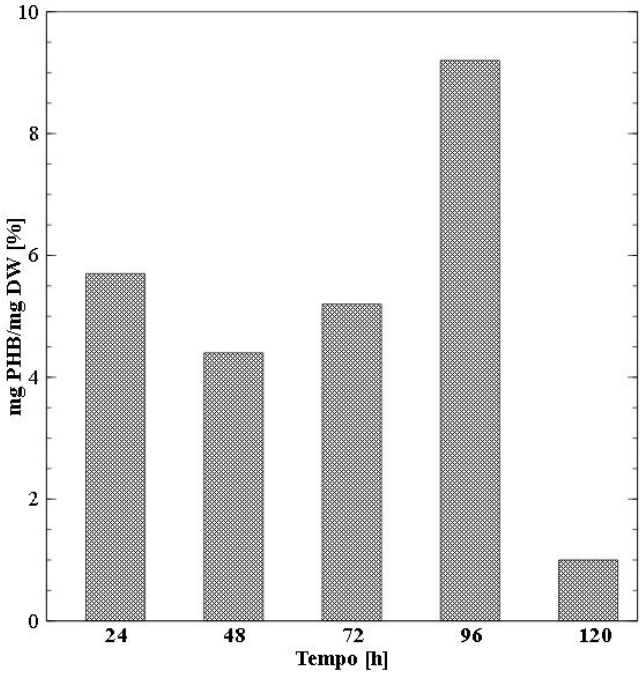

Figura 7.5: Cinetica di produzione di PHB.

$$Y_{PHB} = \frac{PHB_{ESTRATTO}}{PHB_{PRODOTTO}} \approx 78\% \,. \tag{7.4}$$

Tabella 7.11: Termini di paragone in letteratura.

% PHB	Fonte di carbonio	Condizioni operative	*Reference*
2,7 12 20	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + acetato di sodio (0, 5, 10 mM)	Fed-batch	(Revelles et al., 2016)
14,2 2,1 19,2	Acetato di sodio (122, 10, 30 mM)	N.D.	(Brandl et al., 1989)
38	*Syngas* (17,2% CO, 8,8% H_2, 16,3% CO_2, 56,0% N_2)	Fed-batch	(Do et al., 2007)
25,5	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + fruttosio	Fed-batch	(Heinrich et al., 2015)
7,1	*Syngas* (40% CO, 40% H_2, 10% CO_2, 10% N_2) + fruttosio	Fed-batch	(Heinrich et al., 2016)
20	*Syngas* (25% CO, 25% H_2, 5% CO_2, 45% N_2) + acido acetico	Fed-batch	(Karmann et al., 2017)
9,2	Acetato di sodio + CO 50%	Fed-batch	Presente lavoro

7.6 Confronto fra *batch* e *fed-batch*

Una ultima considerazione riguarda il confronto fra la fermentazione *fed-batch* e la prova di preadattamento *batch* alle stesse condizioni (coltura adattata e fermentata al 50% di CO).

Dalle curve di crescita (Fig. 7.6, 7.7) si può notare come nella prova *fed-batch* non sia presente una prima fase di latenza. La coltura sembra passare direttamente in fase esponenziale, che subisce un rallentamento dopo le prime 24 ore dall'inizio della prova. Probabilmente anche questo aspetto viene spiegato dalla avvenuta evoluzione del ceppo utilizzato. In seguito le curve hanno un andamento paragonabile, seppur con valori differenti: infatti trascorse 72 ore entrambe si trovano in fase stazionaria. Infine raggiunte le 96 ore di fermentazione si riscontra una ulteriore differenza: la prova in *fed-batch* continua la propria fase stazionaria, mentre la fermentazione *batch* affronta la propria fase di declino. Ciò accade perché il substrato fornito oramai si è consumato, mentre in *fed-batch* se ne continua a somministrare la stessa quantità ad intervalli regolari di tempo. Di conseguenza anche i parametri di crescita subiscono una netta variazione fra le due modalità (Tab. 7.12).

