



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

**Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"**

Laurea Magistrale in Biotecnologie Avanzate

Estrazione e recupero di biopolimeri intracellulari  
(PHAs) da ceppi produttori mediante l'uso di  
enzimi

Relatore:

*Prof.ssa Daniela Ubiali*

Correlatore:

*Dott.ssa Vittoria Coscia*

Tesi di  
*Kevin Brembilla*

Anno Accademico 2023/2024

## Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. PHA (poliidrossialcanoato)</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. PHB (poli- $\beta$ -idrossibutirrato) .....	6
1.1.2. PHBv (poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) .....	8
1.1.3. <i>mcl</i> -PHA ( <i>medium-chain-length</i> PHA).....	8
<b>1.2. CARBONOSOMI</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. <i>Granule-associated proteins</i> (GAPs).....	12
1.2.2. <i>LA phasin</i> PhaF IN <i>C. necator</i> .....	13
<b>1.3. METABOLISMO PHA</b> .....	<b>13</b>
1.3.1. METABOLISMO PHA IN <i>C. necator</i> .....	17
1.3.2. METABOLISMO PHA IN <i>P. putida</i> .....	22
<b>1.4. FERMENTAZIONE E PRODUZIONE INDUSTRIALE DI PHA</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5. FEEDSTOCK</b> .....	<b>26</b>
<b>1.6. PROCESSI DOWNSTREAM</b> .....	<b>28</b>
1.6.1. ESTRAZIONE CON SOLVENTI.....	28
1.6.2. DIGESTIONE CON SURFATTANTI.....	29
1.6.3. OMOGENEIZZATORE .....	30
1.6.4. LISI ENZIMATICA .....	30
1.6.5. METODO DI ESTRAZIONE SVILUPPATO DA VERSALIS S.p.A.....	31
<b>1.7. APPLICAZIONE INDUSTRIALE DI PHA</b> .....	<b>32</b>
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>34</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>36</b>
3.1. OMOGENEIZZATORE .....	37
3.2. CENTRIFUGA .....	37
3.3. SHAKER.....	37
3.4. STUFA VENTILATA.....	37
3.5. LIOFILIZZATORE.....	38
3.6. TERMOBILANCIA.....	38
3.7. TGA – ANALISI TERMOGRAVIMETRICA.....	39
3.8. DSC – CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE .....	40
3.9. GPC – <i>GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY</i> .....	41
3.10. EVAPORAZIONE A PRESSIONE RIDOTTA .....	41

3.11. REAGENTI E SOLVENTI .....	42
3.12. ENZIMI.....	42
3.13. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI PHB <sub>v</sub> CON BROMELINA .....	42
3.14. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI PHB <sub>v</sub> CON TRIPSINA .....	43
3.15. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI PHB <sub>v</sub> CON ENZIMA IDROLITICO E TENSIOATTIVO .....	44
3.16. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI <i>mcl</i> -PHA CON SOLVENTI.....	45
3.17. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI <i>mcl</i> -PHA CON ENZIMI .....	46
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	47
4.1. PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE ENZIMATICA DALLA LETTERATURA .....	48
4.2. OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO CON ENZIMA IDROLITICO E TENSIOATTIVO .....	56
4.3. ESTRAZIONE DI <i>mcl</i> -PHA DA <i>P. putida</i> .....	69
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	77
5.1. CONCLUSIONI DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE DI PHB <sub>v</sub> .....	78
5.2. CONCLUSIONI DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE DI <i>mcl</i> -PHA.....	79
6. BIBLIOGRAFIA .....	81

## ABBREVIAZIONI

---

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	<i>Anson Unit</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCB	Ciclo di Calvin-Benson-Bassham
CDW	<i>Cell Dried Weight</i>
CMC	Concentrazione micellare critica
CoA	Coenzima A
COD	<i>Chemical Oxygen Demand</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
ED	Ciclo Entner-Doudoroff
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraAcetic Acid</i> (acido etilendiamminotetracetico)
GAPs	<i>Granule-associated proteins</i>
<i>lcl</i> -PHA	<i>Long-chain-length</i> PHA
<i>mcl</i> -PHA	<i>Medium-chain-length</i> PHA
M <sub>w</sub>	<i>Molecular Weight</i> (peso molecolare)
NADH	Nicotinammide adenina dinucleotide
NADPH	Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato
NPCM	<i>Non-PHA-Cellular-Material</i>
PDI	<i>Polydispersity Index</i> (indice di polidispersività)
PHA	<i>Polyhydroxyalkanoate</i> (poliidrossialcanoato)
PHB	<i>Poly-β-hydroxybutyrate</i> (poli-β-idrossibutirrato)
PHBv	<i>Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate</i>
RCF	<i>Relative Centrifuge Force</i>
RuBisCO	Ribulosio-bisfosfato carbossilasi
<i>scl</i> -PHA	<i>Short-chain-length</i> PHA
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
TCA	<i>Tricarboxylic Acid cycle</i> (ciclo di Krebs)
TEM	<i>Transmission Electron Microscope</i>
T <sub>g</sub>	<i>Glass-transition temperature</i> (Temperatura di transizione vetrosa)
TGA	<i>Thermal Gravimetric Analysis</i>
VFA	<i>Volatile Fatty Acids</i>

---

## ABSTRACT

I poliidrossialcanoati (PHAs) sono polimeri di origine biologica, sintetizzati da diversi batteri e archea, costituiti da una catena esterea principale di unità monomeriche ripetute, dove ogni carbonio  $\gamma$  porta una catena laterale di diversa natura da cui dipendono le caratteristiche chimico-fisiche e la classificazione del polimero. Sono prodotti dai microrganismi come fonte di energia di riserva in condizioni di scarsità di nutrienti e carenza di azoto e fosfati, da substrati come zuccheri e lipidi.

Negli ultimi anni, l'interesse per i poliidrossialcanoati (PHAs) è cresciuto grazie alla biodegradabilità e biocompatibilità che caratterizzano questi polimeri aventi proprietà chimico-fisiche e meccaniche simili alle plastiche fossili. Tuttavia, la produzione su larga scala di PHAs tramite processi di fermentazione industriale è ostacolata da costi elevati e processi poco sostenibili. I polimeri con maggiore interesse industriale sono il PHBv, copolimero con i monomeri 3-idrossibutirrato e 3-idrossivalerato, e l'*mcl*-PHA, classe di polimeri amorfi di media lunghezza (C6-C14). L'obiettivo di questa Tesi è stato sviluppare protocolli di estrazione di PHBv e *mcl*-PHA con enzimi e tensioattivi per migliorare efficienza e impatto ambientale del processo.

Dopo un'analisi della letteratura, per l'estrazione di PHBv da *Cupriavidus necator* è stato selezionato un protocollo basato sull'impiego di enzimi idrolitici e tensioattivi. Le rese di estrazione ottenute sono comprese tra 80-95% e la purezza del campione estratto è risultata sempre >98%, in linea con i risultati del protocollo di estrazione di riferimento sviluppato da Versalis S.p.A. (85-90%). L'ottimizzazione del protocollo, basato sulla riduzione del numero di cicli di omogeneizzazione e lavaggio e sulla diminuzione della concentrazione di tensioattivo durante la lisi enzimatica, ha permesso di ottenere un processo più efficiente, senza compromettere la resa e la qualità del biopolimero.

Per l'estrazione di *mcl*-PHA prodotto da *Pseudomonas putida*, sono stati testati sia un approccio enzimatico sia un protocollo basato sull'uso di solventi organici (cloroformio, ciclopentanone e acetone). Le estrazioni con solvente hanno avuto lo scopo di ottenere un campione di biopolimero ad elevata purezza da usare come riferimento per gli altri protocolli. Tra i solventi utilizzati, l'acetone è risultato il più efficace in termini di purezza (>90%) e di resa (>50%) del prodotto. Sebbene l'approccio enzimatico abbia fornito campioni di purezza inferiore (70-80%), ha certamente un miglior potenziale in termini di sostenibilità. I pretrattamenti del fermentato e la lisi enzimatica sono fasi che potrebbero essere ottimizzate per migliorare l'efficienza del processo.

Il lavoro sperimentale ha dimostrato che i metodi enzimatici possono rappresentare una valida alternativa ai processi tradizionali, riducendo l'impiego di tensioattivi e solventi chimici, garantendo simili livelli di purezza e resa, e migliorando la sostenibilità complessiva del processo. L'ottimizzazione del processo di estrazione di PHBv ha permesso di ottenere un processo più snello e con minore consumo di reagenti, ricavando un polimero con purezza superiore al 98% e con rese tra 80-95%; mentre l'estrazione di *mcl*-PHA.

# **1. INTRODUZIONE**

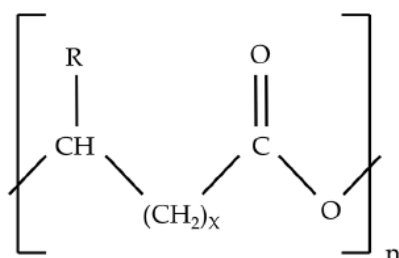
Le materie plastiche hanno avuto un ruolo cruciale nello sviluppo tecnologico e industriale del XX secolo, grazie alla loro versatilità, durabilità e facilità di lavorazione che ne hanno reso possibile l'impiego in una vasta gamma di applicazioni. Un contributo fondamentale allo sviluppo delle plastiche moderne è stato dato negli anni '50 da Giulio Natta e Karl Ziegler, i quali hanno sviluppato un metodo di sintesi per la produzione su larga scala di polipropilene isotattico e polietilene, i materiali plastici più diffusi a livello globale.<sup>1</sup>

Le plastiche tradizionali sono ottenute principalmente da fonti fossili, come petrolio e gas naturale, e possiedono proprietà fisico-meccaniche che le rendono particolarmente adatte a numerose applicazioni industriali. Tra le caratteristiche distintive si annoverano leggerezza, resistenza meccanica, isolamento termico ed elettrico, oltre a una notevole resistenza agli agenti chimici.<sup>2</sup> Questi fattori hanno contribuito all'ampia diffusione delle plastiche in settori quali l'edilizia, l'elettronica, il settore medico e l'imballaggio alimentare.

Negli ultimi decenni, la crescente consapevolezza verso i temi dell'ecologia e della protezione ambientale ha spinto la ricerca verso lo sviluppo di materiali biodegradabili. In questo contesto, i poliidrossialcanoati (PHAs) stanno emergendo come una classe promettente di biopolimeri biodegradabili, prodotti da fonti rinnovabili, che potrebbero offrire soluzioni innovative ed ecocompatibili alle sfide ambientali associate all'uso delle plastiche convenzionali.<sup>3</sup>

### 1.1. PHA (poliidrossialcanoato)

Il termine PHA (poliidrossialcanoato) si riferisce a polimeri di origine biologica, sintetizzati da diversi batteri e archea, costituiti da una catena esterea principale formata da unità monomeriche ripetute, dove ogni carbonio  $\gamma$  porta una catena laterale di diversa natura (**Figura 1**), da cui dipendono le caratteristiche del polimero e la sua classificazione.<sup>4,5</sup>



**Figura 1.** Struttura generale del PHA. X si riferisce ai gruppi metilici presenti all'interno della catena del monomero, n si riferisce al numero di ripetizioni dell'unità all'interno del polimero, R rappresenta la catena laterale.<sup>5</sup>

I poliidrossialcanoati sono un'alternativa alle plastiche di origine petrolifera e potenziali sostituti delle termoplastiche, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche (**Tabella 1**)

Proprietà	PP	LDPE	PLA	PHB	PHBv
<i>Densità (g/cm<sup>3</sup>)</i>	0,89-0,92	0,92	0,90-1,27	1,25	1,25
<i>Modulo di Young (GPa)</i>	1,14-1,55	0,20	1,50-2,70	3,50	0,80
<i>Forza tensile (MPa)</i>	31-41	20	37	40	20
<i>Elongation at break (%)</i>	8-750	150-200	8	< 10	50
<i>Temperatura fusione (°C)</i>	160-163	105-123	160-190	175	145
<i>T<sub>g</sub> (°C)</i>	-20	-100	56-65	4	-1

**Tabella 1.** Confronto delle principali caratteristiche chimico-fisiche tra le più diffuse plastiche (PP polipropilene; LDPE *low-density polyethylene*) e bioplastiche (PLA acido polilattico, PHB poli-β-idrossibutirrato, PHBv poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato).<sup>1</sup>

confrontabili con le più diffuse plastiche fossili: rigidezza, brillantezza, idrofobicità, bassa permeabilità all'ossigeno, basso grado di cristallinità, barriera contro gli odori, resistenza agli UV e atossicità;<sup>2</sup> a queste proprietà si aggiungono altre caratteristiche, tali da giustificare il carattere bio- di questi polimeri: alta biodegradabilità, compostabilità, rinnovabilità e biocompatibilità.<sup>6</sup>

---

### Definizione di biodegradabilità e compostabilità

Per biodegradabilità si intende la metabolizzazione del 90% del carbonio presente nel campione entro 180 giorni in condizioni standard. (EN 13432)

