

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CIVILE, EDILE E AMBIENTALE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

Tesi di Laurea

**RECUPERO e PURIFICAZIONE DI POLIIDROSSIALCANOATI DA MASSA BATTERICA**

Relatore:

Ch.mo Prof.

Andreozzi Roberto

Candidati:

Lanzillo Francesco N49/451

Siesto Antonio N49/225

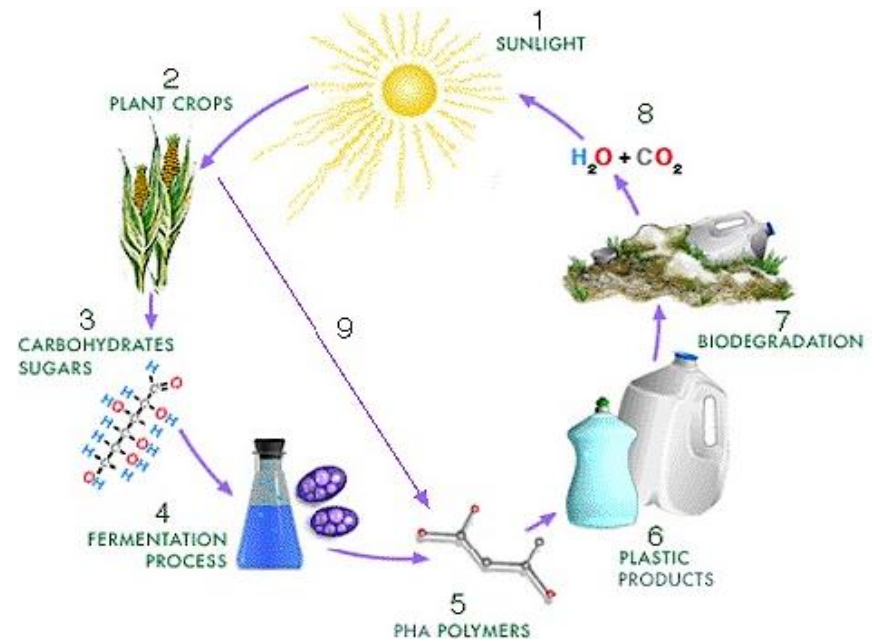
ANNO ACCADEMICO 2015/2016

# Oceani di plastica



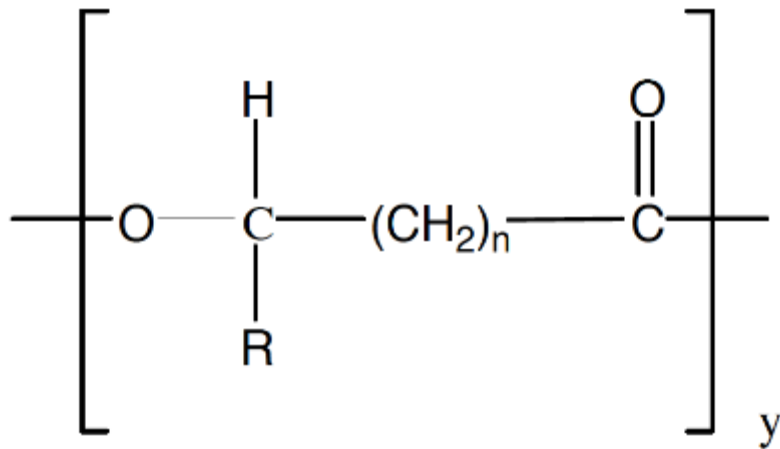
Al giorno d'oggi il largo impiego di plastiche derivate da fonti non rinnovabili come il petrolio, porta all'accumulo di circa 25 milioni di tonnellate di rifiuti non biodegradabili l'anno con gravi conseguenze per l'ambiente.

La green chemistry ha individuato nei biopolimeri o plastiche biodegradabili, prodotti da fonti rinnovabili, la soluzione al problema ambientale. Parlare di biodegradabilità ha senso se si stabilisce un tempo, il più possibile ristretto, entro cui un prodotto deve biodegradarsi.



# Cosa sono i biopolimeri ?

I biopolimeri sono polimeri preparati attraverso processi biologici, che conferiscono al prodotto finale un'elevata biodegradabilità.



- origine sintetica
  - PLA
- origine naturale
  - Polisaccaridi
  - (PHA)

