

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Scuola Politecnica e della Scienze di Base

Corso di Laurea di
Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

Tesi di Laurea

Trattamento chimico alcalino per la purificazione
del poliidrossibutirrato prodotto da una coltura mista

Relatore:

Ch.mo Prof. Roberto Andreozzi

Candidata:

Livia Carullo

Matr. N49/11

Anno Accademico 2014/15



Problema della sostituzione delle plastiche

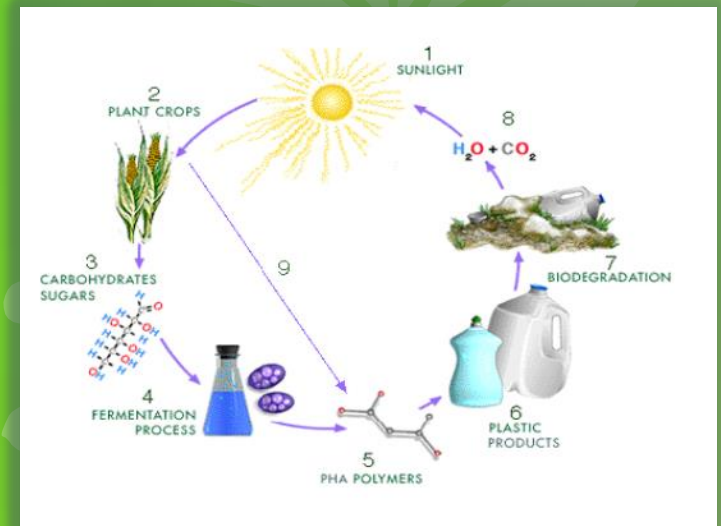
Per inquinamento causato dalla plastica si intende la dispersione e l'accumulo di prodotti plastici nell'ambiente causando problemi alla fauna e alla flora selvatica, così come all'habitat antropizzato. La rilevanza di questo tipo di inquinamento è data dalla economicità della plastica e dalla sua alta durabilità nel tempo e quindi alla produzione di grandissimi quantitativi della stessa per i più svariati usi.



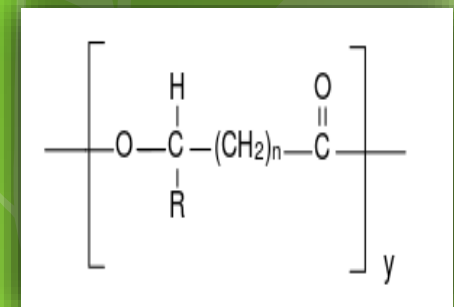
Con il termine “plastica biodegradabile” si fa riferimento a un tipo di plastica prodotta a partire da materia organica oppure a base di poliesteri sintetici caratterizzati da biodegradabilità.

I *polimeri biodegradabili* possono essere visti come alternativa alle plastiche convenzionali, con lo scopo di combattere l'inquinamento ambientale.

La principale differenziazione tra polimeri biodegradabili e non, è data soprattutto dal tempo e quindi dalla possibilità dei microorganismi di poter compiere l'azione demolitiva riducendo le macromolecole organiche che lo compongono in molecole più semplici, fino a riportarle ad uno stadio inorganico (acqua e anidride carbonica).



Polimeri Biodegradabili  PHA (PHB)



Recupero e Purificazione del PHA



Costi Elevati

Materie prime da sottoporre a fermentazione

Processi successivi per il recupero e depurazione dei prodotti

Costi aggiuntivi per mantenere la coltura pura durante la fase di fermentazione (es. costi di esercizio, quali quelli relativi all'addetto, alla fermentazione e all'energia necessaria alla sterilizzazione)

Materiali

- Estrazione Solvente
- Solvente + Alkali
- Soluzione Acida
- Soluzione Alcalina

SCOPO DEL LAVORO DI TESI:



**Analisi di un lavoro scientifico finalizzato al recupero di
PHB da una coltura mista in soluzione alcalina**

Articolo di Riferimento:

Jiang *et al.* *AMB Express* (2015) 5:5
DOI 10.1186/s13568-015-0096-5

 **AMB Express**
a SpringerOpen Journal

ORIGINAL ARTICLE

Open Access

Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture

Yang Jiang¹, Gizela Mikova², Robbert Kleerebezem¹, Luuk AM van der Wielen¹ and Maria C Cuellar^{1*}

Yang Jiang¹, Gizela Mikova², Robbert Kleerebezem¹, Luuk AM van der Wielen¹, and Maria C Cuellar^{1*}

enriched culture

Cosa è stato fatto:

○ Produzione Biomassa

La biomassa è stata prodotta in un reattore batch, fornendo ad essa acetato in assenza e in presenza di determinati nutrienti per i batteri.

Per rimuovere i materiali cellulari, sono stati utilizzati due approcci diversi:

- Alcalino (NaOH con concentrazione varia tra i 0.02 M e 1 M, o NH₄OH pari a 0.2 M)
- Tensioattivo (le concentrazioni di SDS variano tra lo 0.0025% e lo 0.2%)

○ Recupero del PHB

La sospensione di biomassa con l'aggiunta di sostanze chimiche è stata rinchiusa all'interno di tubi e successivamente centrifugata. Il surnatante è stato separato dal residuo solido e raccolto per l'analisi dei monomeri.