Dalla analisi del gas di testa (Tab. 7.13) si può subito notare come in modalità *batch* si raggiunga una completa conversione del CO, che invece non accade nella fermentazione *fed-batch*. Ciò sicuramente accade perché il batterio, non essendo rifornito costantemente di substrato, cerca di sfruttarne completamente la presenza.

Considerando invece le componenti e i rapporti molari fra i componenti chiave del gas di testa (Tab. 7.14, 7.15) si può vedere come in modalità *batch* essi siano nettamente inferiori alla fermentazione *fed-batch*. Probabilmente ciò accade perché il microrganismo, trovandosi dopo 96 ore in deficit di substrato, utilizza l'energia restante ricavabile per sostenere il proprio metabolismo basale, piuttosto che per produrre H_2 e CO_2. Si è osservato in precedenza (vedi paragrafo 6.4) che, arrivati a questo punto, anche il contenuto di PHB subisce una drastica diminuzione. Ciò poiché il PHB viene utilizzato come fonte di energia dal microrganismo, una volta terminati i substrati forniti.

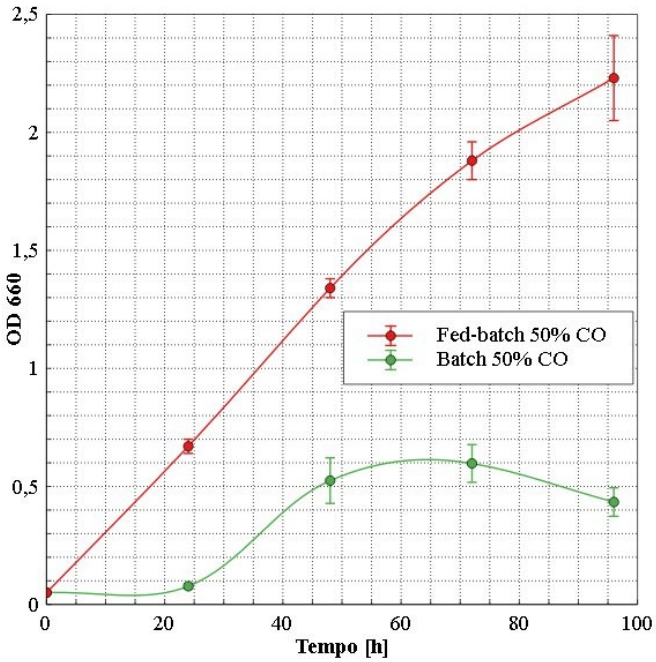

Figura 7.6: Confronto fra curve di crescita. Atmosfera al 50% di CO.

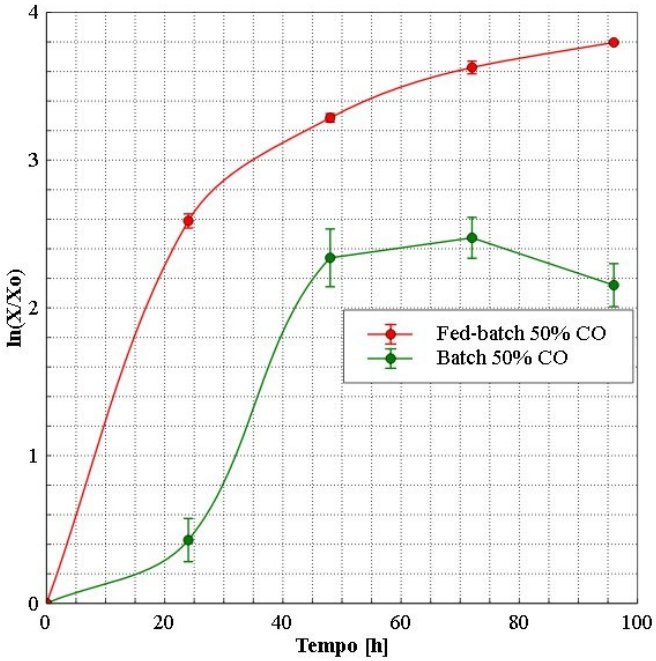

Figura 7.7: Confronto fra curve di crescita linearizzate. Atmosfera al 50% di CO.