Un materiale è definito compostabile se non oltre il 10% del materiale rimane intrappolato in un filtro con 2 mm di dimensioni dei pori dopo un test di compostabilità di 180 giorni in condizioni standard. (EN13432)

---

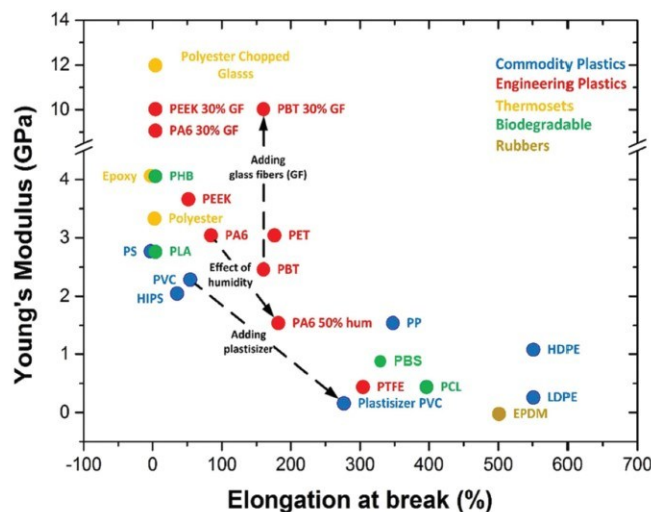
Il PHA è biodegradabile sia in condizioni aerobiche (degradazione a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, anche in ambienti marini) sia in quelle anaerobiche (fino a CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>);<sup>7</sup> uno studio ha riportato come la completa degradazione di bottiglie di plastica in PHA venga raggiunta in ambiente marino in soli 1,5 - 3,5 anni, rispetto alle decadi o secoli necessari per quelle in plastica di origine petrolifera.<sup>8</sup> La possibilità di usare diverse fonti organiche e sostenibili come materia prima per la produzione di PHA rende questo biopolimero un materiale rinnovabile, grazie alla versatilità metabolica dei principali ceppi batterici produttori di PHA sfruttati a livello industriale, come spiegato nel capitolo 1.3 di questa Tesi. È stata verificata anche la biocompatibilità del PHA, che è metabolizzato dall'uomo in composti non tossici.<sup>6</sup> Ulteriori studi hanno evidenziato come la sostituzione di 1 kg di plastica fossile con PHA riduca l'emissione di CO<sub>2</sub> di circa 2 kg e dell'energia fossile di circa 30 MJ.<sup>9</sup>

In base alla dimensione dei monomeri, il PHA è generalmente classificato in:

- *short-chain-length* PHA (*scl*-PHA) con monomeri C3-C5 (come il 3-idrossibutirrato e il 3-idrossivalerato): a questa categoria appartiene il PHB;
- in *medium-chain-length* PHA (*mcl*-PHA) con monomeri C6-C14, prodotti principalmente dai generi batterici *Pseudomonas*, come *P. putida*;
- in *long-chain-length* PHA (*lcl*-PHA) con monomeri C15 e superiori.

Questa classificazione si basa sulle differenze *in vivo* della specificità di substrato della PHA sintasi (PhaC) e PHA polimerasi (PhaZ), ossia gli enzimi coinvolti nella produzione dei monomeri precursori ((R)-3-idrossiacil-CoA) e nelle vie metaboliche e regolatrici presenti negli organismi produttori;<sup>10</sup> questi aspetti saranno approfonditi nel capitolo 1.3 di questa Tesi.<sup>3</sup>

Sono noti oltre 150 diversi monomeri combinabili tra loro per dare polimeri molto diversi tra loro, con caratteristiche specifiche che determinano le proprietà fisiche, chimiche e meccaniche del polimero: temperatura di fusione; tipo e quantità di strutture cristalline; stabilità termica e chimica; resistenza alla trazione e massimo allungamento alla rottura (**Figura 2**).<sup>4</sup>



**Figura 2.** Relazione tra il modulo di Young e la l'allungamento alla rottura per diverse tipologie di polimeri e biopolimeri.<sup>3</sup>

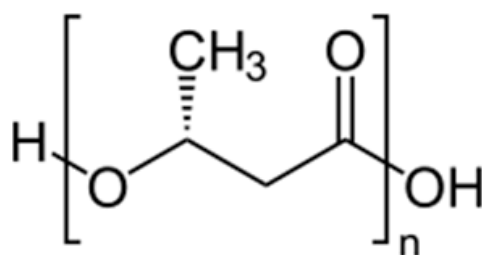
Nel caso il monomero ripetuto sia sempre lo stesso, si ottiene un omopolimero; nel caso in cui due o più monomeri differenti siano ripetuti nella catena principale, si ottiene un

copolimero. I copolimeri di PHA possono essere classificati in base alla macrostruttura (omogenei, *random* e a blocchi) o ai gruppi funzionali presenti nella catena principale (es. doppi legami o gruppi aromatici). Tuttavia, finora solo poche tipologie di copolimeri sono oggetto di studi e hanno trovato una valida applicazione in ambito industriale.

La specificità di substrato della PHA sintasi e il precursore utilizzato definiscono anche il peso molecolare ( $M_w$ ) del polimero prodotto.<sup>11</sup> È una caratteristica molto rilevante da considerare qualora si consideri l'impiego del biopolimero, poiché un alto  $M_w$  corrisponde a un aumento della resistenza meccanica e di conseguenza la produzione di PHA ad alto  $M_w$  viene preferita per la versatilità delle applicazioni. Si tratta inoltre di una caratteristica con implicazioni sulla biodegradabilità del materiale: più il  $M_w$  è basso, più semplice sarà la degradazione. I polimeri di PHA ad altissimo  $M_w$  possono essere impiegati in campi diversi rispetto a quelli a basso  $M_w$ :<sup>1</sup> le principali applicazioni sono nella produzione di fibre ad alta resistenza, come per la realizzazione di reti da pesca e di funi.<sup>12</sup>

### 1.1.1. PHB (poli- $\beta$ -idrossibutirrato)

Il PHB (poli- $\beta$ -idrossibutirrato) è il più diffuso e sfruttato *scl*-PHA, in cui l'unità base ripetuta è l'acido 3-idrossibutirrico (**Figura 3**); questo biopolimero possiede proprietà paragonabili alle plastiche fossili, soprattutto in termini di temperatura di fusione (175 °C) e forza tensile (30-35 MPa), tuttavia possiede bassa resistenza alla degradazione termica e ciò risulta essere un problema in fase di processamento del polimero con conseguente scissione delle catene polimeriche e perdita di peso molecolare; è termoplastico, isotattico e otticamente attivo.<sup>2</sup>



**Figura 3.** Unità ripetitiva dell'omopolimero PHB.<sup>5</sup>

È un polimero semi-cristallino caratterizzato da una cristallizzazione polimorfa, che può assumere due conformazioni: una forma  $\alpha$  e una forma  $\beta$ . La forma  $\alpha$  è quella più comune e consiste in una cristallizzazione di tipo lamellare, mentre la forma  $\beta$  prevede una conformazione a “zig-zag” su di un piano, sfruttata in ambito industriale nella produzione di film e fibre con alta resistenza alla trazione.

È noto come il processo di cristallizzazione incida sia sulle proprietà termiche e meccaniche del polimero, sia sulla sua biodegradabilità: in questo caso è la cristallizzazione secondaria, a condizioni ambiente, a modificarne le proprietà meccaniche.<sup>13,14</sup>

Esistono tre tipi di PHB, classificati in base al numero di monomeri e, di conseguenza, di funzione all'interno della cellula: ad alto peso molecolare, avente un numero di monomeri superiore a  $10^3$  e funzioni di riserva (*storage*-PHB); a basso peso molecolare, caratterizzato da 100-200 monomeri e definito oligo-PHB; PHB avente meno di 30 unità monomeriche e legato covalentemente alle proteine, definito “coniugato” (*conjugated*-PHB). Lo *storage*-PHB è presente ubiquitariamente nei procarioti, mentre l'oligo-PHB e il *conjugated*-PHB anche in alcuni eucarioti (una piccola quantità è stata rilevata anche nel plasma umano). Le principali funzioni di queste tre tipologie sono riassunte di seguito:<sup>15</sup>

- *storage*-PHB

aumenta le possibilità di sopravvivenza dei microrganismi in periodi con scarsità di nutrienti, poiché viene depolimerizzato e i singoli monomeri vengono sfruttati come fonte di energia;

- oligo-PHB

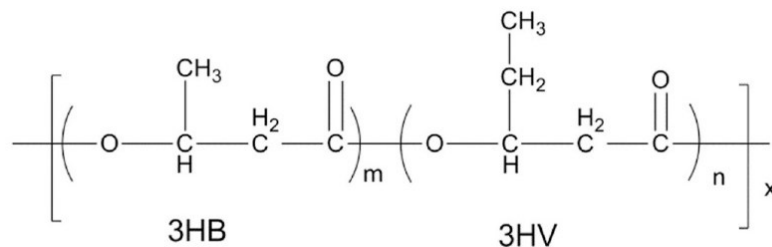
forma spesso complessi chelati con ioni fosfato e calcio all'interno delle membrane plasmatiche, fungendo da canale ionico per cationi inorganici; ha un ruolo nei processi di trasformazione batterica ed è coinvolto anche nei processi di acquisizione della competenza alla trasformazione;

- *conjugated*-PHB

è la forma solubile in acqua, coniugata alle proteine; svolge un ruolo di stabilizzazione delle proteine stesse e del loro ancoraggio alle membrane cellulari, specialmente su quella dei granuli intracellulari di PHA (come riportato nel capitolo 1.2 di questa Tesi).

### 1.1.2. PHBv (poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato)

Il PHBv è il copolimero di PHB con i monomeri 3-idrossibutirrato e 3-idrossivalerato (**Figura 4**); per essere prodotto dal microrganismo, quest'ultimo deve crescere in un ambiente con i relativi substrati precursori. Il 3-idrossibutirrato è sintetizzato dall'acetil-CoA, ubiquitario nei processi metabolici; il 3-idrossivalerato invece deriva dalla riduzione del 3-chetovaleril-CoA, prodotto da una reazione di condensazione tra l'acetil-CoA e il propionil-CoA. Come affermato prima, la disponibilità di acetil-CoA è assicurata essendo materia prima indispensabile del metabolismo cellulare, mentre il propionil-CoA può essere sintetizzato solo da specifici organismi e in presenza di determinati substrati, quali acido propionico, acido valerico o acido levulinico.<sup>10,16</sup>



**Figura 4.** Monomeri del PHBv (3HB 3-idrossibutirrato; 3HV 3-idrossivalerato); m e n indicano il numero di ripetizioni del monomero all'interno della stessa unità ripetuta X.<sup>16</sup>

Molti batteri sono in grado di produrre il copolimero PHBv partendo direttamente da metano (metanotrofi di II tipo) o CO<sub>2</sub> (cianobatteri e aerobi chemiolitoautotrofici idrogeno-ossidanti “*knallgas bacteria*”, come *C. necator*). Tra le proprietà fisiche notabili del PHBv si evidenzia una temperatura di fusione prossima a quella di degradazione, limitando la finestra di lavorabilità del polimero, con difficoltà nell'evitare la degradazione dello stesso; inoltre presenta stabilità meccanica; alta resistenza agli UV; alto grado di cristallinità, sebbene rimanga un polimero fragile; un basso tasso di cristallizzazione e minore biodegradabilità se paragonato ad altre tipologie di PHA. Tutte queste sue proprietà rimangono stabili in una relativamente ampia finestra di temperatura.<sup>6</sup>

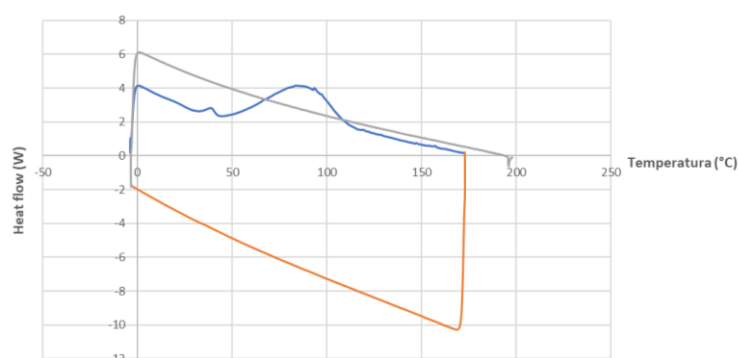
### 1.1.3. *mcl*-PHA (*medium-chain-length* PHA)

Alla categoria di *mcl*-PHA appartengono vari biopolimeri con caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche differenti dagli *scl*-PHA, soprattutto riguardo il loro stato fisico a temperatura ambiente, come mostrato nella **Figura 5**: avendo una temperatura di transizione vetrosa (T<sub>g</sub>) attorno ai -40 °C, a temperatura ambiente il polimero è amorfo.<sup>17</sup>

Si riportano di seguito le principali caratteristiche di questa categoria a confronto con *scl*-PHA e *lcl*-PHA:

Polimero	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>fusione</sub> (°C)	M <sub>w</sub> (kDa)	PDI	T <sub>d</sub> (°C)
<i>lcl</i> -PHA	-30	50-70	>100	1,5-2,5	240-260
<i>mcl</i> -PHA	-40	55-70	100	>2	255-350
<i>scl</i> -PHA	25	150-175	>250	1-2	225-240

**Tabella 2.** Principali caratteristiche chimico-fisiche di *lcl*-PHA, *mcl*-PHA e *scl*-PHA. Queste caratteristiche sono spesso fornite come intervalli, poiché sono fortemente dipendenti dalla composizione del polimero, ossia dalla tipologia e lunghezza delle catene laterali. **Abbreviazioni:** T<sub>d</sub> temperatura di degradazione.<sup>11,18</sup>



**Figura 5.** Grafico DSC riferito al comportamento di *mcl*-PHA, da quale è possibile desumere la natura amorfa del polimero (linea blu), tuttavia nel 2° riscaldamento (linea grigia) non si notano i picchi caratteristici dei materiali amorfi (linea blu: 1° riscaldamento; linea arancione: raffreddamento; linea grigia: 2° riscaldamento).