**n** numero di gruppo CH<sub>2</sub>

**R** catena laterale

**y** numero di unità  
ripetente

Polidrossibutirrato → **P(3HB)**

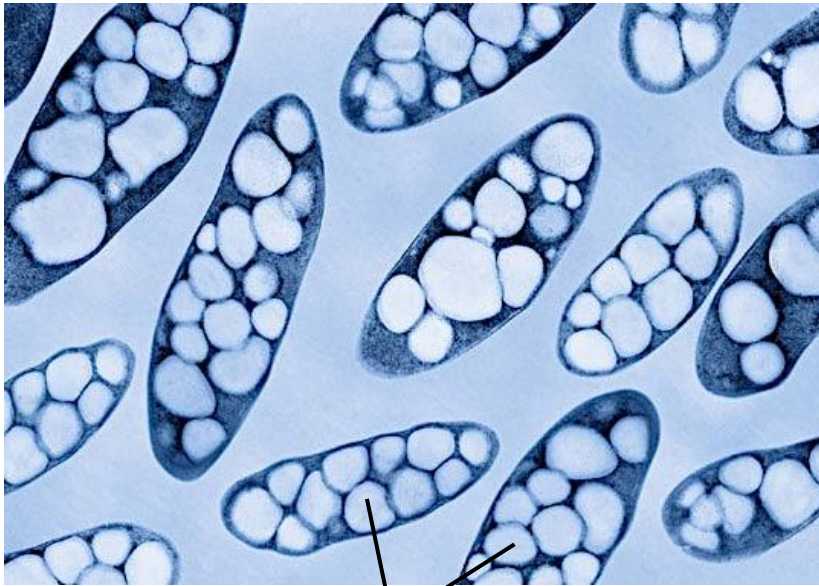
Polidrossivalerato → **P(3HV)**

# PHA

## poli(3-idrossialcanoati)

I PHA sono sintetizzati da più di 90 specie di batteri:

- *Pseudomonas*
- *Ralstonia eutropha*
- *Escherichia coli*



granuli di PHA  
0,2-0,5  $\mu\text{m}$

### Proprietà di PHA

- Peso molecolare
- Cristallinità
- Temperatura di fusione
- Fragilità (resistenza all'urto)
- Lavorabilità

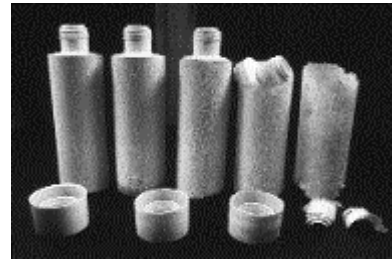
# PHA

## poli(3-idrossialcanoati)

Le **proprietà** dei PHA sono molto simili a quelle delle plastiche convenzionali derivanti dal petrolio. Infatti essi stanno sostituendo il polipropilene in un'ampia gamma di possibili applicazioni di largo consumo.



**POSATERIA**



**BOTTIGLIE**



**CAMPO MEDICO**



**FOOD PACKAGING**



L'ingresso sul mercato dei PHA è ancora scarso a causa del suo costo che supera quello delle plastiche tradizionali di almeno 5 volte.

## **SVANTAGGI ECONOMICI**



**Costi del processo di fermentazione**



**Costi delle tecnologie di recupero e purificazione  
(costituiscono il 50% del costo totale di produzione)**

# Obiettivo del lavoro di tesi :

Analisi di un lavoro scientifico finalizzato al recupero e alla purificazione di PHA batterici mediante metodi chimici



Biochemical Engineering Journal 39 (2008) 15–27

Biochemical  
Engineering  
Journal

[www.elsevier.com/locate/bej](http://www.elsevier.com/locate/bej)

Review

## Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)

Nicolas Jacquel<sup>a</sup>, Chi-Wei Lo<sup>b</sup>, Yu-Hong Wei<sup>c</sup>,  
Ho-Shing Wu<sup>b,c,\*</sup>, Shaw S. Wang<sup>b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Chemistry and Process Department, Ecole Supérieure de Chimie, Physique et Electronique de Lyon, France

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering and Materials Science, Yuan Ze University, ChungLi, Taiwan

<sup>c</sup> Graduate School of Biotechnology and Bioinformatics, Yuan Ze University, ChungLi, Taiwan

<sup>d</sup> Department of Chemical and Biochemical Engineering, Rutgers University, The State University of New Jersey, USA

Received 9 October 2006; received in revised form 19 November 2007; accepted 25 November 2007

# Produzione di PHA

## (per via fermentativa)

- **Utilizzo di colture pure:**

- ❖ Richiedono ambienti sterili e substrati selezionati
- ❖ Costi elevati

- **Utilizzo di colture miste:**

- ❖ Non richiedono ambienti sterili

- ❖ Minor costo del substrato  
(matrici organiche di scarto)

- Elevata disponibilità
- Elevata concentrazione di acidi grassi volatili (VFA)
- Zero costi di smaltimento



# Produzione di PHA

## (per via fermentativa)

L'utilizzo di colture miste comporta uno scarso consumo di substrato e una bassa capacità di accumulo



Non tutte le famiglie di microrganismi sono predisposte all'accumulo intracellulare di PHA



Mettere a punto un processo integrato anaerobico-aerobico che aumenti la percentuale di microrganismi capaci di dar luogo a un significativo accumulo di PHA.