Tabella 7.12: Confronto fra parametri di crescita. Atmosfera al 50% di CO.

Configurazione	μ_{MAX}, h^{-1}	g, h	k, h^{-1}	n	OD_{660} MAX
Fed-batch	2,588	0,116	5,959	206,386	2,4
Batch	1,910	0,158	4,398	152,311	0,6
Δ%	+35,5	-26,6	+26,2	+35,5	+300%

Tabella 7.13: Confronto fra le conversioni di CO.

Configurazione	Media	Deviazione standard	Errore
Batch	100,00%	0,00	0,00%
Fed-batch	90,50%	1,16%	1,28%

Tabella 7.14: Confronto fra percentuali molari del gas di testa nelle due configurazioni dopo 96 h di fermentazione.

	Batch			Fed-batch		
	Media	**Deviazione standard**	**Errore**	**Media**	**Deviazione standard**	**Errore**
H_2	9,46	3,38	35,71%	21,69	1,95	9,01%
CO_2	13,24	1,23	9,26%	21,57	1,60	7,42%

Tabella 7.15: Confronto fra i rapporti molari dei componenti chiave dopo 96 h di fermentazione.

	Batch			Fed-batch		
	Media	**Deviazione standard**	**Errore**	**Media**	**Deviazione standard**	**Errore**
H_2/CO	0,19	0,08	41,1%	0,48	0,06	11,5%
CO_2/CO	0,26	0,03	10,5%	0,48	0,05	9,7%
H_2/CO_2	0,71	0,26	36,4%	1,00	0,02	1,9%
(H_2+CO_2)/CO	0,45	0,10	21,0%	0,96	0,10	10,6%

Conclusioni e sviluppi futuri

Questo lavoro di tesi è suddiviso in due sezioni principali. La prima riguarda gli aspetti teorici che caratterizzano quella che è la seconda parte, ovvero dove vengono presentati i materiali e i metodi utilizzati assieme all'attività sperimentale. In particolar modo quest'ultima è a sua volta suddivisa in due fasi: una prima fase di preadattamento della coltura di *Rhodospirillum rubrum*, volta alla ricerca dei migliori parametri operativi da utilizzare nella seconda fase, ovvero la prova in modalità *fed-batch*.

Durante la fase di adattamento è stata accertata la capacità del batterio di crescere in presenza di concentrazioni crescenti di CO senza manifestare fenomeni di inibizione. Infatti il massimo valore di OD_{660} (≈0,6) si è registrato per la coltura adattata ad una concentrazione di CO pari al 50% e coltivata per al 60% di CO. Quindi si può notare come aumentando la quantità di substrato fornito al batterio si possa aumentare la quantità di biomassa ottenuta. Anche i parametri di crescita sono influenzati dalla concentrazione di CO utilizzata e dall'adattamento della coltura stessa. Il massimo valore di velocità massima di crescita (1,91 h^{-1}) è stato raggiunto dalla coltura adattata e coltivata ad una concentrazione di CO pari al 50%. Ciò può essere spiegato ipotizzando che il batterio riesca a metabolizzare più velocemente il substrato quando lo si fornisce ad una concentrazione pari a quella di adattamento. Molto probabilmente ciò accade perché il batterio si predispone geneticamente ad una data concentrazione di substrato, rendendone più veloce l'utilizzo quando la si continua a fornire costantemente.

Dalla analisi del gas di testa è risultato che la produzione di H_2 avviene al termine della preliminare fase di latenza e continua per tutta la durata della fermentazione. In particolar modo la quantità di H_2 è sempre in rapporto molare 1:1 con la CO_2. Ciò accade perché il microrganismo è capace di utilizzare il CO come substrato, ossidandolo tramite la reazione di *water-gas shift*. Il rapporto relativo fra i prodotti (H_2 e CO_2) e il reagente (CO) è di 0,63. Probabilmente il batterio, trovandosi in limitazione di fonte di carbonio, utilizza il substrato fornito per il proprio metabolismo basale, piuttosto che per la produzione di H_2 e CO_2.