Tra i monomeri delle catene laterali più diffusi troviamo: acido 3-idrossiesanoico (3HHx); acido 3-idrossiottanoico (3HO); acido 3-idrossidecanoico (3HD); acido 3-idrossidodecanoico (3HDDA); acido 3-idrossitetradecanoico (3HTD).<sup>9</sup> Questi precursori derivano dalla degradazione di acidi grassi (es. acido ottanoico in *P. putida*) o dalla sintesi *de novo* di acidi grassi in quei microrganismi codificanti l'enzima 3-idrossiacil-*carrier-protein*-CoA transferasi -come *P. putida*-, coinvolto nella via metabolica (come riportato capitolo 1.3.2 di questa Tesi).<sup>15</sup>

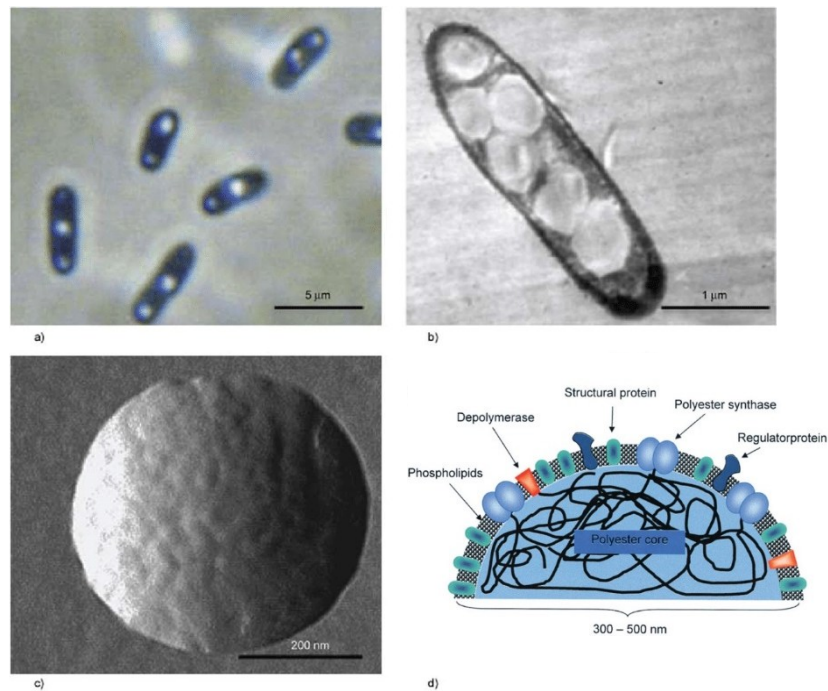
L'aspetto più interessante di questa classe di polimeri è la presenza di gruppi funzionali sulla catena laterale, poiché essi possono modificare le proprietà chimico-fisiche del polimero. La varietà dei gruppi funzionali è definita principalmente dalla struttura chimica del substrato in uso per far crescere il microrganismo, alcuni di questi gruppi possono essere modificati chimicamente per implementarne le proprietà e quindi anche il campo di applicazione.<sup>19</sup> Sono state studiate varie tecniche di modifica delle proprietà

degli *mcl*-PHA, sia di tipo chimico sia fisico: *blending*, *cross-linking* e *graft copolymerization*. Il *blending*, ossia la fusione del *mcl*-PHA con altri polimeri, è stato applicato per permetterne l'impiego nei sistemi di *drug delivery* e nell'ingegneria tissutale, dove è richiesta la capacità di degradarsi tramite idrolisi; la presenza di molte unità insature ripetute nella catena del polimero *mcl*-PHA, lo rendono idoneo per reazioni di *cross-linking*, solitamente attivate da radiazione UV, in totale assenza di fotoiniziatori o fotosensibilizzatori. I campi di applicazione per i polimeri modificati con questa tecnica comprendono la produzione di gomme biodegradabili, materiale fotosensibile per la microlitografia e adesivi biomedici.<sup>1</sup> Con la tecnica *graft copolymerization* si ha l'aggiunta di monomeri vinilici all'interno del polimero, portando a cambiamenti nelle proprietà chimico-fisiche.<sup>19</sup>

## 1.2. CARBONOSOMI

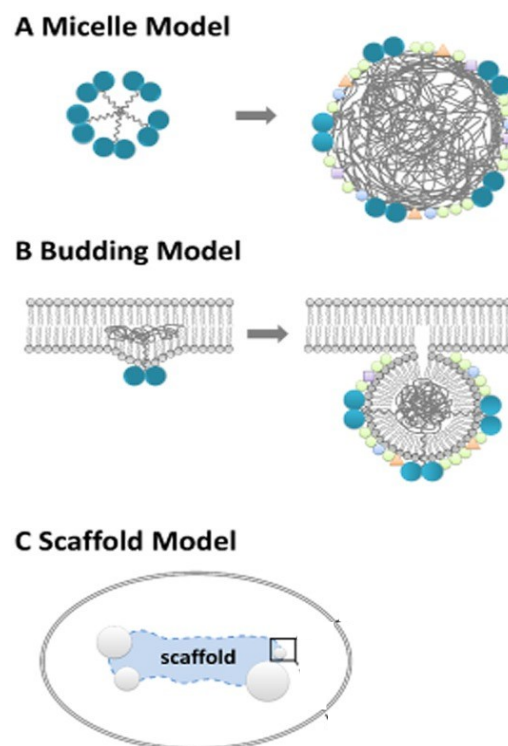
I polimeri PHA sono tendenzialmente insolubili in acqua e nell'ambiente citoplasmatico dei microrganismi. Non rimangono dunque in forma libera, bensì formano granuli della dimensione di 200-500 nm, tali da arrivare a occupare una grande frazione di massa cellulare secca (in condizioni ottimali fino al 90%).<sup>20,21</sup>

Come raffigurato nella **Figura 6**, un granulo di PHA è sferico, con un *core* idrofobico costituito da catene di PHA avvolte a elica, dove le molecole d'acqua agiscono come plasticizzanti; la superficie invece è costituita da un singolo strato di fosfolipidi dallo spessore di 3,8 nm, circa la metà del doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari (7,2 nm in *C. necator*), sulla quale è presente tutta la componente proteica: enzimi idrofobici coinvolti nella produzione di PHA e proteine strutturali; si è calcolato come un granulo di PHA sia costituito al 97,7% dal polimero e il restante 2,3% dalla componente proteica.<sup>15,22</sup> Il gran numero di proteine presenti sulla superficie suggerisce come tali granuli non siano meramente strutture di accumulo, bensì quasi organelli funzionali, complessi supramolecolari con specifiche funzioni biologiche e una loro specifica localizzazione a livello citoplasmatico spesso ai poli della cellula. Per tale motivo è stato assegnato loro un nome specifico: carbonosomi; le proteine associate sono raggruppate sotto il nome di *granule-associated proteins* (GAPs).



**Figura 6.** Morfologia dei granuli di PHA osservati in microscopia (a) contrasto di fase e (b) TEM. (c) L'analisi con microscopia a forza atomica mostra la presenza di particelle globulari sulla superficie dei granuli. (d) Disegno rappresentativo della morfologia dei granuli di PHA.<sup>20,21</sup>

Sono stati ipotizzati ed elaborati tre modelli, raffigurati nella **Figura 7**, volti a spiegare la causa evolutiva dello sviluppo e della formazione di tali strutture: i modelli micelle, *budding* e *scaffold*.<sup>15,22</sup>



**Figura 7.** Schema dei tre modelli ipotizzati per spiegare la formazione delle strutture granulari di PHA. (A) modello a micelle; (B) modello *budding*; (C) modello *scaffold*.<sup>15</sup>

- Il modello “micelle” considera i granuli dispersi casualmente nel citoplasma; l’enzima PhaC (PHA sintasi) inizia a produrre molecole idrofobiche di PHA quando la concentrazione del substrato 3-idrossibutiril-CoA è sufficientemente elevata; data appunto l’idrofobicità del PHA e la sua scarsa solubilità in acqua, le nascenti catene di polimero si aggregano in micelle esponendo verso la porzione acquosa la componente enzimatica PhaC, alla quale si aggiungeranno altre GAPs;
- il modello “*budding*” invece suggerisce come i granuli abbiano specifiche localizzazioni, mediate da interazioni granulo-membrana cellulare e favorite dalla funzione di ponte operata dalla PhaC;
- il modello “*scaffold*” ipotizza come localizzazione a livello citoplasmatico dei granuli siano frutto di interazioni tra PhaC e lo *scaffold* molecolare stesso del PHA. Si è scoperto come la *phasin* PhaF abbia un ruolo nell’organizzazione dei granuli durante la divisione cellulare e media così il trasferimento di essi nelle cellule figlie; infatti, una delezione del gene porta a una distribuzione non equilibrata.<sup>23</sup>

Uno studio avente come oggetto i carbonosomi di PHB ha evidenziato come i granuli isolati dall’ambiente citoplasmatico e analizzati *in vitro* siano sensibili alla denaturazione e definiti perciò granuli “nativi” (nPHB), poiché rispecchiano strutturalmente la condizione *in vivo*. Solo i nPHB associati alla PHB sintasi sono sensibili all’idrolisi da parte della PHB depolimerasi: se i nPHB subiscono trattamenti chimici, fisici o biochimici di denaturazione, essi si denaturano velocemente diventando sensibili all’attacco da parte della PHB depolimerasi intracellulare (questi sono definiti “*denaturated*”, dPHB).<sup>24,25</sup>

### 1.2.1. *Granule-associated proteins* (GAPs)

Il gruppo di proteine classificate come *granule-associated proteins* (GAPs) non considera solamente quelle presenti sulla superficie dei carbonosomi, bensì anche altre numerose tipologie di proteine appartenenti al complesso della membrana cellulare esterna o all’ambiente citoplasmatico, oltre ad alcune connesse al TCA; si stima un totale di circa 404 proteine.

In *C. necator* troviamo tra le principali proteine: PHA sintasi 1 e 2 (PhaC1, PhaC2); PHA depolimerasi (PhaZ) nelle sue varie isoforme (PhaZa1-7) e una classe di proteine chiamate

*phasin* (PhaP1-7, PhaF, PhaI), dalle diverse funzioni, sempre associate alla regolazione del metabolismo dei granuli. Altre *phasin* con un ruolo rilevante sono PhaR, coinvolta nella regolazione dei processi di allungamento delle catene di PHA, e il regolatore PhaM; per quest'ultimo è stato dimostrato come non solo sia in grado di determinare la posizione subcellulare di PhaC, ma anche di causare un passaggio rapido dalla forma a bassa attività a quella ad alta attività, presumibilmente con la formazione di un complesso stabile PhaM-PhaC.<sup>15</sup>

### 1.2.2. LA *phasin* PhaF IN *C. necator*

PhaF è una *phasin* meritevole di una trattazione a parte. È un tetramero con una lunga  $\alpha$ -elica anfipatica all'N-terminale e un dominio C-terminale a superelica, presenta infine un motivo *leucine zipper*, probabilmente coinvolto nelle interazioni proteina-proteina. È stato dimostrato sperimentalmente come l'attività della *phasin* PhaI, coinvolta nella regolazione della sintesi di PHA, possa essere sostituita nella sua azione dal solo dominio N-terminale di PhaF, dimostrando come già solo quest'ultimo sia essenziale alla funzione regolatrice.<sup>20,26</sup> A supporto di queste evidenze è stata notata una similarità di sequenza del 57% tra PhaF e PhaI, soprattutto nella porzione N-terminale, coinvolta nella oligomerizzazione.

Modelli strutturali evidenziano come la porzione  $\alpha$ -elica all'N-terminale sia disordinata quando è assente PHA, ma in grado di riorganizzarsi in presenza del polimero, permettendo di legare il dominio idrofobico dell' $\alpha$ -elica alla membrana del granulo.