Oltre alla biomassa fresca, è stata oggetto di studio anche quella pretrattata (congelamento o liofilizzazione) al fine di studiarne l'influenza sul recupero del PHB

Valutazione dei Risultati:

- ❖ Recupero
- ❖ Purezza
- ❖ Peso Molecolare
- ❖ Stabilità Termica

Risultati (1):

Table 1 Summary of all experiments conducted in this study

Chemical	Concentration	Biomass state	Time	Initial PHB content	Purity	Recovery	Mass balance	HB/PHB ^c
[-]	[M ₂ w/v%]	[-]	[h]	[wt%]	[%]	[%]	[%]	[%]
NaOH	0.02	Fresh	1	71.8 ± 5.7	77.3 ± 4.0	92.2 ± 4.2	-1.0 ± 3.7	97.9 ± 5.3
NaOH	0.05	Fresh	1	72.7 ± 7.1	84.0 ± 1.4	94.7 ± 3.2	-3.9 ± 2.9	96.7 ± 4.2
NaOH	0.10	Fresh	1	65.3 ± 3.1	83.8 ± 4.4	98.0 ± 1.4	-1.0 ± 1.4	92.1 ± 8.5
NaOH	0.20	Fresh	1	69.4 ± 1.1	86.6 ± 3.0	96.7 ± 1.9	-0.7 ± 2.6	97.5 ± 16.7
NaOH	0.20	Fresh	0.5	68.6 ± 0.7	87.3 ± 2.2	96.4 ± 2.6	-2.9 ± 2.4	85.9 ± 14.8
NaOH	0.20	Fresh	0.5	68.6 ± 0.7	88.8 ± 0.8	98.5 ± 1.8	-0.7 ± 1.8	90.9 ± 18.9
NaOH	0.20	Fresh	3	68.6 ± 0.7	92.1 ± 0.8	93.5 ± 2.4	-1.5 ± 0.6	92.0 ± 3.2
NaOH	0.40	Fresh	1	65.3 ± 3.1	87.9 ± 5.4	95.2 ± 3.7	0.7 ± 3.1	89.9 ± 4.8
NaOH	0.70	Fresh	1	65.3 ± 3.1	89.7 ± 5.8	90.9 ± 5.0	0.4 ± 4.4	89.4 ± 7.1
NaOH	1.00	Fresh	1	65.3 ± 3.1	90.6 ± 4.7	85.6 ± 2.3	-0.3 ± 2.1	89.1 ± 4.0
NH ₄ OH	0.20	Fresh	1	68.6 ± 0.7	62.6 ± 2.8	63.3 ± 16.4	-3.9 ± 0.9	36.3 ± 10.9
SDS	0.20	Fresh	1	68.0 ± 0.0	79.0 ± 1.4	63.5 ± 0.7	3.6 ± 0.6	14.0 ± 1.4
NaOH + SDS	0.20 + 0.025	Fresh	1	66.1 ± 2.2	94.9 ± 2.6	92.6 ± 6.9	-2.7 ± 3.8	94.2 ± 6.4
NaOH + SDS	0.20 + 0.050	Fresh	1	66.1 ± 2.2	96.9 ± 1.3	93.5 ± 4.8	-2.4 ± 2.4	92.4 ± 3.1
NaOH + SDS	0.20 + 0.100	Fresh	1	66.1 ± 2.2	98.3 ± 0.5	91.5 ± 5.9	-3.9 ± 4.8	96.3 ± 4.8
NaOH + SDS	0.20 + 0.200	Fresh	1	66.1 ± 2.2	99.1 ± 0.5	91.0 ± 4.9	-3.1 ± 1.9	92.5 ± 5.0
NaOH	0.20	Freezing	1	65.9 ± 2.4	94.1 ± 3.5	95.6 ± 2.5	-2.9 ± 2.1	94.3 ± 5.4
NaOH	0.20	Freeze dried	1	69.9 ± 2.2	95.9 ± 3.7	95.5 ± 0.6	-3.2 ± 0.8	98.8 ± 0.9
NH ₄ OH	0.20	Freeze dried	1	69.9 ± 2.2	87.4 ± 2.1	95.0 ± 1.8	-3.9 ± 0.9	87.1 ± 12.9
SDS	0.20	Freeze dried	1	69.9 ± 2.2	93.5 ± 4.1	93.7 ± 2.2	-3.1 ± 1.6	91.3 ± 8.7
CH ₂ Cl ₂	30 ^a	Freeze dried	o/n ^b	72.2 ± 0.4	97.6	55.9	ND	ND

^a30 times of TSS.

^bOvernight.

^cFraction of hydrolyzed monomer in total polymer in the supernatant.

Risultati (2):

Table 2 Molecular weight (number average M_n and weight average M_w) and molecular weight change $\left(\left(\frac{M_{n,t}-M_{n,0}}{M_{n,0}}\right) \times 100\right)$ of various PHB samples as a function of thermal treatment at 170°C.