# Le tre fasi del PHA

## ANAEROBICO

### ① ACIDOGENESI

Favorire l'acidogenesi alla metanogenesi per ottenere un effluente ricco di acidi grassi volatili (VFA) da utilizzare come materiale di partenza per la produzione di PHA

## AEROBICO

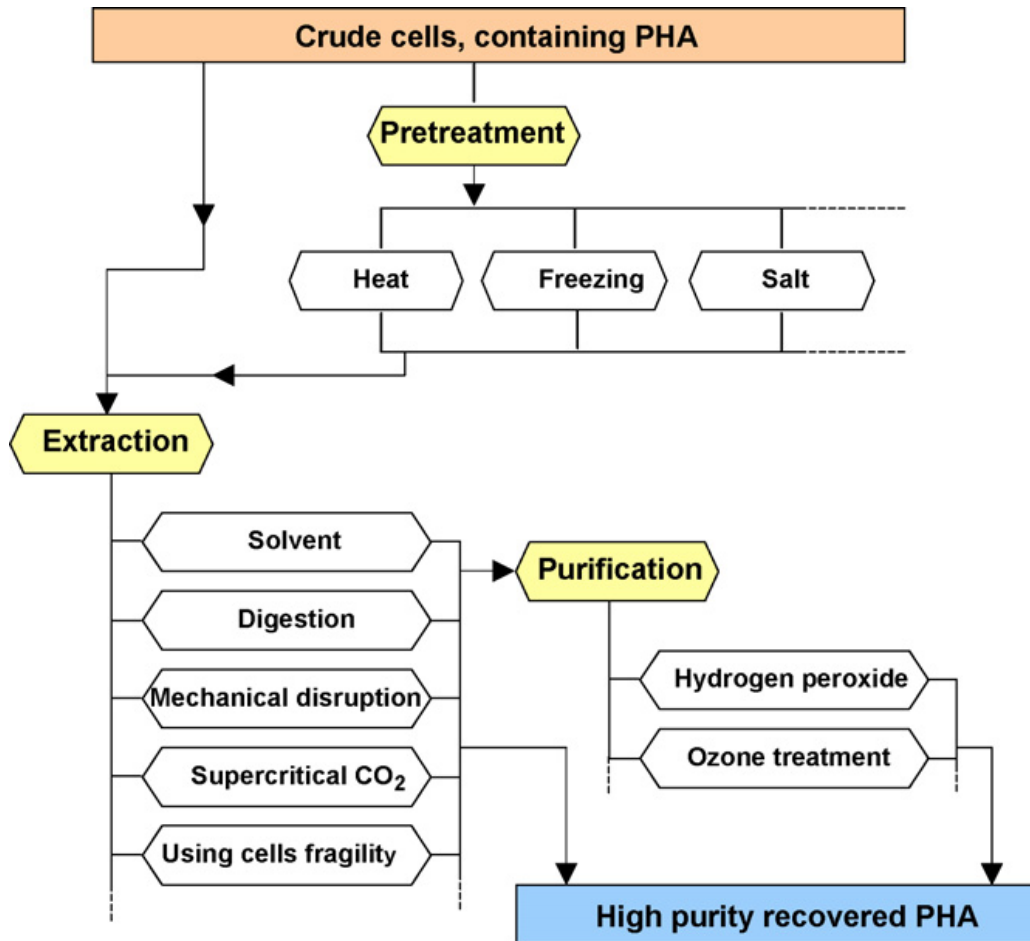
### ② FEAST E FAMINE

Processo aerobico a fanghi attivi in un reattore discontinuo sequenziale (SBR) mediante cicli di feast (eccesso di substrato) e famine (carenza di substrato)

### ③ ACCUMULO

Reattore batch alimentato da un effluente ricco in VFA in discontinuo per ottenere alte quantità di PHA intracellulare.

# Recupero di PHA

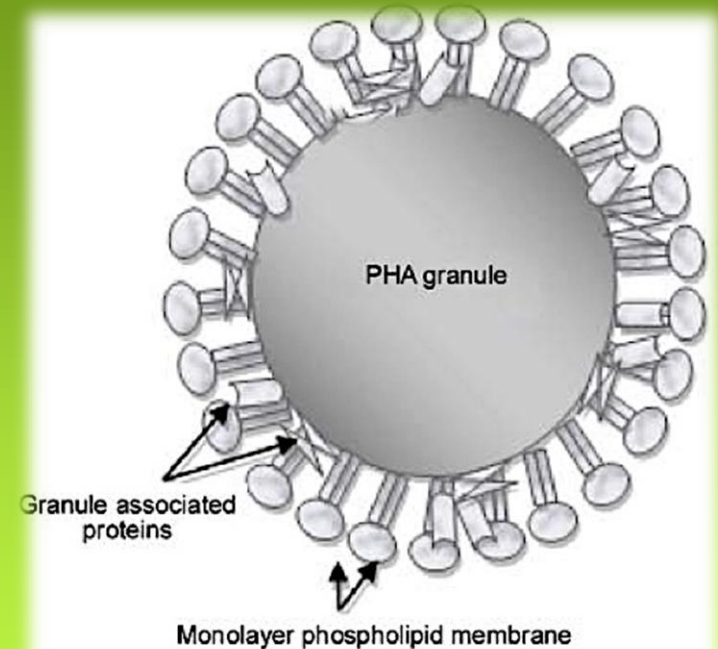


Il processo di recupero dalle cellule batteriche è articolato in 3 fasi:

1. **Pretrattamento** della massa cellulare
1. **Estrazione** del polimero dalla massa cellulare
2. **Purificazione** del polimero ottenuto

La **scelta del metodo** di estrazione dipende da:

- Ceppo batterico usato
- Tipo e quantità di PHA generato dalla cellula
- Livello di purezza da ottenere
- Eventuale disponibilità dei prodotti chimici
- Valore ottimale del peso molecolare