PhaF regola inoltre l'espressione dei geni *pha* grazie alla sua capacità di legare il DNA senza specificità di sequenza, poiché presenta un dominio strutturale *histone-like* composto da otto ripetizioni *in tandem* della sequenza AAKP -caratteristica della famiglia degli istoni H1; questo permette di classificare PhaF anche come *nucleoid-associated proteins* (NAPs).<sup>10</sup>

## 1.3. METABOLISMO PHA

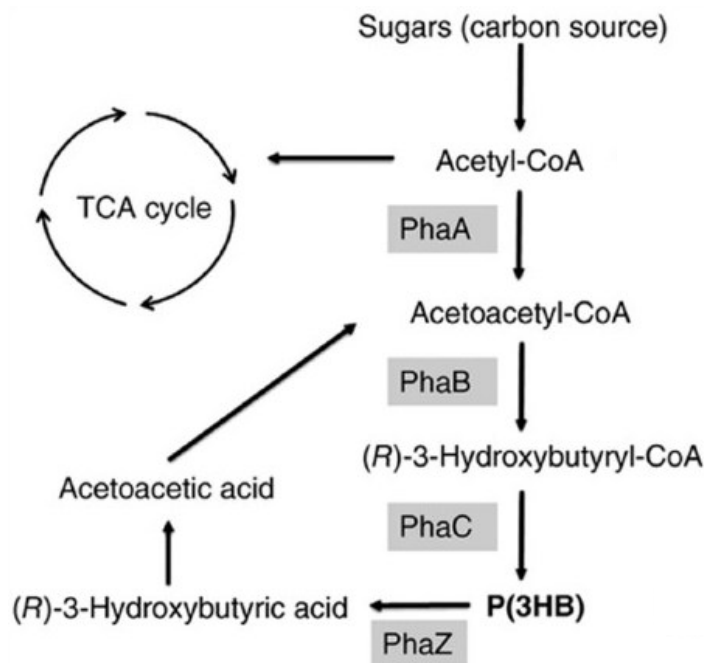
La sintesi del polimero viene innescata quando si presentano una o più delle seguenti situazioni:<sup>27</sup>

- segnali ambientali, come la carenza di nutrienti, portano all'attivazione dell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo di produzione del PHA;

- presenza di intermedi metabolici specifici o di componenti cellulari, in grado di attivare gli enzimi necessari per la produzione del PHA;
- accumulo degli intermedi metabolici coinvolti nella sintesi del PHA, dovuti all'inibizione delle vie metaboliche con cui compete.

Quando si è in condizioni ottimali di crescita, gli intermedi metabolici vengono indirizzati verso il ciclo TCA per la produzione di energia, mentre in condizioni di eccesso di C e al contempo carenza di N o fosfati, i livelli di CoA diminuiscono innescando la produzione di PHA.<sup>1</sup>

La biosintesi di PHA da parte dei vari microrganismi è possibile attraverso tre vie metaboliche differenti, scelte a seconda delle caratteristiche geniche del microrganismo e della fonte di carbonio disponibile: glucosio, acidi grassi o zuccheri e grassi complessi. Zuccheri e grassi complessi vengono utilizzati principalmente come fonte di carbonio per la produzione di *mcl*-PHA, mentre in generale la principale via di biosintesi di PHA (**Figura 8**) sfrutta glucosio e la sua ossidazione attraverso il ciclo TCA ad acetil-CoA, il quale è substrato per tre successive reazioni in serie, catalizzate da tre specifici enzimi:<sup>28</sup>



**Figura 8.** Reazioni coinvolte nella sintesi di PHA, partendo da una fonte di carbonio e ottenendo P(3HB) (ossia PHB).<sup>29</sup>

1. La prima reazione è catalizzata da una  $\beta$ -chetotilasi (codificata dal gene *phaA*) e converte due molecole di acetil-CoA ad acetoacetil-CoA;
2. La seconda prevede la riduzione dell'acetoacetil-CoA a (R)-3-idrossiacetil-CoA a opera della NADPH-dipendente acetoacetil-CoA deidrogenasi (codificata dal gene *phaB*);
3. La terza infine prevede una reazione di polimerizzazione dei monomeri di (R)-3-idrossiacetil-CoA in PHA, catalizzata dalla PHA-sintasi (codificata dal gene *phaC*).

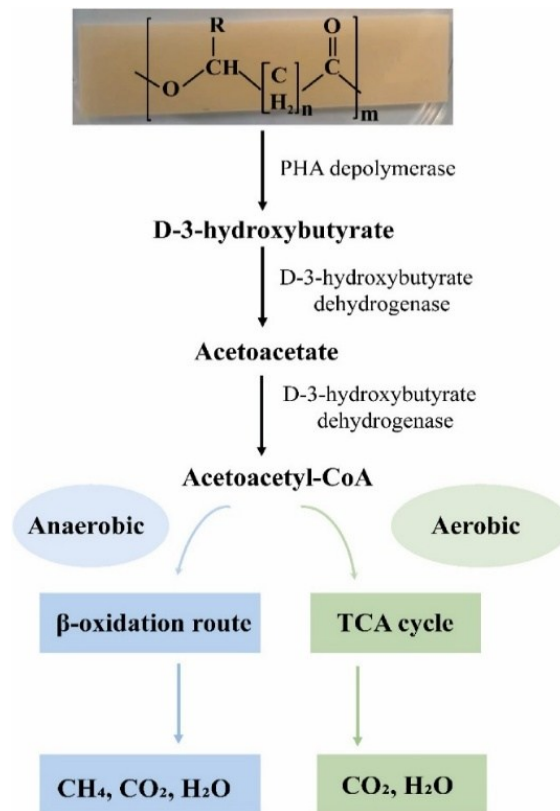
In *C. necator* questi tre geni fanno parte dell'operone *phaCAB*, altamente conservato, e gli enzimi codificati sono finemente regolati; importante è la regolazione allosterica negativa operata da acetil-CoA su PhaA, di conseguenza il tasso di accumulo di PHA risulta essere dipendente dalla concentrazione di acetil-CoA. La piruvato deidrogenasi (catalizza la reazione di conversione del piruvato in acetil-CoA) è il complesso enzimatico più influente nella regolazione del flusso di carbonio diretto alla produzione di PHA: la sua azione è associata all'attività del primo enzima della via di biosintesi del PHA (PhaA) e può dunque rivelarsi un collo di bottiglia, impedendo un elevato flusso di carbonio verso la produzione del polimero.<sup>4,7,29</sup>

Effettuando studi più approfonditi, è stata riscontrata una complessità maggiore della componente enzimatica coinvolta nella sintesi e accumulo del PHA ossia, oltre ai prodotti dell'operone *phaCAB*, sono coinvolte altre proteine: una depolimerasi (PhaZ), due *phasin* (PhaI, PhaF), due proteine regolatorie (PhaD, PhaG). Si è notato come l'enzima PhaC sia presente in due forme (PhaC1, PhaC2); tra queste proteine, PhaD è l'unico fattore di regolazione non presente sulla superficie del granulo di PHA; mentre PhaF e PhaI favoriscono la segregazione dei granuli durante le fasi di divisione cellulare.

Se si considerano tutti i ceppi produttori di PHA, si nota una grande variabilità di forme di PHA sintasi, suddivise in quattro classi (I, II, III e IV) in base alla loro struttura molecolare e affinità verso substrati differenti; nello specifico, la classe I raggruppa le PHA sintasi composte da una sola subunità (61-73 kDa) e che polimerizzano preferibilmente *scl*-PHA (un esempio è la polimerasi di *C. necator*); anche nella classe II le sintasi sono composte da una sola subunità, ma polimerizzano *mcl*-PHA (sono tipiche del genere *Pseudomonas*); mentre le classe III e IV sono composte da due subunità (ognuna di circa 40 kDa).<sup>10,30</sup>

Altri microrganismi possono sfruttare ulteriori vie metaboliche secondarie per la produzione di PHA, oltre a quelle viste finora, per esempio la via del metilmalonil-CoA o quella di sintesi *de novo* degli acidi grassi; mentre è stata osservata in organismi termofili metanotrofi l'assimilazione di CH<sub>4</sub> e C attraverso la via del ribulosio-monofosfato (RuMP), del ciclo della serina o del ciclo CBB, con i relativi prodotti indirizzati verso sintesi di PHA. I geni *phaA* e *phaB* sono stati rilevati anche in questi microrganismi termofili, appartenenti per lo più alla famiglia degli  $\alpha$ -proteobatteri.<sup>28</sup>

Come già accennato nei precedenti paragrafi, il metabolismo del PHA non comprende solamente la sintesi del polimero, ma anche i processi di degradazione, essenziali nella regolazione dell'accumulo del PHA all'interno delle cellule.



**Figura 9.** Reazioni coinvolte nel processo di degradazione del PHA e il suo utilizzo come fonte di C nel metabolismo anaerobico e aerobico riferiti al PHB.<sup>7</sup>

Si possono distinguere due tipologie di degradazione del PHA: degradazione intracellulare e degradazione extracellulare. La degradazione intracellulare, schematizzata nella **Figura 9**, è operata dalla PhaZ (PHA depolimerasi) al fine di liberare, sia per via anaerobica sia per via aerobica, subunità monomeriche dai granuli di PHA da sfruttare come energia per il microrganismo stesso; la degradazione extracellulare invece è operata da enzimi di altri microrganismi -lieviti e funghi (produttori o no di PHA)-, che sfruttano la riserva energetica di PHA del microrganismo produttore per la loro crescita e sopravvivenza (**Figura 10**).



**Figura 10.** Granuli di PHA compattati in un unico granulo per il processo di estrazione; le sfere bianche traslucide sono cellule batteriche che stanno degradando il granulo di PHA.

Tali enzimi sono spesso PHA depolimerasi extracellulari dall'ampio spettro d'azione e specificità di substrato, poiché si sono evolute proprio allo scopo di sfruttare le diverse tipologie di PHA prodotte dai diversi ceppi produttori presenti in natura, rispetto alle PHA depolimerasi intracellulari, che sono più selettive e specifiche poiché operano solo all'interno della cellula a servizio dello specifico metabolismo del microrganismo. Tra i fattori determinanti per un'efficace depolimerizzazione vi sono la temperatura, la disponibilità di O<sub>2</sub>, la salinità e la natura del polimero; per quanto riguarda la natura del polimero, si considerano la composizione e il grado di cristallinità; generalmente l'omopolimero risulta più difficile da degradare rispetto al copolimero per la sua elevata cristallinità.<sup>7</sup> Da queste caratteristiche dipenderanno l'efficacia delle funzioni biologiche del PHA nel proteggere la cellula da solventi tossici, sbalzi termici, differenti osmolarità e radiazione UV, oltre al ruolo di tampone nel bilanciare la biomassa totale e divisione cellulare.<sup>28</sup>

### **1.3.1. METABOLISMO PHA IN *C. necator***

*Cupriavidus necator* è un  $\beta$ -proteobatterio non patogeno Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Burkholderiaceae*, isolabile da diversi ambienti: terreni fangosi di laghi e fiumi; suolo di foreste e risaie; rizosfera delle piante o dai loro noduli radicali. Il suo metabolismo è sia eterotrofo sia chemolitotrofo -sfrutta CO<sub>2</sub> e formiato- in aerobiosi o anaerobiosi, dunque un metabolismo versatile sfruttabile a livello industriale in diverse filiere di produzione, grazie alla possibilità di poter usare diversi substrati organici di scarto da produzioni industriali come fonte di C per la crescita.<sup>2</sup>

Il recente e drammatico aumento di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera causato dalle attività antropiche ha suscitato interesse nello sviluppo di processi di produzione di PHA con microrganismi chemolitotrofici come mezzo per sequestrare temporaneamente la CO<sub>2</sub>. Tra i substrati utilizzabili per la crescita di *C. necator* sono inclusi anche quelli ricchi di componente gassosa, per esempio derivante dai fumi ricchi di CO<sub>2</sub> emessi da impianti industriali, offrendo dunque il vantaggio di ridurre l'emissione in atmosfera di gas inquinanti e climalteranti.<sup>2,4</sup>

