

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE**

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

**Tesi di Laurea**

**CONFRONTI DI METODI PER IL RECUPERO DI POLIDROSSIBUTIRRATO  
DA COLTURE BATTERICHE PURE**

**Relatore**

**Ch.mo Prof.**

**ANDREOZZI ROBERTO**

**Candidato**

**MIGLINO**

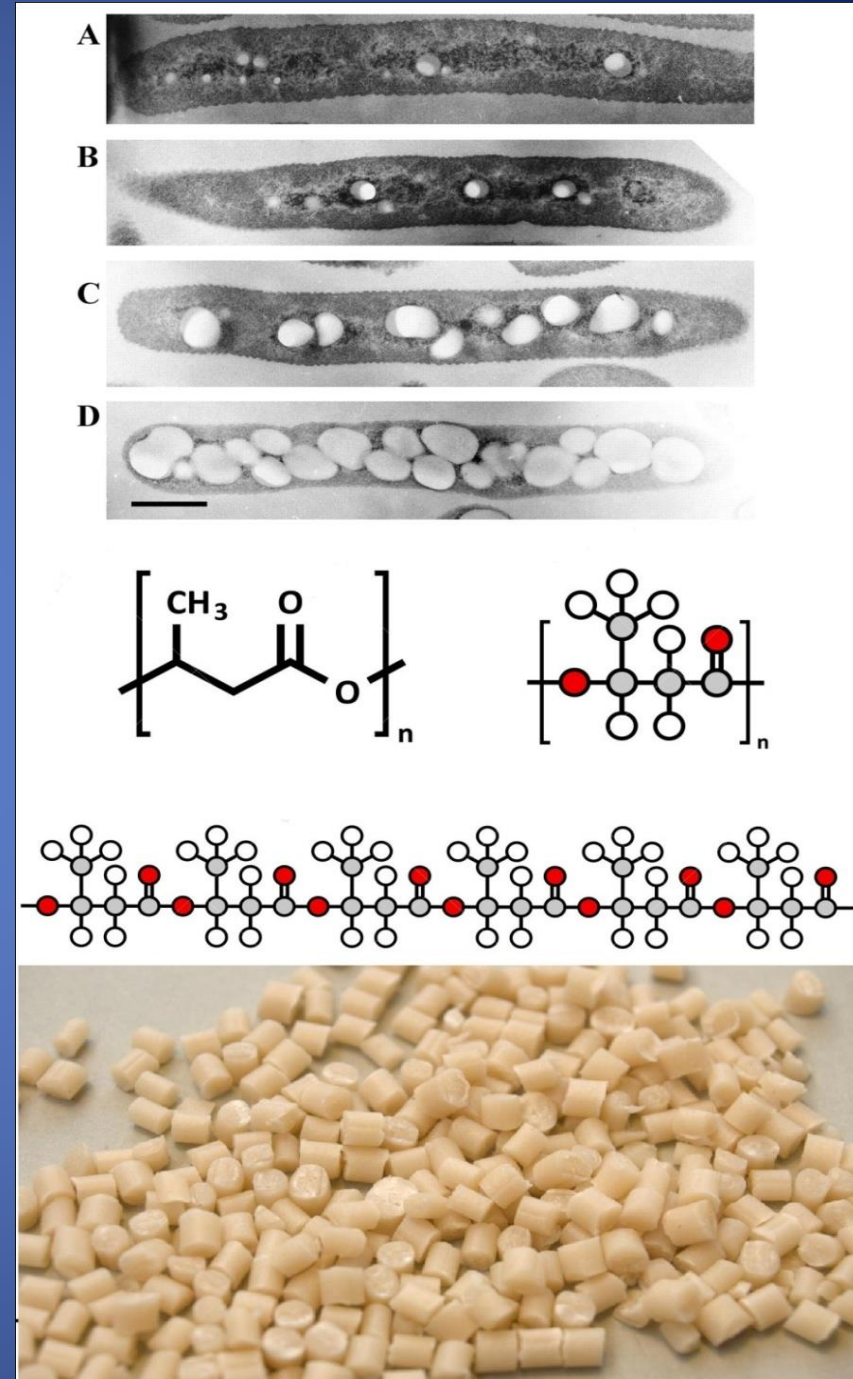
**DOMENICO**

**Matricola N49000241**

**ANNO ACCADEMICO 2014-2015**

# Introduzione ai Biopolimeri

Una via potenzialmente interessante per ridurre l'impatto ambientale delle plastiche convenzionali derivate dal petrolio è quella di sostituirle con polimeri biodegradabili. In questo contesto biopolimeri di origine biologica, come i polidrossialcanoati (PHA), di cui il polidrossibutirrato (PHB) ne è un esempio, sono un'interessante alternativa ecologica. Questi polimeri sono accumulati all'interno delle cellule batteriche come immagazzinamento di carbonio in eccesso. Tuttavia, la produzione di PHA in un modo economicamente efficace richiede lo sviluppo di trattamenti altamente efficienti di purificazione e recupero dalla massa cellulare, i quali costituiscono il 50% del costo di produzione. In questo studio, si andrà a fare il confronto tra quattro metodi di estrazione del biopolimero, economicamente efficaci ed ecologici, senza l'utilizzo di solventi alogenati, oppure usandone solo una minima parte. Confronteremo tre trattamenti alcalini e uno acido, di una coltura pura di batteri *Cupriavidus Necator*, con un processo standardizzato di estrazione del biopolimero tramite cloroformio.



# Estrazione tramite trattamenti chimici

## - PHB-R1: trattamento alcalino con idrossido di sodio (NaOH)

La digestione alcalina di biomassa viene effettuata utilizzando un contenuto solido fisso con soluzioni di NaOH a diverse concentrazioni, per un tempo, una temperatura ed rpm costanti. Successivamente, la procedura si ripete con la concentrazione ottimale di NaOH, selezionata nel passaggio precedente, facendo variare il contenuto dei solidi. I campioni sono stati centrifugati, e la fase solida è stata lavata due volte con acqua, una volta con etanolo e poi liofilizzata.

### PRO:

basse emissioni di CO<sub>2</sub>, bassi costi operativi.

### CONTRO:

bassa purezza, basso valore di mercato, bassa temperatura di decomposizione.

# Estrazione tramite trattamenti chimici

## - PHB-R2: trattamento alcalino con ipoclorito di sodio (NaOCl)

Una soluzione di NaOCl commerciale (13% v/v) viene utilizzata per eseguire la digestione della biomassa a diverso contenuto di solidi, per un tempo, una temperatura ed rpm costanti. I campioni sono stati separati nello stesso modo, precedentemente descritto. In questo caso però parte della biomassa non riesce ad essere digerita dalla soluzione alcalina, restando in forma di solido insolubile.