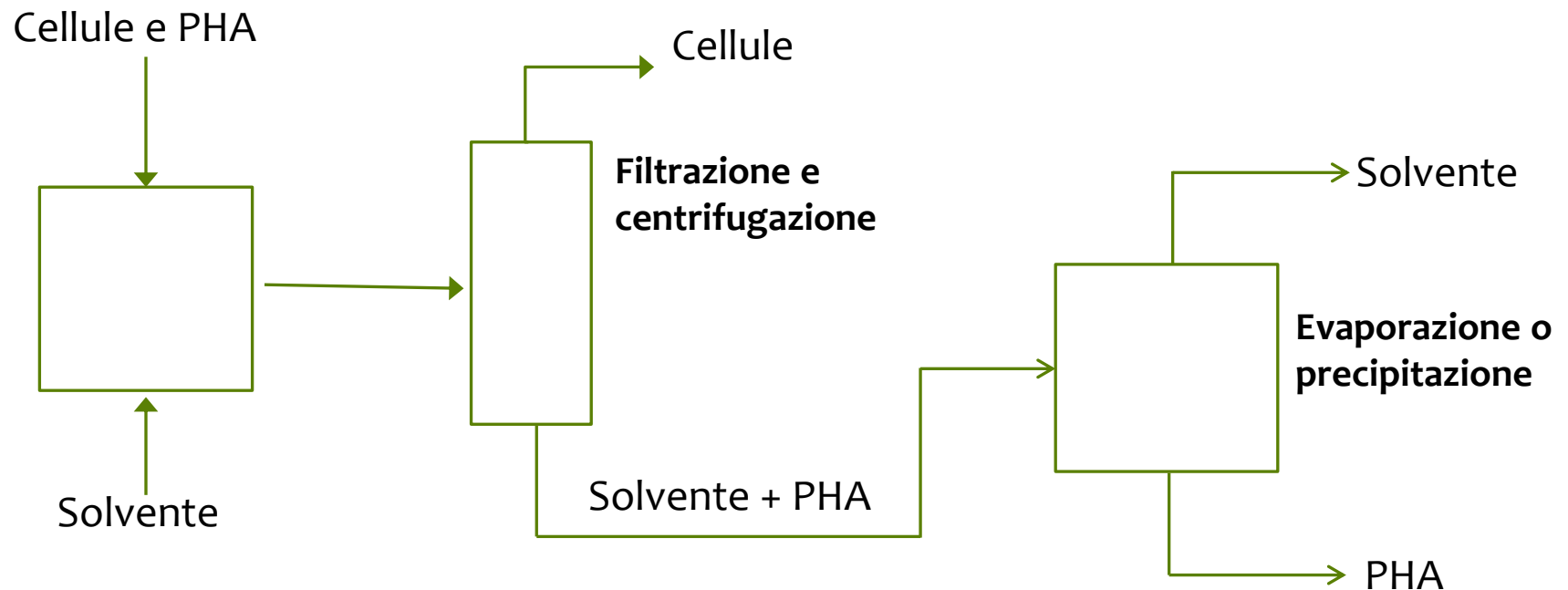


Per recuperare i granuli di PHA, è necessario rompere la cellula batterica e rimuovere lo strato di proteine che ricopre i granuli di PHA

# Estrazione con solvente

Il solvente modifica la permeabilità della membrana cellulare e solubilizza i PHA separandoli dalla massa cellulare.

L'estrazione con solvente permette quindi di separare sostanze con diversa solubilità.



# Estrazione con solvente

**Table 1.** Various PHA recovery methods that have been reported

Extraction method	Comments	Strain	Results	Reference
Solvent extraction	Chloroform	<i>Bacillus cereus</i> SPV	Purity: 92%; Yield: 31%	Valappil <i>et al.</i> [31]
	Chloroform	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Purity: 95%; Yield: 96%	Fiorese <i>et al.</i> [25]
	1,2-Propylene carbonate	<i>C. necator</i> DSM 545	Purity: 84%; Yield: 95%	Fiorese <i>et al.</i> [25]
	Acetone-water process		Yield: 80–85%	Narasimhan <i>et al.</i> [65]
	Methyl <i>tert</i> -butyl ether	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Yield: 15–17.5 wt%	Wampfler <i>et al.</i> [26]
	Methylene chloride	<i>C. necator</i>	Purity: 98%	Zinn <i>et al.</i> [66]
	Non halogenated solvents- isoamy propionate, propyl butyrate, isoamyl valcrat etc.	<i>C. necator</i>		Mantelatto and Durao [67]
Acetone, room temperature	<i>P. putida</i> GPo1	Yield: 94%	Elbahloul and Stein- büchel [64]	

Il cloruro di metilene (**Methylene chloride**) non consente un elevato recupero ma permette di ottenere un PHA con un alto valore di purezza (98%)



# Estrazione con solvente

## VANTAGGI

- Rimozione di endotossine
- Elevata purezza
- Degradazione del polimero trascurabile
- Elevato peso molecolare