---

### Tassonomia per *C. necator*

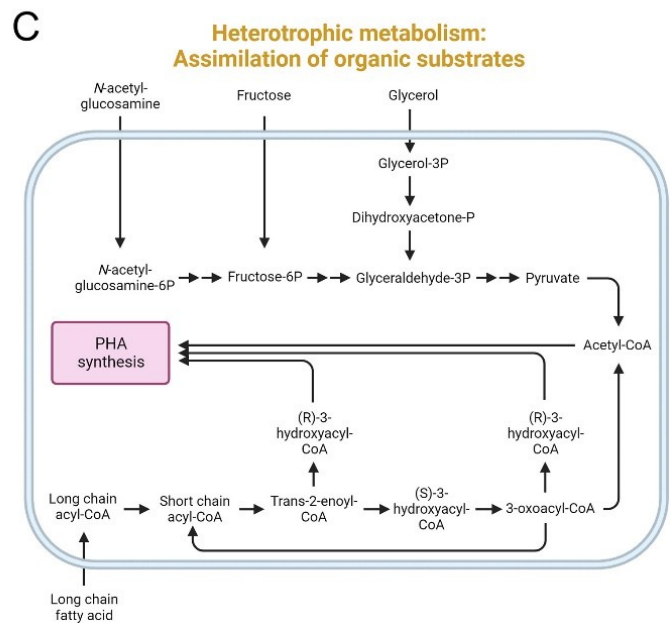
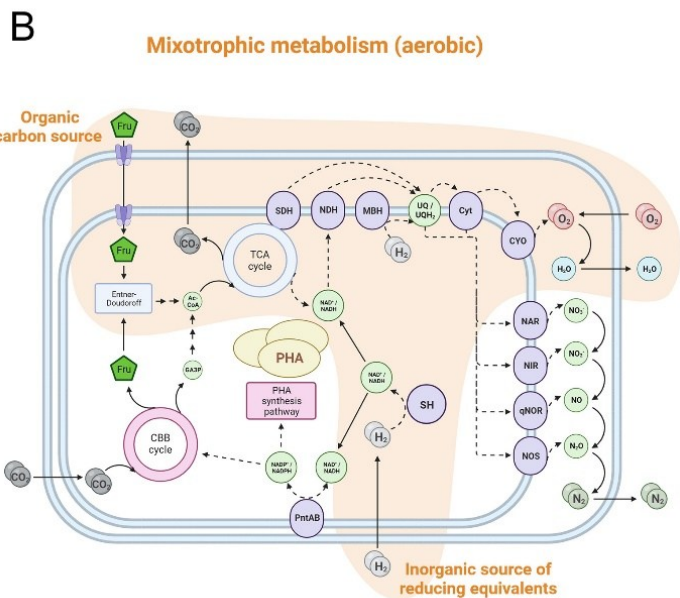
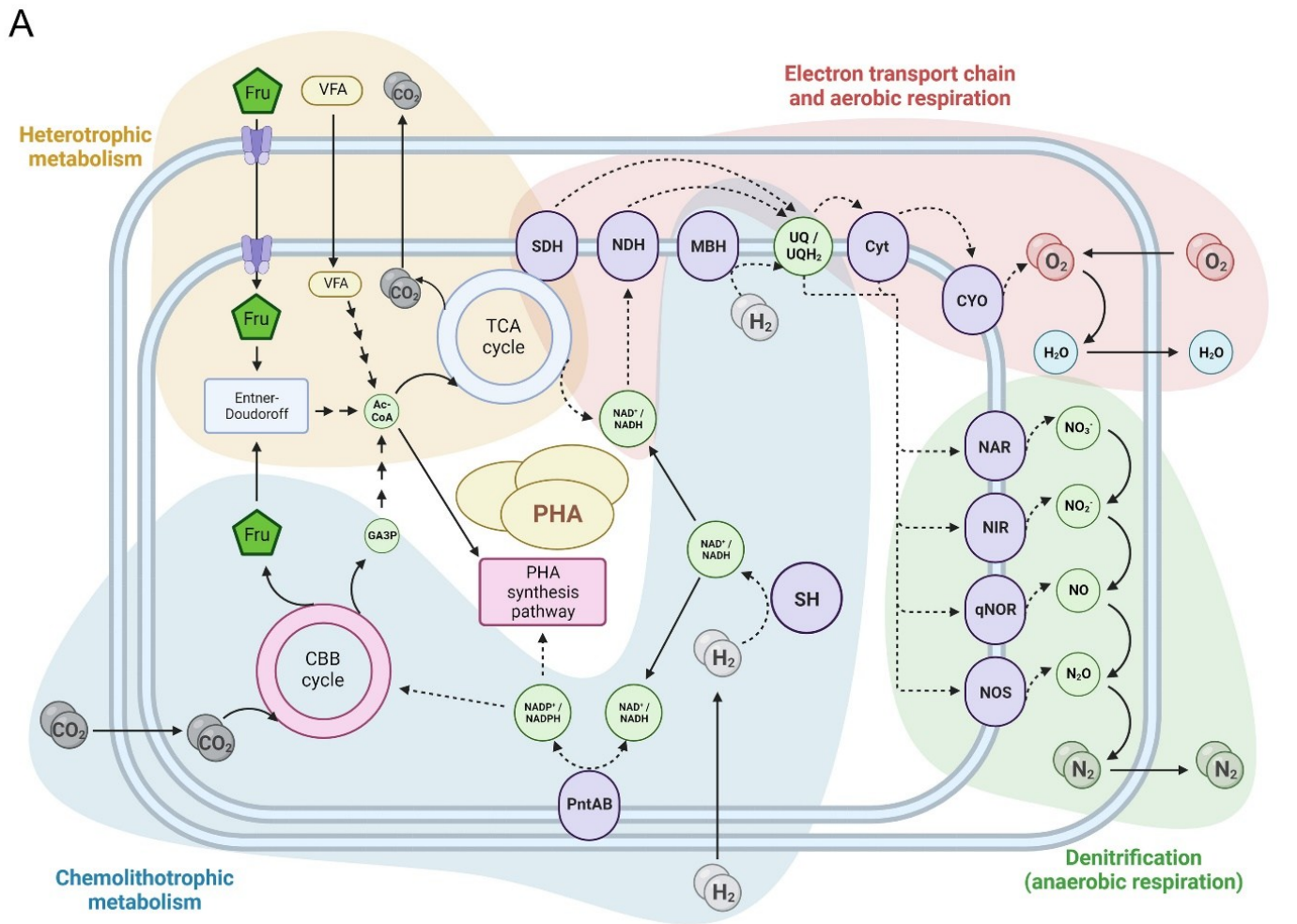
*Cupriavidus necator* è noto anche come *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* e *Hydrogenomonas eutropha*, risultato di successive revisioni tassonomiche.

---

Finora sono stati classificati dalla DSMZ 33 ceppi di *C. necator*, di cui 14 *wild-type* e i restanti 19 originati da mutagenesi o ingegneria genetica, tra cui DSM545, uno dei ceppi più applicati a livello industriale. DSM545 è classificato come H1 G<sup>+</sup>1 perché deriva dal ceppo H1 (DSMZ529, ATCC 23442) con una mutazione a carico del trasportatore della N-acetilglucosammina, che induce un aumento di affinità per il glucosio e ne permette il trasporto all'interno della cellula.<sup>2</sup>

Il metabolismo di *C. necator* è molto versatile e il ceppo meglio caratterizzato è l'H16, a cui si riferiranno tutte le successive considerazioni. La sua versatilità si manifesta nella possibilità di sfruttare sia composti organici ridotti sia idrogeno come donatori di elettroni, virando rispettivamente verso un metabolismo eterotrofo o chemolitotrofo; sono stati rilevati anche fenomeni di mixotrofia, per la quale si intende il concomitante ottenimento di C organico e agenti riducenti da substrati differenti. Ciò apporta un aiuto alla crescita quando la componente organica ridotta è insufficiente. Il passaggio da eterotrofia a chemolitotrofia o mixotrofia può avvenire in meno di 12 ore. Tutte queste peculiarità sono schematizzate nella **Figura 11**.

*C. necator* ha tre repliconi: cromosoma 1, cromosoma 2 e il plasmide pHG1; il primo codifica per geni *housekeeping*; i restanti due per geni coinvolti nel metabolismo chemolitotrofico e anaerobico.



**Figura 11.** Principali vie metaboliche di *C. necator*. (A) Metabolismo energetico di *C. necator*. I flussi di elettroni sono rappresentati con frecce tratteggiate, i flussi di metaboliti/carbonio con frecce continue. Gli elementi di colore viola sono ossidoreduttasi, quelli di colore azzurro sono le vie cataboliche, quelli di colore rosso sono le vie anaboliche. (B) Vie coinvolte nel metabolismo mixotrofico. (C) Vie di assimilazione e conversione in PHA di fonti di carbonio distinte in *C. necator wild-type*.<sup>4</sup>

**Abbreviazioni:** Fru, fruttosio; Ac-CoA, acetil-coenzima A; SDH, succinato deidrogenasi; SH, idrogenasi solubile; MBH, idrogenasi *membrane-bound*; PntAB, piridina-nucleotide-transidrogenasi; GA3P, gliceraldeide-3-fosfato; NDH, NADH deidrogenasi; UQ, ubiquinone, Cyt, citocromo di tipo b/c; CYO, citocromo ossidasi; NAR, nitrito reductasi; NIR, nitrito reductasi; NOR, ossido nitrico reductasi; NOS, ossido nitroso reductasi.

Nel metabolismo eterotrofo aerobico l'accettore finale di elettroni è l'O<sub>2</sub> e sfrutta diverse fonti di carbonio (fruttosio, N-acetilglucosammina, precursori e derivati del PHA, aminoacidi, VFA e intermedi del TCA), ma non il glucosio, per la mancanza di un trasportatore specifico per la sua assimilazione. La mancanza di un trasportatore specifico nel ceppo H16 pone un ostacolo allo sfruttamento del microrganismo a livello industriale, dove la fonte di carbonio principale fornita nei processi di fermentazione è spesso il glucosio (o derivati, scomponibili in glucosio); per tali ragioni è stato creato un mutante *ad hoc* (H16 G<sup>+</sup>) capace di assimilare glucosio grazie a una mutazione a carico del trasportatore della N-acetilglucosammina, aumentando l'affinità per il glucosio; l'aumento di glucosio intracellulare induce l'espressione del gene della via ED codificante la G-6-PDH (Gliceraldeide-6-fosfato-deidrogenasi). I ceppi etichettati come G<sup>+</sup> possono sfruttare il glucosio come fonte di carbonio.

Nel metabolismo eterotrofo anaerobico l'accettore finale di elettroni è il nitrato che viene completamente denitrificato da una specifica via metabolica. Il metabolismo anaerobico è caratterizzato da una curva di crescita con una lunga fase *lag* e da una limitata produzione di biomassa; tale condizione rende la crescita non ottimale per processi di fermentazione su larga scala. La crescita in anaerobiosi è possibile per la presenza di una specifica catena respiratoria per tutto il processo di denitrificazione, riducendo il nitrato ad azoto molecolare in quattro passaggi, sfruttando ogni intermedio di reazione come accettore finale di elettroni. Tutti questi enzimi, eccetto la nitrito reduttasi, sono codificati dal plasmide pHG1. La via metabolica di denitrificazione prevede i seguenti passaggi:

1. la riduzione di nitrato a nitrito è catalizzata da due reduttasi contenenti molibdopterina (NAR e NAP; entrambe sono proteine di membrana con azione catalitica, rispettivamente in ambiente citoplasmatico e periplasmatico. Inoltre NAR (codificato dal plasmide pHG1) ha una regolazione della sua attività dipendente dalla concentrazione di nitrato e nitrito, mentre NAP (codificato dal cromosoma 2) è prodotto durante la fase stazionaria di crescita e rimane stabile avendo un ruolo marginale rispetto a NAR;

2. la riduzione del nitrito a ossido nitrico mediante una nitrito reduttasi (NIR) codificata dal cromosoma 2 e contenente un gruppo eme;
3. l'ossido nitrico è dunque ridotto a ossido nitroso da una ossido nitrico reduttasi (NOR);
4. l'ossido nitroso è ridotto ad azoto molecolare dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS), sfruttando un citocromo di tipo c come donatore di elettroni.

È interessante notare come la scelta tra metabolismo aerobico e anaerobico si traduca anche in una modifica dei livelli di azione degli enzimi coinvolti nell'equilibrio redox: condizioni anossiche attivano enzimi NADH-dipendenti come lattato deidrogenasi o alcol deidrogenasi, mentre la concentrazione di NADPH decresce per via della limitata attività della transidrogenasi PntAB e della NAD<sup>+</sup> chinasi.

- Nel metabolismo chemolitotrofo la presenza della forma solubile di idrogenasi (SH – *Soluble Hydrogenase*) e di quella annessa alla membrana (MBH – *Membrane-Bounded Hydrogenase*) permettono l'ossidazione dell'idrogeno; entrambi sono Ni-Fe deidrogenasi e la forma solubile presenta un gruppo cianidrico offrendo così una certa tolleranza all'ossigeno. La MBH è ancorata nello spazio periplasmatico del microorganismo e indirizza gli elettroni direttamente nella catena respiratoria, mentre la SH riduce il NADP<sup>+</sup>; l'espressione dei due enzimi è regolata da un'ulteriore deidrogenasi, fungendo da sensore dell'idrogeno.

Per tutte le vie metaboliche descritte finora, i cofattori ridotti generati dall'ED e dal TCA trasportano gli elettroni alla catena respiratoria dove l'ossigeno funge da accettore finale; nello specifico il NADPH è generato nell'ED, mentre l'ubichinone ridotto dall'enzima succinato deidrogenasi nel TCA; l'equilibrio NADP<sup>+</sup>/NADPH è mantenuto dall'enzima isocitrato deidrogenasi del TCA.