Dalla quantificazione del PHB accumulato si può notare come la percentuale maggiore di polimero (6,32%) venga registrata per la coltura adattata al 50% di CO e coltivata al 40%. Poiché questa analisi è stata effettuata al termine della fermentazione, probabilmente il microrganismo ha intaccato le proprie riserve di PHB, essendosi trovato in deficit di fonte di carbonio.

Terminata la fase di preadattamento e considerati i risultati ottenuti, si è allestita una fermentazione in modalità *fed-batch*, utilizzando una coltura adattata e coltivata al 50% di CO. Subito si può notare come la coltura affronti direttamente la fase di crescita esponenziale, senza apparentemente essere impegnata in una preliminare fase *lag*: ciò è da imputare alla continua fase di adattamento del ceppo oppure ad una sua evoluzione, che permette di utilizzare il substrato più efficientemente. Infatti il massimo valore di OD_{660} raggiunto (≈2,4) è 4 volte maggiore rispetto al proprio corrispettivo nella fase di preadattamento (≈0,6). La velocità massima di crescita segna un incremento percentuale del 35,5%, registrando un valore di circa 2,59 h^{-1}. Inoltre le barre di errore nelle curve di crescita subiscono un netto ridimensionamento rispetto alla prova di preadattamento, segno di una continua evoluzione del ceppo utilizzato.

Durante la prova *fed-batch* mediamente si sono misurate pressioni iniziali e finali rispettivamente di 1,36 bar e 1,74 bar. La differenza di pressione misurata fra le due

condizioni (0,38 bar) è da imputare esclusivamente alla produzione di gas da parte del batterio. Le produttività massime e minime di gas si raggiungono rispettivamente dopo 48 e 96 ore di fermentazione. La minima quantità di gas prodotto si registra in contemporanea alla massima conversione di CO ottenuta (96,48%). Ciò probabilmente perché il batterio era impegnato ad accumulare PHB, in quanto proprio dopo 96 ore si è registrata la massima quantità di polimero accumulato (9,2%). La minima conversione di CO (73,22%) si registra dopo 24 ore di fermentazione, probabilmente a causa della presenza di un quantitativo minore di biomassa. Rispetto alla prova di preadattamento, in cui si raggiunge il 100%, la conversione media è del 90,50%: ciò perché in modalità *fed-batch* si fornisce il substrato ad intervalli regolari di tempo, non lasciando al batterio il tempo necessario alla metabolizzazione completa. I rapporti e le percentuali molari dei componenti chiave mostrano come il batterio sia più votato alla produzione di gas durante la prova *fed-batch*. Venendo continuamente rifornito di substrato, *Rhodospirillum rubrum* verte il proprio metabolismo verso la produzione di H_2 e CO_2, seguendo pressoché la stechiometria della reazione. Infatti mediamente il rapporto fra H_2 e CO_2 è unitario, come anche circa il rapporto fra prodotti e reagente (≈0,96). Infine a livello teorico (considerando il gas di testa come ideale) si sarebbe registrato un valore di produzione di gas pari a 5 mL_{GAS}/mL_{BROTH}, mente se ne è ottenuto uno pari a 3,55 mL_{GAS}/mL_{BROTH}. Una tale differenza può essere spiegata sia dalla approssimazione effettuata che dal sistema di misura utilizzato.

Sempre dalla analisi del gas di testa si è potuta calcolare la velocità media di consumo di CO. Il valore ottenuto è stato pari a $1{,}10\times10^{-4}$ mmol/h.

Dalla analisi del terreno di coltura durante la fermentazione è emerso che l'acetato fornito è stato consumato in circa 96 ore ad una velocità di $2{,}66\times10^{-3}$mmol/h.

In seguito si è passati alla quantificazione e alla estrazione del PHB. Dalla prima analisi si è potuta inoltre valutare la cinetica di produzione del polimero. La massima quantità di polimero accumulata (9,2%) è stata registrata dopo 96 ore di fermentazione, ovvero nei primi momenti della fase stazionaria, come riportato in letteratura (Brandl et al., 1989). Contemporaneamente si sono registrate la massima conversione di CO, la minima quantità di gas prodotto e il completo consumo di acetato, testimoniando come il microrganismo fosse impegnato nella sintesi del polimero. Infine l'estrazione del PHB dalla coltura ha registrato una resa di circa il 78%.