## SVANTAGGI

- Inquinanti
- Consumo di grandi volumi di solventi tossici e volatili
- Costi elevati
- Difficoltà di estrazione di PHA da una soluzione contenente più del 5% (w/v) PHB



## SOLVENTI ALTERNATIVI

1,2 - propilene  
carbonato

etilacetato

# Metodi alternativi

1,2 propilene-  
carbonato



**BASSA TOSSICITÀ**

Alto punto di  
ebollizione  
(240 °C)

Evaporazione  
nell'ambiente a  
temperature più basse  
impedita

Minore rischio di  
inalazione in caso di  
incidenti

**Table 1.** Various PHA recovery methods that have been reported

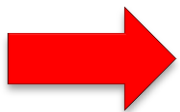
Extraction method	Comments	Strain	Results	Reference
Solvent extraction	Chloroform	<i>Bacillus cereus</i> SPV	Purity: 92%; Yield: 31%	Valappil <i>et al.</i> [31]
	Chloroform	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Purity: 95%; Yield: 96%	Fiorese <i>et al.</i> [25]
	1,2-Propylene carbonate	<i>C. necator</i> DSM 545	Purity: 84%; Yield: 95%	Fiorese <i>et al.</i> [25]
	Acetone-water process		Yield: 80–85%	Narasimhan <i>et al.</i> [65]
	Methyl <i>tert</i> -butyl ether	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Yield: 15–17.5 wt%	Wampfler <i>et al.</i> [26]
	Methylene chloride	<i>C. necator</i>	Purity: 98%	Zinn <i>et al.</i> [66]
	Non halogenated solvents- isoamy propionate, propyl butyrate, isoamyl valerat etc.	<i>C. necator</i>		Mantelatto and Durao [67]
	Acetone, room temperature	<i>P. putida</i> GPo1	Yield: 94%	Elbahloul and Stein- büchel [64]



# etilacetato

Experiment No.	Temperature (°C)	Time (min)	Recovered PHB (Average) (g/l)	Purity (%)	Yield (%)
1	21	30	1.65	85 ± 2	78 ± 4
2	25	0	1.7	97 ± 3	82 ± 3
3	25	60	1.84	86 ± 3	87 ± 3
4	35	0	1.79	98 ± 2	84 ± 3
5	35	30	1.73	98 ± 1	82 ± 2
6	35	30	1.74	98 ± 1	82 ± 1
7	35	30	1.74	99 ± 1	82 ± 3
8	35	30	0.8	98 ± 1	38 ± 1
9	35	30	1.77	97 ± 2	82 ± 1
10	35	72	1.48	99 ± 1	70 ± 2
11	45	0	0.7	99 ± 1	28 ± 3
12	45	60	0.6	99 ± 1	4.7 ± 1
13	49	30	0.1	99 ± 1	33 ± 2
Standard	-	-	2.2	99 ± 1	96 ± 1

L'estrazione con **clorofornio** (experiment standard) è stata utilizzata come metodo di riferimento per il confronto dei risultati



# etilacetato

**Table 1.** Properties of solvents that can be used for PHB recovery process.

Solvent	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Boiling point (°C)	Viscosity (cP)	Water solubility (g/100 ml)	Safety
Water	1	100	1	-	Safe
Ethyl acetate	0.89	77	0.42	8.3	Low toxicity
Butyl acetate	0.88	126	0.68	6.8	Medium toxicity
Ethanol	0.78	78	0.001	Infinite	Low toxicity
Chloroform	1.48	61	0.54	0.8	Toxic
Methanol	0.79	64	0.5	Infinite	Low toxicity
Propanol	0.80	98	1.9	Infinite	Low toxicity

specie	TLV-TWA, ppm	LFL, % vol	UFL, %vol	Flash-point, °C	Boiling point, °C
cloroformio	10	-----	-----	-----	61
etilacetato	400	2	12	- 4	77

**TLV-TWA** = Concentrazione limite alla quale i lavoratori possono essere esposti senza effetti sulla salute

**LFL** = limite di infiammabilità inferiore

**UFL** = limite di infiammabilità superiore

**Flash-point** = punto di infiammabilità

# Estrazione tramite digestione

La digestione permette l'estrazione dei granuli di PHA attraverso la digestione o disgregazione della membrana cellulare

## DIGESTIONE CHIMICA

- Con tensioattivo
- Ipoclorito di sodio
- Con tensioattivo e ipoclorito di sodio
- Con ipoclorito di sodio e cloroformio
- Protoni in soluzione acquosa

DIGESTIONE ENZIMATICA



**COSTI ELEVATI**

# Digestione chimica

## Con tensioattivo



SDS (Dodecil solfato di sodio anionico)

Si incorpora nella membrana cellulare provocandone la rottura → + tensioattivo + rottura