Sample	Chemical treatment	PHB purity [wt.%]	Time of thermal treatment at 170°C [min]	M_n [kg/mol]	M_w [kg/mol]	$\left(\frac{M_{n,t}-M_{n,0}}{M_{n,0}}\right) \times 100$ [%]	
Commercial PHB	-	99	0	182	647	0	
			1	169	583	7	
			3	175	541	4	
			5	119	391	35	
			10	150	435	18	
			15	135	373	26	
PHB from biomass	-	67	0	135	224	0	
			1	51	111	62	
			3	33	62	76	
			5	30	42	78	
			10	25	34	81	
			15	19	25	86	
		Solvent	99	0	915	1755	0
				1	883	1731	3
				3	824	1573	10
				5	771	1562	15
				10	516	1144	44
		0.2 M NaOH	85	0	119	315	0
				1	19	39	84
				3	8	13	93
				5	6	8	95
10	2			3	98		
0.2 M NaOH + 0.2% SDS	95	0	163	484	0		
		1	45	73	72		
		3	14	23	91		
		5	11	20	93		
		10	4	8	98		
15	3	4	98				

Water content in the samples was in between 0.01 and 0.02 wt.%.

Tabella di confronto:

Table 5 Literature comparison

Bacteria species	Biomass status	Chemical	Concentration	Initial PHA content	Purity	Recovery	Reference
<i>E. coli(rec)</i>	Frozen	NaOH	0.1	77%	91%	90%	Choi and Lee (1999)
<i>E. coli</i>	Frozen	SDS	0.5%	77%	98%	87%	Choi and Lee (1999)
<i>E. coli</i>	Frozen	NH ₄ OH	0.1	77%	85%	95%	Choi and Lee (1999)
<i>E. coli</i>	Frozen	H ₂ SO ₄	0.1	77%	79%	87%	Choi and Lee (1999)
<i>C.necator</i>	Lyophilized	NaOH	0.1	38%	97%	97%	(Mohammadi et al. 2012a, b)
<i>C.necator</i>	Lyophilized	NaOH	0.1	60%	80%	90%	Anis et al. (2012)
<i>C.necator</i>	Lyophilized	NH ₄ OH	0.1	60%	60%	62%	Anis et al. (2012)
<i>Comamonas</i>	Lyophilized	NaOH	0.05	34%	89%	97%	(Mohammadi et al. 2012a, b)
<i>R.eutropha</i>	Lyophilized	NaOH	N.D.	70%	78%	45%	Yang et al. (2011)
<i>R.eutropha</i>	Lyophilized	SDS	5%	70%	90%	81%	Yang et al. (2011)
<i>R.eutropha</i>	Lyophilized	SDS	1%	50%	87%	N.D.	Ramsay et al. (1990)
<i>P.putida</i>	Lyophilized	NaOH	0.1	20%	40%	95%	Jiang et al. (2006)
<i>E. coli</i>	Oven dried	NaOH + SDS	0.1 + 10%	60%	87%	96%	Peng et al. (2013)
<i>R.eutropha</i>	Fresh	SDS	0.5%-20%	75%	97%	92%	Kim et al. (2003)
<i>R.eutropha</i>	Fresh	H ₂ SO ₄	1	60%	76%	94%	Yu and Chen (2006)
<i>A.vinelandii</i>	Fresh	NH ₃	1	84%	94%	N.D.	Page and Cornish (1993)
<i>C.nector</i>	Fresh	NaOH	0.1	68%	84%	91%	Anis et al. (2013)
<i>E. coli</i>	Fresh	NaOH	0.2	79%	97%	91%	Choi and Lee (1999)
<i>P.acidivorans</i> *	Fresh	NaOH	0.2	68%	89%	97%	This study
<i>P.acidivorans</i> *	Fresh	NH ₄ OH	0.2	68%	65%	78%	This study
<i>P.acidivorans</i> *	Lyophilized	NH ₄ OH	0.2	68%	87%	96%	This study
<i>P.acidivorans</i> *	Fresh	NaOH + SDS	0.2 + 0.2%	68%	99%	95%	This study

*Dominant bacterial species in the mixed culture at the cultivation conditions of this study.

Conclusioni:

- ✓ Il PHB prodotto dalle colture miste arricchite, è stato trovato utile per applicazioni termoplastiche dopo essere stato purificato attraverso il metodo che prevede l'impiego del solvente.
- ✓ Mentre il metodo che prevede il solo agente alcalino ha portato a risultati interessanti in termini di purezza, rendimento di recupero e peso molecolare, allo stesso tempo, il materiale ottenuto è poco adatto alle applicazioni termoplastiche.
- ✓ Dato il potenziale basso costo ed il vantaggioso impatto ambientale, si è evinto che il PHB purificato mediante agente alcalino potrebbe essere utile anche per altre applicazioni polimeriche che non prevedono riscaldamento ad elevate temperature.

Grazie per l'attenzione