Un possibile spunto per poter continuare in futuro tale ricerca potrebbe essere quello di cercare di adattare e/o evolvere il batterio verso l'utilizzo sempre più efficace di una quantità progressivamente maggiore di substrato. Per fare ciò si potrebbero aumentare sia la pressione totale del sistema che la pressione parziale di CO durante la prova. Inoltre si potrebbe cercare di allestire una prova considerando dei volumi maggiori di reazione. Un ulteriore spunto potrebbe essere quello di predisporre una fermentazione *fed-batch* modificando alcuni parametri del *medium* utilizzato. Ancora si potrebbero fornire i substrati chiave per la crescita (CO e acetato di sodio) ad una velocità che sia pari a quella di consumo, in maniera tale da creare uno stato stazionario nel sistema ed evitare possibili fenomeni di inibizione da substrato. Per cercare di rendere il processo sempre più vantaggioso dal punto di vista economico, si potrebbero ricercare dei medium di coltura che abbiano un costo inferiore. Così facendo il processo potrebbe diventare più competitivo anche dal punto di vista industriale. Infine, nell'ottica di creare un processo quanto più sostenibile possibile, si potrebbe pensare di sostituire i solventi utilizzati durante le operazioni di estrazione con degli equivalenti meno dannosi e tossici, sia per l'ambiente che per l'uomo.

Bibliografia

Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2011). Biological conversion of carbon monoxide: rich syngas or waste gases to bioethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *5*(1), 93-114.

Adams, M., & Moss, M. (2008). *Food microbiology* (3rd ed., pp. 20 - 49). Cambridge: RSC Publishing.

Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *85*(6), 732-743.

Brandl, H., Knee Jr, E. J., Fuller, R. C., Gross, R. A., & Lenz, R. W. (1989). Ability of the phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum to produce various poly (β-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *International journal of biological macromolecules*, *11*(1), 49-55.

Bredwell, M. D., Srivastava, P., & Worden, R. M. (1999). Reactor design issues for synthesis-gas fermentations. *Biotechnology progress*, *15*(5), 834-844.

Daniell, J., Köpke, M., & Simpson, S. D. (2012). Commercial biomass syngas fermentation. *Energies*, *5*(12), 5372-5417.

Do, Y. S., Smeenk, J., Broer, K. M., Kisting, C. J., Brown, R., Heindel, T. J., ... & DiSpirito, A. A. (2007). Growth of Rhodospirillum rubrum on synthesis gas: Conversion of CO to H2 and poly-β-hydroxyalkanoate. *Biotechnology and Bioengineering*, *97*(2), 279-286.

Drzyzga, O., Revelles, O., Durante-Rodríguez, G., Díaz, E., García, J. L., & Prieto, A. (2015). New challenges for syngas fermentation: towards production of biopolymers. *Journal of chemical technology and biotechnology*, *90*(10), 1735-1751.

Hashimoto, K., Tsuboi, H., Iwasaki, S., & Shirai, Y. (1993). Effect of pH on the Production of Poly-β-Hydroxybutylate by Photosynthetic Bacteria, Rhodospirillum rubrum. *Journal of chemical engineering of Japan*, *26*(1), 56-58.

Heinrich, D., Raberg, M., & Steinbüchel, A. (2015). Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from unrelated carbon sources in engineered Rhodospirillum rubrum. *FEMS microbiology letters*, *362*(8).

Jay, J., Loessner, M., & Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed., pp. 39 - 57). Boston, MA: Springer Science+Business Media, Inc.

Heinrich, D., Raberg, M., Fricke, P., Kenny, S. T., Morales-Gamez, L., Babu, R. P., ... & Steinbüchel, A. (2016). Synthesis gas (Syngas)-derived medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthesis in engineered Rhodospirillum rubrum. *Applied and environmental microbiology*, *82*(20), 6132-6140.