Solubilizza PHA e non-PHA

Digestion method				
Digestion by surfactants	Palmitoyl carnitine	<i>A. latus A. eutrophus</i>	Release rate >85%; release rate >70%	Lee et al. [28]
	High cell density digestion by SDS	<i>Ralstonia eutropha</i>	Purity >95%; recovery >90%	Kim et al. [29]
Digestion by hypochlorite	Sodium hypochlorite			Berger et al. [30]
	Sodium hypochlorite	<i>R. eutropha Recombinant E. coli.</i>	Purity: 86%; purity: 93%	Hahn et al. [31]
	Sodium hypochlorite	<i>Cupriavidus taiwanensis 184</i>	Purity: 99%; recovery: 94%	Lu [34]
		<i>Pseudomonas putida KT2442</i>	Purity: 99%; recovery: 78%	
	Sodium hypochlorite and anti oxidant			Roh et al. [35]
Dispersion of sodium hypochlorite in chloroform	Sodium hypochlorite and chloroform	<i>R. eutropha</i>	Purity: >97%; recovery: 91%	Hahn et al. [31]
	Sodium hypochlorite and chloroform with Al- and Fe-based coagulants	<i>R. eutropha</i>	Purity 90–94%; recovery 98–99%	Ryu et al. [37]
Surfactant-hypochlorite treatment	SDS-hypochlorite	<i>Azotobacter chroococcum G-3</i>	Purity: 98%; recovery: 86.6%.	Dong and Sun [38]
Chelate-surfactant	Surfactant-EDTA disodium salt	<i>R. eutropha</i>	Purity: 98.7%; recovery: 93.3%	Chen et al. [27]
	Recycled-wastewater process	<i>R. eutropha</i>	Purity: 96%; recovery: 90%	Chen et al. [39]
	Chelate-hydrogen peroxide	<i>R. eutropha</i>	Purity: 99.5%	Liddell [40]
	Selective dissolution by protons	<i>R. eutropha</i>	Purity: >96.4%; recovery: >94.8%	Yu and Chen [41]



# Digestione chimica

## Con tensioattivo (SDS)

### VANTAGGI

- Scinde le cellule senza degradare il polimero
- Recupero di PHA da alte densità cellulari (50-300 g di elemento secco/ L)
- Necessaria piccola dose di SDS

### SVANTAGGI

- Purezza < 97 %
- Dispendioso trattamento acque reflue

# Digestione chimica

## Con ipoclorito di sodio (NaClO)



Digestione selettiva dei materiali non-PHA

Digestion method				
Digestion by surfactants	Palmitoyl carnitine High cell density digestion by SDS	<i>A. latus A. eutrophus</i> <i>Ralstonia eutropha</i>	Release rate >85%; release rate >70% Purity >95%; recovery >90%	Lee et al. [28] Kim et al. [29]
Digestion by hypochlorite	Sodium hypochlorite Sodium hypochlorite Sodium hypochlorite  Sodium hypochlorite and anti oxidant	<i>R. eutropha</i> Recombinant <i>E. coli</i> . <i>Cupriavidus taiwanensis</i> 184 <i>Pseudomonas putidia</i> KT2442	Purity: 86%; purity: 93% Purity: 99%; recovery: 94% Purity: 99%; recovery: 78%	Berger et al. [30] Hahn et al. [31] Lu [34]
Dispersion of sodium hypochlorite in chloroform	Sodium hypochlorite and chloroform Sodium hypochlorite and chloroform with Al- and Fe-based coagulants	<i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i>	Purity: >97%; recovery: 91% Purity 90–94%; recovery 98–99%	Hahn et al. [31] Ryu et al. [37]
Surfactant-hypochlorite treatment	SDS-hypochlorite	<i>Azotobacter chroococcum</i> G-3	Purity: 98%; recovery: 86.6%	Dong and Sun [38]
Chelate-surfactant	Surfactant-EDTA disodium salt Recycled-wastewater process <i>Chelate-hydrogen peroxide</i> <i>Selective dissolution by protons</i>	<i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i>	Purity: 98.7%; recovery: 93.3% Purity: 96%; recovery: 90% Purity: 99.5% Purity: >96.4%; recovery: >94.8%	Chen et al. [27] Chen et al. [39] Liddell [40] Yu and Chen [41]

## VANTAGGI

- Elevata purezza

## SVANTAGGI

- Degrado PHA → riduzione peso molecolare

**SOLUZIONE** → pretrattamento termico e digestione con 4 ml di NaClO a 50°C  
→ antiossidante (NaHSO<sub>3</sub>)

# Digestione chimica

## Con tensioattivo (SDS) e ipoclorito di sodio (NaClO)

Trattamento di 30 g / L di **biomassa** con 10 g / L di **SDS** a 55 °C per 15 min e esponendolo al 30% di **NaClO** per 3 minuti a 30 °C