### PRO:

recupero semplice ed efficace, basso consumo d'acqua, alta purezza, alta temperatura di decomposizione.

### CONTRO:

alti costi operativi, alte emissioni di CO<sub>2</sub>, alta degradazione del polimero.

# Estrazione tramite trattamenti chimici

- PHB-R3: trattamento con ipoclorito di sodio e diclorometano

Per la digestione della biomassa e l'estrazione del biopolimero si utilizza una combinazione di una soluzione di NaOCl, nelle condizioni precedenti, e il solvente alogenato diclorometano CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>. Il polimero viene fatto precipitare aggiungendo etanolo, poi viene lavato con acqua ed etanolo e liofilizzato.

## PRO:

alta temperatura di decomposizione, alta efficienza di recupero, alta purezza, bassa degradazione del polimero.

## CONTRO:

alti costi operativi, alte emissioni di CO<sub>2</sub>.

# Estrazione tramite trattamenti chimici

## - PHB-R4: trattamento con acido solforico (H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>)

Al fine di individuare le condizioni ottimali per la digestione della biomassa e del recupero del biopolimero, sono state variate la concentrazione di H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, il tempo e la temperatura di esposizione della biomassa al trattamento acido. La soluzione viene poi riportata, con aggiunta di NaOH, a un PH di 10, il solido viene lavato con acqua e trattato con NaOCl per rimuovere residui di proteine.

### PRO:

bassi costi operativi, bassa emissione di CO<sub>2</sub>, alta purezza, alta temperatura di decomposizione, bassa degradazione.

### CONTRO:

recupero più basso rispetto al trattamento con NaOCl e CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>, ma in media con gli altri trattamenti analizzati (79%).

# Estrazione tramite trattamenti chimici

## - PHB-R4\*: trattamento con acido solforico in condizioni severe

Digestione della biomassa e recupero del biopolimero , tramite lo stesso trattamento acido, visto precedentemente, con aumento della temperatura a 100 °C, concentrazione di H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> al 10% v/v e un tempo di 15 h.

### PRO:

bassi costi operativi, bassa emissione di CO<sub>2</sub>, alta purezza, alto grado di cristallinità.

### CONTRO:

alta degradazione, basso livello di recupero (65%).