Un'ulteriore capacità metabolica di *C. necator* è la fissazione del carbonio. Il carbonio è fissato sfruttando la via CBB e l'enzima RuBisCO, permettendo la crescita cellulare anche a basse concentrazioni di CO<sub>2</sub>, simili a quella atmosferica (400 ppm, 0,04%), sebbene coadiuvata da una anidraasi carbonica (codificata dal cromosoma 1), con la capacità di convertire HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in CO<sub>2</sub>. L'anidraasi carbonica è presente in tre isoforme con differenti ruoli: riconversione di CO<sub>2</sub> in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> per impedirne la ridiffusione fuori dalla cellula; conversione di HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in CO<sub>2</sub> per alimentare il CBB; interconversione HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CO<sub>2</sub> per il mantenimento del pH.

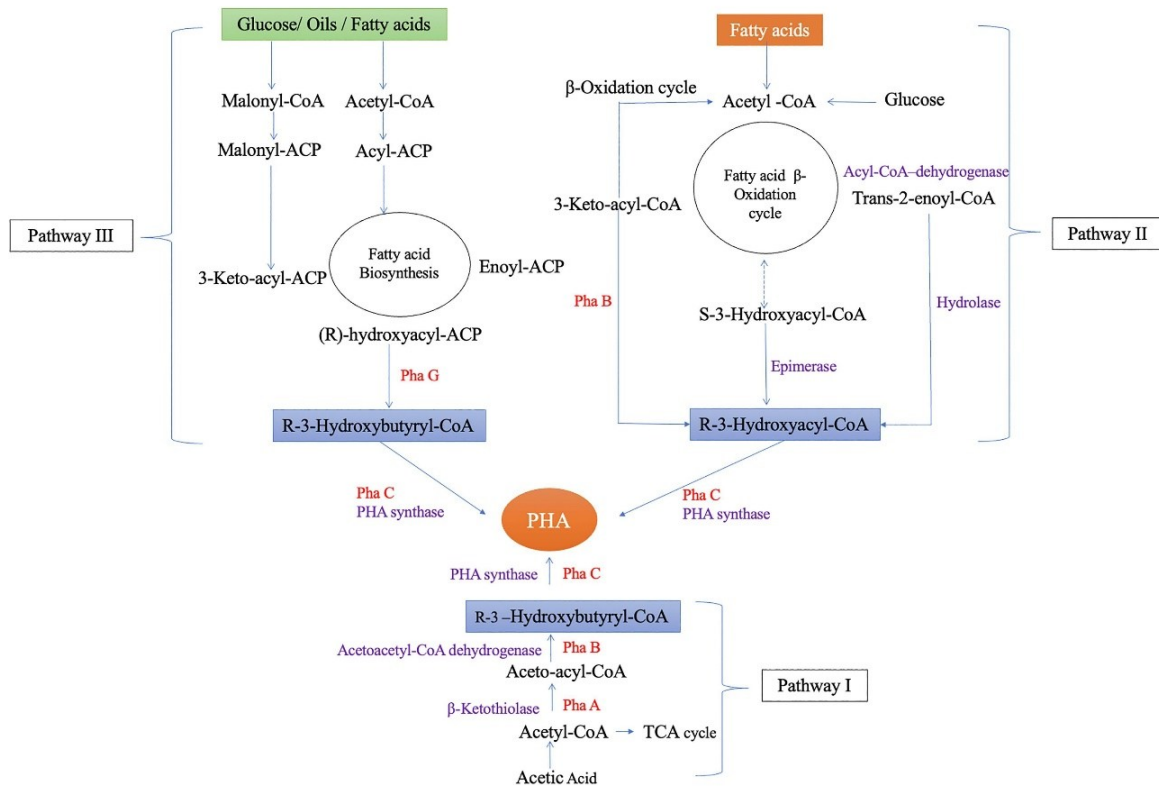
La possibilità di usare il formiato come fonte di carbonio deriva dalla capacità del microrganismo di ossidarlo a CO<sub>2</sub> usando una forma solubile di formiato deidrogenasi e come cofattore il NAD<sup>+</sup>; segue l'ingresso della CO<sub>2</sub> nella via CBB. Si tratta di un processo lento ed energeticamente dispendioso per la cellula.<sup>4</sup>

### 1.3.2. METABOLISMO PHA IN *P. putida*

*Pseudomonas putida* è un bacillo non patogeno Gram-positivo e aerobio obbligato, noto per la sua ampia versatilità metabolica e plasticità genetica, dalla crescita rapida con alte concentrazioni di biomassa, che non secerne prodotti secondari e avente scarse richieste nutritive, in grado di utilizzare diverse fonti di carbonio e caratterizzato da un vasto e articolato apparato regolatorio. Quest'ultimo conferisce flessibilità e rapidità di risposta ai cambiamenti ambientali improvvisi.<sup>31</sup>

In *P. putida* la classe di PHA prodotta è *mcl*-PHA e la relativa sintesi è possibile sfruttando tre *pathway* metabolici (**Figura 12**):<sup>10</sup>

- I. *pathway* metabolico di sintesi del PHA gestito dalle proteine del *cluster* genico *pha*;
- II. *pathway* di β-ossidazione per la conversione di acidi grassi o acetil-CoA in (R)-3-idrossiacil-CoA;
- III. *pathway* di connessione tra la via catabolica di fonti di carbonio non direttamente coinvolte con la produzione di PHA e il metabolismo degli acidi grassi e PHA.



**Figura 12.** Le tre vie metaboliche presenti in *P. putida* e coinvolti nella sintesi di PHA.<sup>28</sup>

Il *pathway* I permette la sintesi del PHA grazie ai geni riuniti nel *cluster pha*. È composto da due operoni altamente conservati (*phaC1ZC2D* e *phaFI*) e regolati dal fattore di trascrizione PhaD, il quale è sensibile alla variazione di concentrazione dei metaboliti prodotti dalla β-ossidazione. Il *pathway* II degrada gli acidi grassi per β-ossidazione convertendoli in (S)-3-idrossiacil-CoA e in (R)-3-idrossiacil-CoA ad opera dell'enzima 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi (FadB). Il *pathway* III sfrutta la via metabolica di produzione *de novo* di acidi grassi partendo da fonti di C come glucosio o etanolo; in questo processo i substrati sono ossidati ad acetil-CoA o a malonil-CoA, poi attivati con ACP e ottenendo infine monomeri di (R)-3-idrossibutiril-CoA, ad opera di PhaG, da usare nella polimerizzazione del PHA.<sup>30</sup>

Il metabolismo del PHA è un processo bidirezionale e dinamico di produzione e degradazione del polimero stesso; i prodotti dei geni PhaC (PHA sintasi) e PhaZ<sub>KT</sub> (PHA depolimerasi) sono sempre attivi, permettendo un'efficiente regolazione del flusso di carbonio tra i vari *pathway* metabolici e risultando nella capacità della cellula di adattarsi rapidamente a cambiamenti ambientali e disponibilità di nutrienti. La condizione ottimale di crescita per la produzione e accumulo intracellulare di PHA rimane quella in

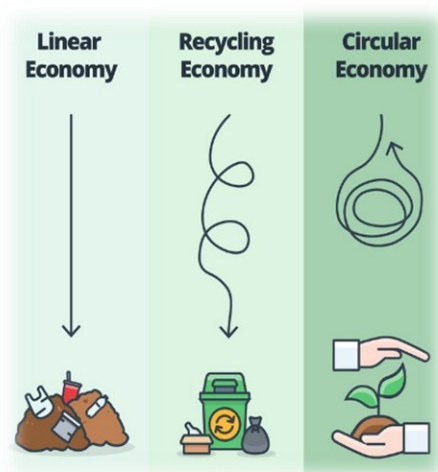
concentrazione limitativa di N seguita, in termini di efficienza, dalla condizione di copresenza C + N e infine da quella in cui è presente solo la fonte di C.

Non solo la disponibilità dei nutrienti influisce sulla sintesi del biopolimero, ma anche la geometria cellulare stessa ha un ruolo nella regolazione del metabolismo; questa condizione è definita “*non-growth associated PHA production*”, ossia produzione di PHA indipendente dalle condizioni e dallo stadio di crescita del microrganismo. È presente una seconda condizione di regolazione della produzione di biopolimero, legata in questo caso alla concentrazione di nutrienti e definita “*growth-associated PHA production*” (presente anche in *C. necator*).<sup>10,22</sup>

Altro meccanismo di regolazione del metabolismo del PHA è la presenza del meccanismo di repressione da catabolita, che delinea un uso gerarchico e sequenziale delle fonti di carbonio in presenza di varie fonti nutritive e in condizioni non limitanti.

#### 1.4. FERMENTAZIONE E PRODUZIONE INDUSTRIALE DI PHA

Negli ultimi anni l'idea di bioraffineria si è imposta sempre più come una tecnologia ecosostenibile allineata con i principi dell'economia circolare (Figura 13); tuttavia, le materie prime delle bioraffinerie rappresentano una delle principali sfide delle stesse perchè è necessario integrare nei processi produttivi fasi di pretrattamento della materia prima, al fine di renderla adatta al processo produttivo. Ciò richiede adeguamenti tecnologici che impattano il processo di produzione in termini di tempo e costi totali.<sup>9</sup>



**Figura 13.** Economia lineare, economia del riciclo ed economia circolare.

---

## Definizione di economia lineare, del riciclo e circolare

Nell'economia di tipo "lineare" si parte dalla materia prima fresca per ottenere il prodotto finale; in quella del riciclo si tende a recuperare il prodotto finale di scarto e a rigenerarlo; in quella circolare non esiste il concetto di "scarto": ogni sottoprodotto di un processo produttivo è materia prima per un altro. Ciò che prima viene considerato scarto di fatto viene valorizzato.

---

Nei bioprocessi su larga scala si tende a preferire l'uso di specie di microrganismi mesofili, sebbene il rischio di *cross-contamination* con altri mesofili sia alto. Questo rende dunque lo *scale-up* alquanto difficoltoso, essendo il mantenimento di sterilità uno dei requisiti nei processi di fermentazione.<sup>28</sup> La sterilità durante ogni fase del processo di produzione garantisce di ottenere il prodotto desiderato con elevato grado di purezza e di sicurezza, in termini di assenza di contaminanti o prodotti secondari non noti, prodotti da eventuali microrganismi contaminanti; essendo il brodo di fermentazione un terreno favorevole alla crescita dei microrganismi, l'eventuale contaminazione potrebbe inoltre alterare il bioprocesso stesso perché il contaminante potrebbe essere una specie meglio "attrezzata" a crescere rispetto a quella in uso nel processo di fermentazione e ciò porterebbe a una sopraffazione di una specie sull'altra, fino alla sua completa sostituzione.<sup>10</sup> Non è totalmente escluso però l'allestimento di processi di fermentazione termofila, specialmente per le condizioni operative (temperatura di fermentazione 50-60 °C) tali da ridurre il rischio di *cross-contamination* da mesofili, garantendo la sterilità durante il processo; inoltre durante queste attività il calore sprigionato dalle attività metaboliche dei microrganismi e dagli apparati di miscelazione del brodo del fermentatore può essere sfruttato per riscaldare il fermentatore stesso, risparmiando energia.