Karmann, S., Follonier, S., Egger, D., Hebel, D., Panke, S., & Zinn, M. (2017). Tailor-made PAT platform for safe syngas fermentations in batch, fed-batch and chemostat mode with Rhodospirillum rubrum. *Microbial biotechnology*, *10*(6), 1365-1375.

Kerby, R. L., Ludden, P. W., & Roberts, G. P. (1995). Carbon monoxide-dependent growth of Rhodospirillum rubrum. *Journal of Bacteriology*, *177*(8), 2241-2244.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, *40*(2), 607-619.

Klasson, K. T., Lundbäck, K. M. O., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. (1993). Kinetics of light limited growth and biological hydrogen production from carbon monoxide and water by Rhodospirillum rubrum. *Journal of biotechnology*, *29*(1-2), 177-188.

Mohammadi, M., Najafpour, G. D., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M. H., & Mohamed, A. R. (2011). Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(9), 4255-4273.

Munasinghe, P. C., & Khanal, S. K. (2010). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: opportunities and challenges. *Bioresource technology*, *101*(13), 5013-5022.

Najafpour, G., Younesi, H., & Mohamed, A. R. (2004). Effect of organic substrate on hydrogen production from synthesis gas using Rhodospirillum rubrum, in batch culture. *Biochemical Engineering Journal*, *21*(2), 123-130.

Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *82*(3), 233-247.

Rabou, L. P., Zwart, R. W., Vreugdenhil, B. J., & Bos, L. (2009). Tar in biomass producer gas, the Energy research Centre of the Netherlands (ECN) experience: an enduring challenge. *Energy & Fuels*, *23*(12), 6189-6198.

Ramachandriya, K. D., Kundiyana, D. K., Sharma, A. M., Kumar, A., Atiyeh, H. K., Huhnke, R. L., & Wilkins, M. R. (2016). Critical factors affecting the integration of biomass gasification and syngas fermentation technology. *AIMS Bioeng*, *3*(2), 188-210.

Ray, B. (2004). *Fundamental food microbiology* (3rd ed., pp. 57 - 78). Boca Raton: CRC Press.

Reddy, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, *87*(2), 137-146.

Redl, S., Diender, M., Jensen, T. Ø., Sousa, D. Z., & Nielsen, A. T. (2017). Exploiting the potential of gas fermentation. *Industrial Crops and Products*, *106*, 21-30.

Revelles, O., Calvillo, I., Prieto, A., & Prieto, M. A. (2015). Syngas Fermentation for Polyhydroxyalkanoate Production in Rhodospirillum rubrum. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (pp. 105-119). Springer, Berlin, Heidelberg.

Revelles, O., Tarazona, N., García, J. L., & Prieto, M. A. (2016). Carbon roadmap from syngas to polyhydroxyalkanoates in Rhodospirillum rubrum. *Environmental microbiology*, *18*(2), 708-720.

Schultz, J. E., & Weaver, P. F. (1982). Fermentation and anaerobic respiration by Rhodospirillum rubrum and Rhodopseudomonas capsulata. *Journal of bacteriology*, *149*(1), 181-190.

Uffen, R. L. (1973). Growth properties of Rhodospirillum rubrum mutants and fermentation of pyruvate in anaerobic, dark conditions. *Journal of bacteriology*, *116*(2), 874-884.

Wainaina, S., Horváth, I. S., & Taherzadeh, M. J. (2017). Biochemicals from food waste and recalcitrant biomass via syngas fermentation: A review. *Bioresource technology, 248*, 113-121.

Xu, D., Tree, D. R., & Lewis, R. S. (2011). The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels. *biomass and bioenergy*, *35*(7), 2690-2696.

Yasin, M., Jeong, Y., Park, S., Jeong, J., Lee, E. Y., Lovitt, R. W., ... & Chang, I. S. (2015). Microbial synthesis gas utilization and ways to resolve kinetic and mass-transfer limitations. *Bioresource technology*, *177*, 361-374.

Zhu, H., Shanks, B. H., & Heindel, T. J. (2008). Enhancing CO− water mass transfer by functionalized MCM41 nanoparticles. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *47*(20), 7881-7887.