# Confronto fra le % di purezza e le % di recupero dei trattamenti di estrazione del biopolimero

M.Lopez-Abelairas et al. / Biochemical Engineering Journal 93 (2015) 250-259

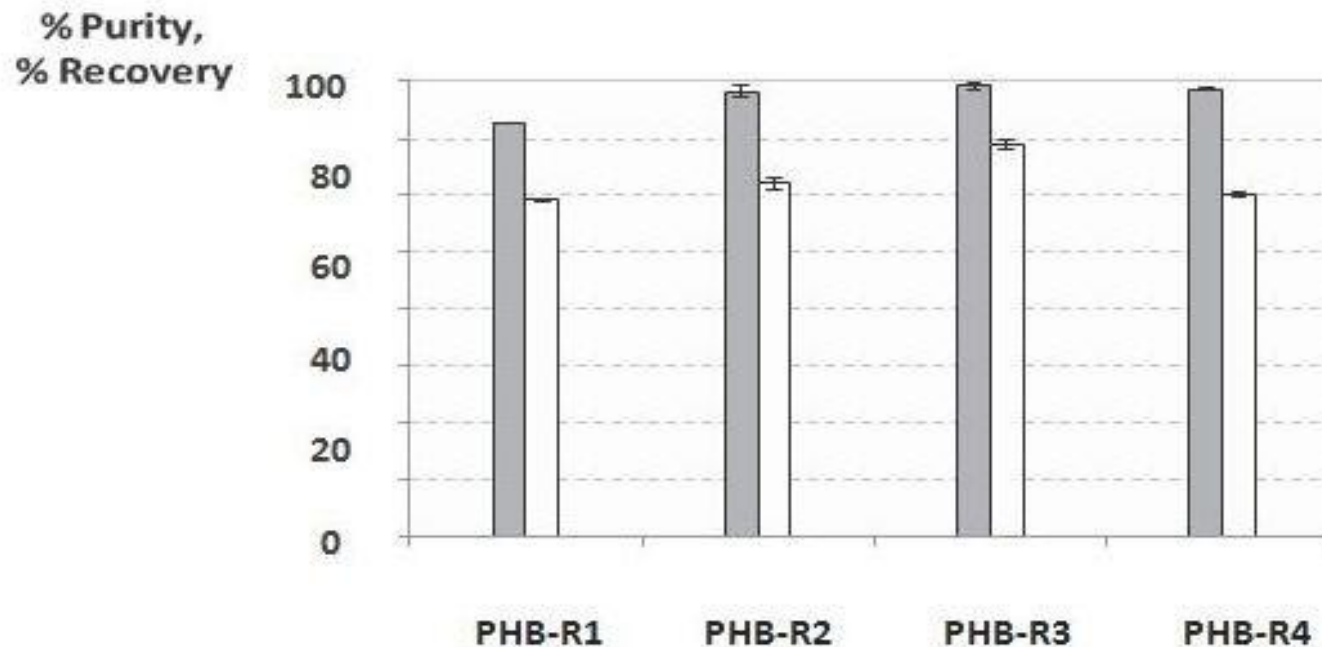


Fig. 2. Percentuali di purezza (barre grigie) e di recupero (barre bianche) per i metodi di estrazione sotto condizioni ottimali (i.e., PHB-R1: soluzione di 0.5 N NaOH e 2.5% w/v di contenuto solido, PHB-R2 e PHB-R3: 2.5% w/v di contenuto solido e PHB-R4: soluzione 0.64 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5% w/v di contenuto solido in 6 h).



# Caratteristiche dei biopolimeri estratti tramite differenti metodi di recupero

Trattamento	Condizioni ottimali	Tm (°C)	Td (°C)	$\Delta H(Jg^{-1})$	Xc	Mn(kDa)	Mw(kDa)	PI	DP
PHB-R1	Soluzione 0,5N NaOH, 2.5 cont.solido, 4h, 37°C	159-171	221-247	76.45	0.52	98 ± 5	283 ± 1	2.90 ± 0.15	1140
PHB-R2	Soluzione di ipoclorito di sodio (13% v/v), 2.5%w/v contenuto solido, 4h, 37°C	151-159	284-294	87.55	0.60	36 ± 2	249 ± 2	6.82 ± 0.38	420
PHB-R3	Soluzione Diclorometano e Ipoclorito di sodio(13% v/v), 2.5% w/v cont.solido, 4h, 37°C	152-167	281-296	88.10	0.60	138 ± 5	361 ± 2	2.61 ± 0.10	1605
PHB-R4	Soluzione H2 SO4 (3.5% v/v) 5% cont. solido, 6h, 80°C	159-171	286-300	76.38	0.52	130 ± 4	395 ± 1	3.03 ± 0.10	1510
PHB-R4*	Soluzione H2 SO4 (10% v/v) 5% w/v cont. solido, 15h, 100°C	152-165	285-303	123.1	0.84	44 ± 3	321 ± 1	7.29 ± 0.50	510
Controllo	Estrazione con Cloroformio	149-165	283-310	87.15	0.60	521 ± 5	837 ± 2	1.61 ± 0.02	6058

# Analisi Economica

Oltre ai dati riportati in Tab.2, si è dimostrato che la dissoluzione acida potrebbe essere parzialmente riutilizzata, sostituendo circa il 20% del volume con soluzione fresca senza perdere efficienza durante il trattamento, e inoltre le soluzioni alcaline potrebbero essere parzialmente riutilizzate con un tasso di sostituzione del 40% che comporta una minima riduzione nella purezza del polimero recuperato (2%).