In sistemi di fermentazione *batch* e *fed-batch* le condizioni limitanti dei nutrienti per indurre la produzione e l'accumulo di PHA a livello intracellulare devono attestarsi per quanto riguarda l'N a concentrazioni di 2-3 g/L (come solfato d'ammonio), a 10-30 g/L per le fonti di carbonio semplici (es. glucosio, saccarosio o glicerolo). In alcune colture, inoltre, come ad esempio quelle finalizzate alla produzione di *mcl*-PHA, è necessario prestare attenzione alla concentrazione di lipidi nel brodo di fermentazione durante il processo di produzione: concentrazioni di acidi grassi superiori a 1 g/L hanno infatti un'azione inibitoria sui microrganismi nella produzione di PHA. Generalmente nei primi stadi di fermentazione,

subito dopo l'inoculo in fermentatore, le concentrazioni di zuccheri come fonte di carbonio sono in eccesso al fine di ridurre al minimo la fase di crescita *lag* e indurre la coltura in fase di crescita esponenziale in breve tempo per massimizzare i tempi e le rese di produzione.<sup>22</sup> La strategia alternativa di coltura dei microrganismi definita “*cyclic feast-and-famine feeding regimes*” consiste invece nell'alternare ciclicamente la disponibilità (*feast*) e l'assenza (*famine*) dei nutrienti. Dal momento che il PHA è accumulato in condizioni ambientali dinamiche, tale strategia comporta una pressione selettiva sulla coltura e la induce a produrre PHA.<sup>32</sup>

Per *C. necator*, in condizioni aerobiche, le rese di produzione di biomassa sono simili tra il metabolismo chemolitotrofico ed eterotrofico; quest'ultimo però presenta maggiori vantaggi, specialmente nelle modalità di fermentazione *batch* dove l'unico fattore limitante è l'ossigeno. Il metabolismo chemolitotrofico invece è fortemente dipendente dalla concentrazione e dalla disponibilità di ossigeno nel brodo di fermentazione (e dunque richiede specifici accorgimenti tecnici di configurazione del fermentatore).<sup>4</sup>

## 1.5. FEEDSTOCK

Una delle sfide principali per la produzione e commercializzazione dei biopolimeri su larga scala è l'abbassamento dei costi di produzione del PHA. Le più comuni fonti di carbonio si dividono in cinque categorie: gas (metano, anidride carbonica); alcoli (metanolo, etanolo, glicerolo); carboidrati (glucosio, lattosio, cellulosa); acidi alcanoici (acido propionico, acido butirrico, acido oleico); alcani (esano, ottano).<sup>7</sup> La scelta dei *feedstock* per alimentare un bioprocesso su larga scala può incidere sui costi di produzione totali fino al 50%. Processare le materie prime ha un impatto ecologico, a volte anche consistente: la coltivazione di mais, riso o altri cereali la cui cellulosa o amido possono essere sfruttati per la crescita dei microrganismi, ha impatti ecologici negativi in termini di smog fotochimico, eutrofizzazione e acidificazione delle acque e dei terreni, oltre a competere con le coltivazioni per l'alimentazione umana, sottraendo terreni utili; il *feedstock* ideale non dovrebbe essere in competizione con altre risorse, bensì essere frutto di un processo di valorizzazione di scarti o sottoprodotti di altre attività, in un'ottica di economia circolare.<sup>4,33</sup>

Le materie prime di seconda generazione possono contenere inibitori della crescita del microrganismo, fonti di carbonio non metabolizzabili, oppure materiale solido di difficile trattamento; per questo motivo spesso si rende necessario un pretrattamento della materia prima. Il pretrattamento può essere di natura chimica o fisica; per rendere il substrato

metabolizzabile più facilmente viene effettuata l'idrolisi, per purificare il substrato vengono impiegati metodi fisici come i carboni attivi e l'ultrafiltrazione. Il pretrattamento è quindi un procedimento utile a ottenere un substrato più pulito e pronto all'utilizzo.

Un esempio di filiera su cui si può agire virtuosamente è l'industria casearia. La produzione di 1 kg di formaggio genera 9 L di siero di latte come sottoprodotto che, a causa degli elevati valori di COD e BOD, è un inquinante ambientale che deve essere trattato prima dello smaltimento. Il siero di latte tal quale non è di semplice utilizzo per la presenza di grandi quantità di proteine e di lattosio. Solo pochi microrganismi sono in grado di metabolizzare queste biomolecole e sfruttarle per produrre PHA; anche in questo caso è spesso necessario un pretrattamento (es. ultrafiltrazione e idrolisi chimica o enzimatica).

Un altro esempio è l'industria saccarifera, responsabile della produzione di 4 tonnellate di melassa di scarto ogni 10 tonnellate di zucchero prodotto, con una produzione annua di 50 milioni di tonnellate. La melassa è una delle più utilizzate fonti di zucchero nei processi di fermentazione:<sup>28</sup> la caratteristica principale è la presenza di saccarosio (circa il 44% in peso), ma la sua composizione è in realtà molto variabile a seconda della tipologia del materiale grezzo da cui deriva (es. barbabietola o canna da zucchero) e del processo di estrazione utilizzato; la melassa contiene anche vitamine e elementi minerali utili per un'ottimale crescita microbica e per la produzione di PHA.<sup>4</sup>

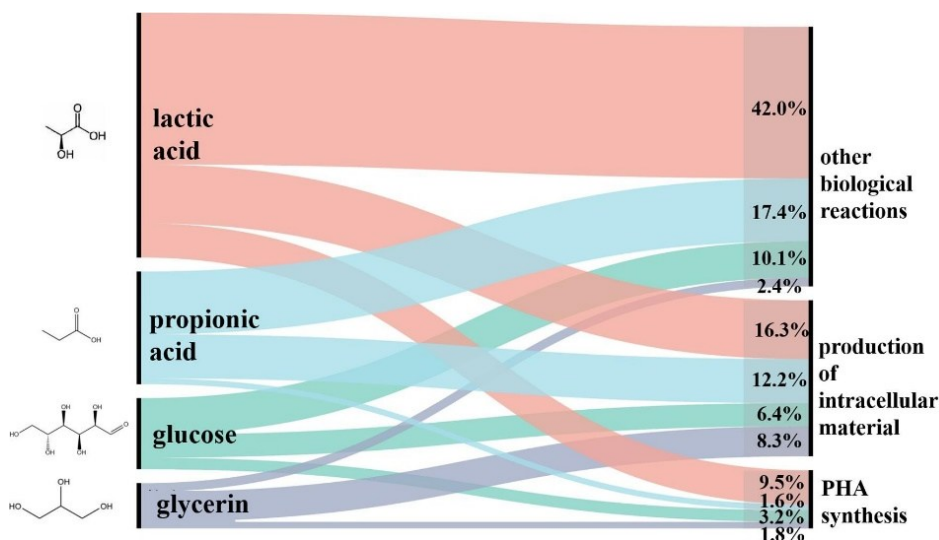
Il glicerolo è utilizzabile come fonte di C, sebbene la crescita e la produttività su tale substrato siano minori se confrontati con fruttosio. L'uso del glicerolo potrebbe generare una filiera circolare di valorizzazione degli scarti in grado di legare la produzione di PHA con la produzione di biodiesel: il glicerolo è il prodotto secondario del processo di sintesi del biodiesel tramite transesterificazione degli acidi grassi, i quali possono derivare da scarti di altre attività, come l'olio alimentare esausto o il grasso animale, e può essere utilizzato come fonte di C per la crescita dei microrganismi produttori di PHA. È stato osservato che biodiesel e glicerolo, se usati come materia prima per la produzione di PHA, porta rispettivamente a rese di produttività 0,95 g/(L×h) e 0,98 g/(L×h).<sup>4,10</sup>

È possibile sfruttare anche il fango oleoso da olio di palma (SPO), un prodotto secondario dell'industria dell'olio di palma, come substrato di crescita per *P. putida* per produrre *mcl*-PHA. Uno studio riporta che è possibile produrre biopolimero con ottime rese già a concentrazione di SPO di 1,01 g/L; se si considera l'olio alimentare esausto, a concentrazione di 58 g/L di PHA si ottiene una produttività di 0,76 g/(L×h).<sup>33</sup>

Gli zuccheri sono i substrati preferiti e i più efficienti, anche economicamente, per la crescita dei microrganismi, che forniscono rese elevate di PHA. Generalmente usando *C. necator*

nella prima fase di coltura in fermentatore, dopo l'inoculo, si fornisce glucosio in eccesso per favorire la rapida crescita della popolazione batterica e solo in una seconda fase si fornisce la fonte di carbonio da valorizzare, spingendo la coltura a produrre PHA.<sup>4,34</sup>

Per *C. necator* la fonte di C per ottenere rese di produzione di PHA più alte è l'acido lattico, seguito da glucosio, glicerolo e infine acido propionico. L'acido lattico viene considerato la fonte di C con il più alto peso secco (CDW) e la fonte di C che porta alla più alta concentrazione di PHA per unità di peso secco (**Figura 14**).<sup>34</sup>



**Figura 14.** Diagramma del flusso di carbonio in *C. necator*, fornendo come substrato acido lattico, acido propionico, glucosio e glicerolo.<sup>34</sup>

## 1.6. PROCESSI DOWNSTREAM

Il fattore principale che condiziona la resa di estrazione è il pretrattamento selezionato per la lavorazione iniziale del brodo di fermentazione, sfruttata per indebolire la struttura cellulare e favorire l'estrazione di PHA. Le tecniche più comuni sono trattamento al calore, liofilizzazione, ultra-sonicazione e trattamento con sali o agenti chimici (NaClO, NaOH o SDS); tuttavia non tutte queste pratiche risultano idonee a una applicazione industriale su larga scala. Al pretrattamento segue un ulteriore trattamento che può prevedere estrazione con solventi o enzimatica della NPCM, estrazione con surfattanti, estrazione meccanica.<sup>28</sup>

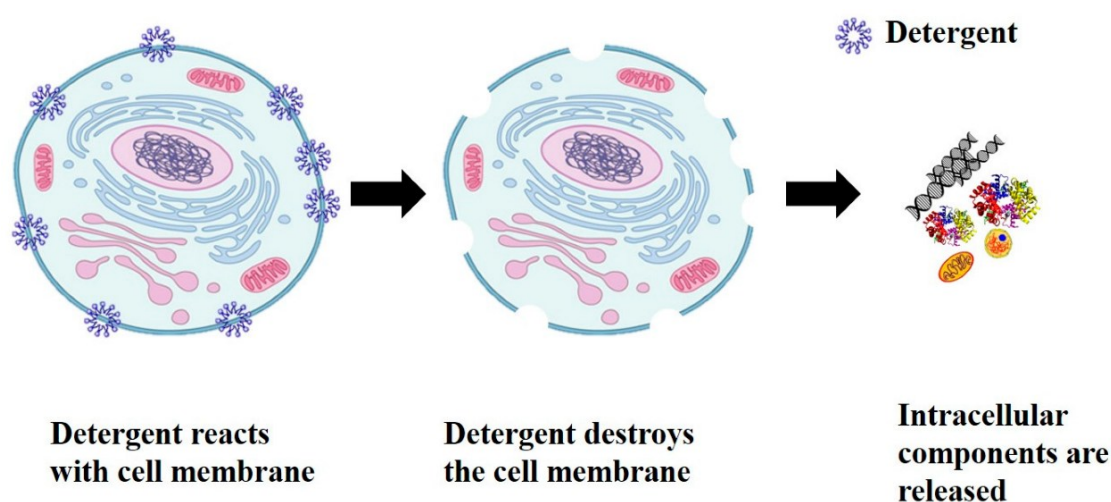
### 1.6.1. ESTRAZIONE CON SOLVENTI

L'azione di lisi della componente NPCM da parte dei solventi chimici avviene mediante due meccanismi: alterazione della permeabilità delle membrane cellulari e capacità di solvatare il PHA contenuto nelle cellule stesse. I solventi clorurati (es. cloroformio, 1,2-

dicloroetano e ipoclorito di sodio) hanno una capacità di solvatazione migliore. Tuttavia l'estrazione con questi solventi è aspecifica. Anche se meno efficienti, acetone, cicloesano, ciclopentanone possono essere utilizzati in sostituzione dei solventi clorurati. Anche se le rese di estrazione sono generalmente modeste, il grado di purezza dei biopolimeri estratti risulta elevato. Il meccanismo d'azione di questi solventi si basa sulla dissoluzione dei carbonosomi di PHA e la denaturazione della naturale morfologia fibrosa del PHA, che non viene degradato.<sup>35</sup> La fase finale del processo consiste nel recupero del polimero tramite precipitazione dopo evaporazione del solvente.

### 1.6.2. DIGESTIONE CON SURFATTANTI

La digestione con surfattanti (*Surface Active Agent*) si basa sulla solubilizzazione della componente NPCM, come raffigurato in **Figura 15**. I surfattanti, come SDS e Triton X-100, sono molecole organiche in grado di formare micelle inglobando i detriti cellulari.<sup>36,37</sup> I surfattanti sono molecole costituite da una “testa” polare e una “coda” apolare. Questa peculiarità rende i surfattanti termodinamicamente instabili per la forza repulsiva tra la coda apolare e la fase liquida in cui è immerso il surfattante (spesso acqua); questa caratteristica di anfipaticità permette di separare la fase acquosa da quella apolare agendo sulla loro interfaccia, riducendone la tensione superficiale con la formazione di micelle.