Digestion method				
Digestion by surfactants	Palmitoyl carnitine High cell density digestion by SDS	<i>A. latus A. eutrophus</i> <i>Ralstonia eutropha</i>	Release rate >85%; release rate >70% Purity >95%; recovery >90%	Lee et al. [28] Kim et al. [29]
Digestion by hypochlorite	Sodium hypochlorite Sodium hypochlorite Sodium hypochlorite  Sodium hypochlorite and anti oxidant	<i>R. eutropha</i> <i>Recombinant E. coli.</i> <i>Cupriavidus taiwanensis I 84</i> <i>Pseudomonas putidia KT2442</i>	Purity: 86%; purity: 93% Purity: 99%; recovery: 94% Purity: 99%; recovery: 78%	Berger et al. [30] Hahn et al. [31] Lu [34]  Roh et al. [35]
Dispersion of sodium hypochlorite in chloroform	Sodium hypochlorite and chloroform Sodium hypochlorite and chloroform with Al- and Fe-based coagulants	<i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i>	Purity: >97%; recovery: 91% Purity 90–94%; recovery 98–99%	Hahn et al. [31] Ryu et al. [37]
Surfactant-hypochlorite treatment	SDS-hypochlorite	<i>Azotobacter chroococcum G-3</i>	Purity: 98%; recovery: 86.6%	Dong and Sun [38]
Chelate-surfactant	Surfactant-EDTA disodium salt Recycled-wastewater process <i>Chelate-hydrogen peroxide</i> <i>Selective dissolution by protons</i>	<i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i> <i>R. eutropha</i>	Purity: 98.7%; recovery: 93.3% Purity: 96%; recovery: 90% Purity: 99.5% Purity: >96.4%; recovery: >94.8%	Chen et al. [27] Chen et al. [39] Liddell [40] Yu and Chen [41]

### VANTAGGI

- Alta qualità di PHA
- Recupero semplice e veloce
- Bassi costi rispetto all'estrazione con solvente

### SVANTAGGI

- Costi del doppio reagente
- Trattamento acque reflue per rimuovere i reagenti

# Estrazione con metodi di nuova generazione

## Con fluidi supercritici

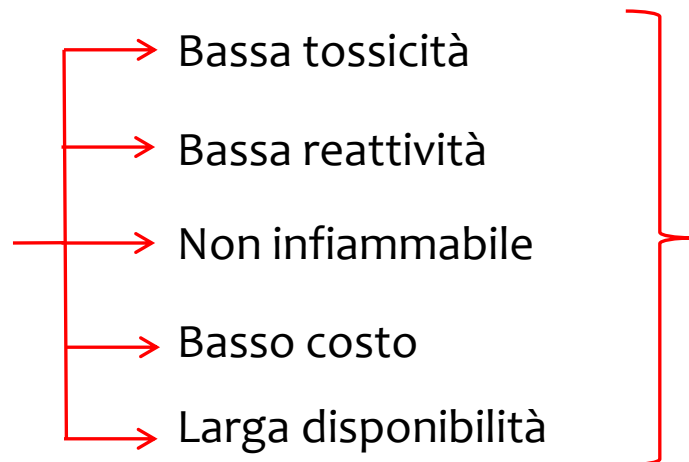
Caratterizzati da alta densità e bassa viscosità a temperatura maggiore di quella critica



Ottimo solvente per l'estrazione

Super-critical fluid		<i>R. eutropha</i>	Recovery: 89%	Hejazi et al. [54]
Recovery using cell fragility	Alkaline treatment	<i>Azotobacter vinelandii</i> UWD	Recovery: 94%	Page and Cornish [61]
	Alkaline treatment	Recombinant <i>E. coli</i>		Fidler and Dennis [62]
	Alkaline treatment	Recombinant <i>E. coli</i>	Purity: 98.5%	Choi and Lee [63]
	Alkaline treatment	Recombinant <i>E. coli</i>	Purity: 99%; recovery: 96%	Lu [34]
Air classification		<i>E. coli</i>	Purity ~97%; recovery ~90%	Noda [64]
Dissolved-air flotation		<i>Pseudomonas putida</i>	Purity: 86%	Van Hee et al. [65]
Spontaneous liberation		<i>E. coli</i>		Jung et al. [67]
		<i>E. coli</i>		Resch et al. [68]

CO<sub>2</sub>

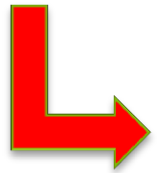


Condizioni ottimali del processo:

- Esposizione → 100 min.
- **Pressione → 200 atm**
- Temperatura → 40°C

# Estrazione con metodi di nuova generazione

## Con idrossido di sodio (NaOH)



ESPERIENZA IN LABORATORIO

### 1° STEP

Trattamento di biomassa ottenuta con acetato, contenente il 50% di P(3HB) con 0,2 M e 0,5 M di idrossido di sodio NaOH a 30°C per 1 h



# Estrazione con metodi di nuova generazione

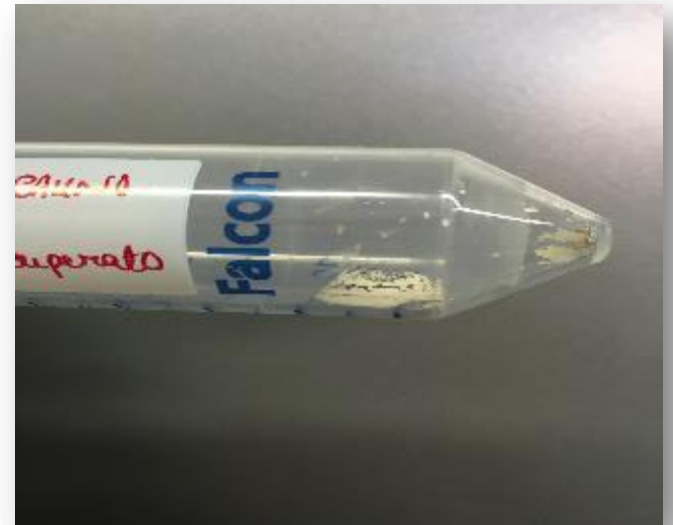


## 2° STEP

Separazione tramite centrifugazione del materiale P(3HB) dal materiale cellulare per 10 minuti a 10.000 rpm