M.Lopez-Abelairas et al. / Biochemical Engineering Journal 93 (2015) 250-259

**Tabella 2**

Costi operativi associati a ogni metodo isolato.

Costi	Trattamento					
	PHB-R1	PHB-R2	PHB-R3	PHB-R4		
	€ h <sup>-1</sup>					
Sost. chimiche <sup>a</sup>						
NaOH	0.10	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	42	19	19	20
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.08	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	–	–	–	36
NaOCl	0.11	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	–	2288	2288	506
EtOH	0.76	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	472	472	624	–
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.36	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	–	–	118	–
Elettricità	0.017	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	5.51	5.51	18	5.51
Vapore	13.80	€ kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	7.11	6.76	759	11.87
Costi totali	€ kg <sup>-1</sup> PHB		1.02	5.23	6.6	1.11

<sup>a</sup> Acqua bi-distillata è stata usata per condurre gli esperimenti.

<sup>b</sup> [http://www.sunivo.com/ennew/Products/Products\\_list.asp](http://www.sunivo.com/ennew/Products/Products_list.asp).

<sup>c</sup> ASPEN database.

# Analisi sul rischio ambientale

I metodi di estrazione che richiedono la maggior quantità di prodotti chimici (PHB-R2 e R3) presentano il maggiore impatto ambientale. Le emissioni più basse sono generate dall'uso di idrossido di sodio e dell'acido solforico.

M.Lopez-Abelairas et al. / Biochemical Engineering Journal 93 (2015) 250-259

**Tabella 3**

Emissioni di gas serra relative ad ogni sostanza ed emissioni totali calcolate per ogni processo.

	Emissioni		Trattamento			
			PHB-R1	PHB-R2	PHB-R3	PHB-R4
			kg CO <sub>2</sub> -eq/h			
Sost. Chimiche <sup>a</sup>						
NaOH	0.47	kg CO <sub>2</sub> -eq/kg <sup>b</sup>	196	90	90	96
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.21	kg CO <sub>2</sub> -eq/kg <sup>b</sup>	–	–	–	95
NaOCl	0.66	kg CO <sub>2</sub> -eq/kg <sup>c</sup>	–	13728	13728	3036
EtOH	3.00	kg CO <sub>2</sub> -eq/kg <sup>d</sup>	1863	1863	246	–
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.00	kg CO <sub>2</sub> -eq/kg <sup>d</sup>	–	–	15	–
Elettricità	0.128	kg CO <sub>2</sub> -eq/MJ <sup>b</sup>	43	43	14	43
Vapore	0.03	kg CO <sub>2</sub> -eq/kg <sup>b</sup>	0.54	0.52	57.8	0.91
Emissioni totali		kg CO <sub>2</sub> -eq/kg PHB	4.08	29.46	28.7	6.27

<sup>a</sup> Acqua bi-distillata è stata utilizzata per condurre gli esperimenti.

<sup>b</sup> [http://biograce.net/content/ghgcalculationtools/standardvalues/Bio=Grace\\_additional\\_standard\\_values\\_version\\_1\\_Public.pdf](http://biograce.net/content/ghgcalculationtools/standardvalues/Bio=Grace_additional_standard_values_version_1_Public.pdf).

<sup>c</sup> <http://www.waterrf.org/PublicReportLibrary/4443.pdf>.

<sup>d</sup> [lca.ncms.org/VOC/CradleToSpray.xls](http://lca.ncms.org/VOC/CradleToSpray.xls).

# Conclusioni

Il trattamento acido è una scelta efficace per il recupero di PHB dalle cellule, con un polimero di elevate efficienza di recupero e percentuale di purezza. Il trattamento con acido garantisce anche una minore degradazione del polimero ed emissioni di gas serra inferiori rispetto ai trattamenti con ipoclorito. La digestione con NaOH è certamente un trattamento a basso costo, ma esso raggiunge un' inferiore purezza del polimero rispetto ai trattamenti con ipoclorito di sodio o acido solforico. Inoltre i trattamenti che adoperano ipoclorito di sodio esibiscono gli impatti ambientali più negativi.