## 3° STEP

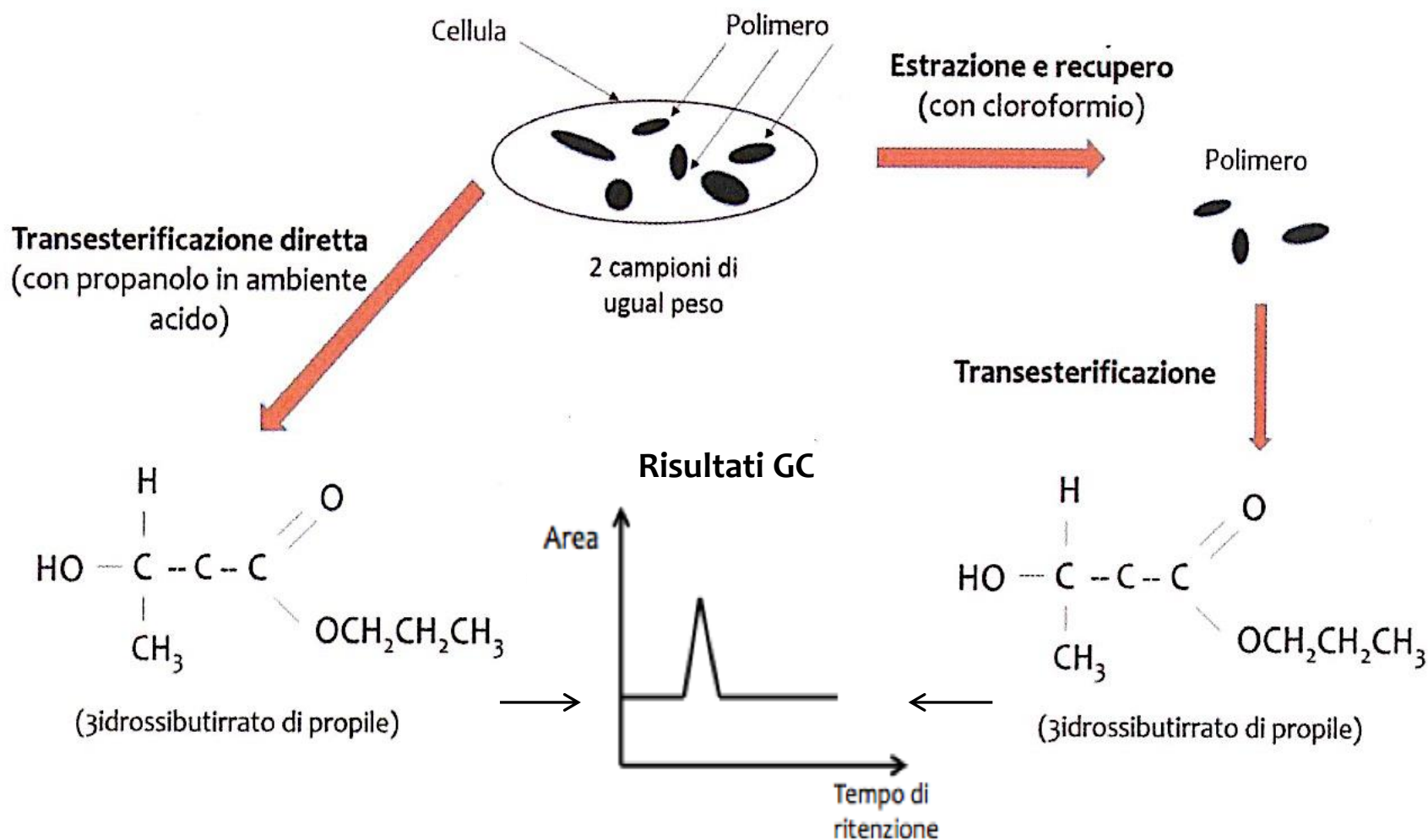
Dopo diversi lavaggi del polimero con acqua bidistillata si procede all'essiccamento in stufa a 60°C per una notte





# Analisi dei PHA

## Valutazione del recupero



# CONCLUSIONI

- Il **trattamento con solventi** è risultato essere il migliore per i valori di purezza e recupero ottenuti. Ci sono però dei problemi legati alla loro tossicità, per l'ambiente e per i lavoratori, i quali comportano costi aggiuntivi per la progettazione di sistemi di sicurezza
- Il trattamento con **fluidi supercritici** costituisce una soluzione valida al problema della tossicità riscontrato con i clorurati (cloroformio in primis). Tali metodi alternativi però non sembrano garantire l'ottenimento di un polimero che abbia le stesse caratteristiche.



**Utilizzo di metodi che permettano di ottenere un polimero con ottime caratteristiche utilizzando processi “green” ed economici**

***Grazie per l'attenzione !!***