**Figura 15.** Azione di lisi cellulare ad opera dei surfattanti con rilascio delle componenti intracellulari.<sup>37</sup>

La formazione di micelle è dovuta all'aggregazione in sfere delle molecole di surfattante al fine di bilanciare le interazioni polari e apolari della molecola stessa con l'ambiente, riducendo l'energia libera del sistema. Durante questo fenomeno, vengono inglobati nelle micelle non solo la componente NPCM ma anche le proteine.<sup>36,38</sup>

La concentrazione micellare critica (CMC) è la concentrazione di surfattante minima necessaria per la formazione delle micelle: in una soluzione, all'aumentare della concentrazione di surfattante, si verifica la saturazione della soluzione e successivamente, al superamento della soglia di saturazione, l'aggiunta di ulteriore surfattante indurrà la formazione di micelle.<sup>35</sup>

Ci sono diverse tipologie di surfattanti, classificati in base alle caratteristiche chimiche: cationici, anionici, non ionici e *zwitterionici*. Il surfattante SDS appartiene alla categoria dei surfattanti anionici, la sua CMC è  $8,3 \times 10^{-3}$  M, fortemente dipendente dalla temperatura del sistema; la dipendenza CMC-temperatura è una caratteristica rilevante, soprattutto per i surfattanti ionici, ed è legata principalmente alla solubilità del surfattante a diverse temperature (fenomeno di Krafft).<sup>39</sup>

Diversi batteri Gram-negativi, come *C. necator*, presentano alte concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  a livello delle membrane esterne quindi l'aggiunta di chelanti dei metalli (es. EDTA) destabilizza la struttura delle membrane cellulari esterne, formando complessi chelati con i cationi divalenti e di conseguenza destabilizzando anche le membrane interne, facilitando la solubilizzazione da parte dei surfattanti.<sup>35</sup>

### 1.6.3. OMOGENEIZZATORE

Tra i trattamenti meccanici, quello più applicato in questo campo è il trattamento con l'omogeneizzatore. Oltre ad essere economicamente vantaggioso, permette di danneggiare e lisare le cellule causando solo una lieve degradazione del PHA.<sup>21</sup> Nell'omogeneizzatore ad alta pressione la soluzione con la componente cellulare è forzata, per la pressione applicata, a passare attraverso un orifizio: la disgregazione delle cellule avviene a causa della compressione all'ingresso nell'orifizio e alla decompressione all'uscita; il processo genera calore, spesso problematico, in termini di degradazione termica del polimero.<sup>37</sup> Tra i parametri da considerare vi sono pressione operativa, numero di passaggi attraverso lo strumento e temperatura operativa.

### 1.6.4. LISI ENZIMATICA

Il vantaggio di usare enzimi nei processi di estrazione di PHA dalle cellule di microrganismi si basa sulla elevata attività e specificità degli enzimi, sulla loro affinità per il substrato e sulle blande condizioni di reazione richieste, che spesso si traduce in alte rese e in condizioni che non alterano il prodotto finale. Lisozima, tripsina,

chimotripsina, papaina e bromelina sono stati selezionati attraverso ricerche in letteratura per la lisi enzimatica grazie alla loro capacità di digestione della parete cellulare dei microrganismi, costituita principalmente da peptidoglicano. La lisi avviene o attraverso la scissione del legame  $\beta$ -1,4-glicosido tra l'N-acetilglucosammina (NAG) e l'acido N-acetilmuramico (NAM) e il tetrapeptide che connette il polimero di NAG-NAM alla parete cellulare batterica, oppure mediante lisi della componente proteica delle membrane cellulari.<sup>30</sup>

Spesso l'estrazione non avviene esclusivamente con enzimi: si tende ad operare un pretrattamento (il più diffuso è il trattamento al calore o la lisi meccanica in omogeneizzatore), seguito da idrolisi enzimatica e da lisi chimica mediante surfattanti<sup>33</sup> per un approccio sinergico che favorisce l'ottenimento di un polimero con elevata purezza e con alte rese di estrazione.

Altro aspetto da non ignorare è il costo degli enzimi: il loro acquisto può incidere notevolmente sui costi globali di produzione del PHA. Il prezzo degli enzimi commerciali dipende dal tipo di enzima e dalla fonte da cui è purificato. Il lisozima, purificato dall'albume d'uovo, è già largamente impiegato a livello industriale, soprattutto nelle filiere alimentari, e ha un costo accessibile. Tripsina o bromelina, invece, ottenuti da animali o piante, sono più costosi. È possibile considerare l'uso di enzimi immobilizzati che possono essere recuperati al termine della lisi enzimatica. Tuttavia questo approccio la necessità di un passaggio aggiuntivo di filtrazione per il recupero dell'enzima.

#### **1.6.5. METODO DI ESTRAZIONE SVILUPPATO DA VERSALIS S.p.A.**

Presso Versalis S.p.A., come recente attività nel centro di ricerca, è stato sviluppato un protocollo di estrazione chimica di biopolimeri di PHB e PHBV, con l'impiego del surfattante SDS in concentrazione 0,1-0,5 w/w in una reazione di lisi effettuata a temperatura ambiente e a pH 9,5-10, abbinata a un pretrattamento meccanico di omogeneizzazione a 800-1500 bar per 1-5 cicli.<sup>40</sup> Mediante queste procedure si estraggono ottimamente i granuli di biopolimero dalle cellule batteriche, e il loro recupero e lavaggio avviene per centrifugazione. Il polimero così ottenuto può essere essiccato in stufa o subire un processo di liofilizzazione. Tale procedura interna è applicata sui brodi di fermentazioni ottenuti durante le produzioni di biopolimero del centro di ricerca, sia a livello di laboratorio sia a livello di impianto pilota di produzione, con ottime rese di estrazione (>85%) ed elevata purezza del campione finale (>96%). I punti di forza di

questo protocollo di estrazione sono i pochi passaggi di reazione richiesti, l'impiego di due soli reagenti e il fatto che l'intero processo avviene essenzialmente a temperatura ambiente.

### 1.7. APPLICAZIONE INDUSTRIALE DI PHA

L'applicazione industriale principale dei biopolimeri di PHA è come sostituti delle plastiche di origine fossile. I PHA costituiscono una variegata famiglia di biopolimeri aventi marcate differenze; alcune tipologie possono essere impiegate nel settore biomedico, altre per la sostituzione delle più comuni plastiche come PE o PET, altre come additivi per PVC e PLA. Quando vengono utilizzate come additivi per PVC, l'intento è aumentare la percentuale di polimero da fonte rinnovabile, nel caso di PLA, l'obiettivo è migliorare la biodegradabilità del prodotto.<sup>41</sup> Il PHB prodotto industrialmente è generalmente commercializzato *blend* con altri biopolimeri come l'acido polilattico (PLA) e l'amido termoplastico (TPS) o con polimeri sintetici (ma comunque biodegradabili) come il poliestere poli-butilen-adipato-tereftalato (PBAT); oppure trattato con additivi (agenti nucleanti o stabilizzanti) o agenti plasticizzanti.<sup>6</sup> Come accennato sopra, l'applicazione di PHA in campo biomedico è consentito grazie al basso tasso di idrolisi di tali composti; ciò consente, per esempio, l'impiego come biofilm medici per suture o come *drug carrier*. Uno studio infatti ha evidenziato come microsfele di PHA associate all'antibiotico rifampicina rilascino l'antibiotico molto velocemente, quasi il 90%, in meno di 24 ore.<sup>35,42</sup>

Un'altra applicazione riguarda l'industria alimentare: la carta di origine vegetale è ampiamente usata in ogni industria, ma a causa della sua porosità e idrofilia, necessita di un processo di *coating* con polimero (ad oggi di origine petrolifera), il quale può essere sostituito da composti di PHA, specialmente PHBv. Generalmente il processo di *coating* prevede di solubilizzare il biopolimero in un solvente idoneo, applicare la soluzione sul prodotto e far evaporare il solvente mediante un aumento della temperatura per consentire al polimero di depositarsi sul prodotto.<sup>43</sup> Nuovi approcci, più in linea con i principi di economia circolare, prevedono tecniche di applicazione di strati di biopolimero su superfici senza l'uso di solventi, bensì applicando strati di biopolimero fuso, o solido in *slurry* acquoso, tramite estrusione o *dispersion coating*: la prima tecnica permette di allestire un processo in continuo, garantendo un *coating* del materiale uniforme. Il biopolimero in uso però deve avere alta stabilità termica senza incorrere in degradazione, caratteristiche che i polimeri di PHA non possono garantire totalmente. La tecnica di *dispersion coating*, più indicata per il PHA e per quei polimeri senza elevate proprietà termoplastiche, consiste nel creare una sospensione

granulare di biopolimero che viene poi fuso per rivestire efficacemente il materiale. Questa procedura permette l'applicazione di un *layer* di biopolimero con maggiore efficienza e controllo dello spessore.<sup>44</sup> È bene ricordare come le proprietà strutturali e termoplastiche dei biopolimeri di PHA possono essere migliorate tramite l'aggiunta di additivi o, per migliorare l'adesione del *layer* sul materiale, pretrattando il materiale stesso con *primer* di origine chimica.

## **2. SCOPO DEL LAVORO**

Il lavoro descritto in questa Tesi è stato svolto presso l'azienda Versalis S.p.A. con sede a Rivalta Scrivia (AL).

Lo scopo di questo lavoro di Tesi consiste nello sviluppo di un metodo di estrazione enzimatica di biopolimeri da ceppi produttori di PHA che sfrutti l'azione degli enzimi in sinergia con trattamenti meccanici e/o chimici per migliorare l'efficienza di estrazione dei granuli di PHBv e *mcl*-PHA dai ceppi produttori *C. necator* e *P. putida* rispetto alla procedura in uso brevettata da Versalis S.p.A.<sup>40</sup> Tale procedura abbina un trattamento meccanico a uno chimico sfruttando l'azione di surfattanti. Lo scopo del lavoro di Tesi si direziona anche verso lo studio della possibilità di ridurre l'utilizzo massivo di tensioattivo.

La prima parte del lavoro di Tesi ha previsto una attenta ricerca di letteratura per verificare lo stato dell'arte in materia di sfruttamento degli enzimi nei processi *downstream* di estrazione dei biopolimeri. Successivamente, identificati cinque protocolli enzimatici promettenti (in eventuale associazione con surfattanti e previo trattamento meccanico o termico), la seconda parte del lavoro di Tesi ha previsto l'esecuzione di tali protocolli su scala di laboratorio.

Per quanto riguarda l'estrazione di PHBv da *C. necator*, lo scopo dell'ultima fase del lavoro di Tesi, una volta individuato il protocollo enzimatico di estrazione migliore (in termini di resa e purezza del campione estratto), è stato quello di ottimizzare tale protocollo seguendo le linee di seguito riportate: semplificazione dei passaggi previsti dalla procedura, variazione delle condizioni operative per il trattamento meccanico e delle concentrazioni dei reagenti coinvolti nella reazione di lisi enzimatica.

Per quanto riguarda l'estrazione di *mcl*-PHA da *P. putida*, non avendo a disposizione dati di riferimento interni per i campioni di *mcl*-PHA estratti per la valutazione della qualità e dell'efficienza dei protocolli enzimatici testati, il lavoro di Tesi ha previsto l'esecuzione di prove di estrazione chimica del polimero con solventi, al fine di ottenere un campione ad elevata purezza, da utilizzare come riferimento.

### **3. MATERIALI E METODI**

### 3.1. OMOGENEIZZATORE

L'attrezzatura usata per ogni trattamento meccanico descritto nella parte sperimentale è l'omogeneizzatore da banco GEA Niro Soavi Panda Plus. La pressione operativa sfruttata per le prove sperimentali varia da 500-1000 bar di pressione a seconda del protocollo sperimentale applicato, a fronte di una pressione operativa massima dello strumento di 2000 bar. Vista la necessità, in determinati protocolli in studio, di più passaggi di trattamento all'interno dello strumento, è possibile allestire un sistema a ciclo chiuso: essendo la portata dello strumento di 150 mL/h, è possibile calcolare il tempo necessario di attività della macchina affinché vengano eseguiti  $n$  cicli. Lo strumento prevede anche un sistema di refrigerazione ad acqua della tramoggia al fine di mantenere bassa e costante la temperatura del materiale e della macchina che tendono a riscaldarsi per l'energia termica dovuta all'attrito generato dallo strumento.

### 3.2. CENTRIFUGA

Per le fasi di centrifugazione è stata utilizzata la centrifuga Beckman Coulter Avanti J-26S XP con due differenti rotori a seconda delle velocità di centrifugazione richieste: il rotore JLA-8.1000 Fixed Angle (20°) con raggio  $r_{\max} = 222,8$  mm e con velocità massima raggiungibile di 8000 rpm (15970 RCF); il rotore JA-25.50 Ti Fixed Angle (34°) con raggio  $r_{\max} = 108$  mm e con velocità massima raggiungibile di 25000 rpm (75600 RCF). Lo strumento è termoregolabile e i processi di centrifugazione sono stati eseguiti a temperatura ambiente (20-25 °C).

### 3.3. SHAKER

Le fasi di lisi enzimatica sono state condotte nello shaker ThermoFisher MaxQ8000 che permette di impostare la temperatura della camera (max 60 °C) e l'agitazione della piattaforma (max 400 rpm).

### 3.4. STUFA VENTILATA

Per l'essiccamento in stufa è stato utilizzato il forno Mod. 2100 F.Ili Galli, con la possibilità di impostare la temperatura della camera e una ventilazione forzata. Il campione finale essiccato viene pesato e dal valore della massa viene calcolata la resa (%) di estrazione del processo, secondo questa formula:

$$Resa (\%) = \frac{massa PHA_{post-essiccamento}}{massa PHA_{iniziale}} * 100$$

Per  $massa PHA_{iniziale}$  si intende la quantità di biopolimero presente nelle cellule del fermentato iniziale, in relazione al volume successivamente sottoposto a trattamento; il contenuto (%) di PHA all'interno delle cellule viene fornito da analisi TGA sui campioni cellulari.

### 3.5. LIOFILIZZATORE

Il liofilizzatore utilizzato è il modello Telstar LyoQuest LQ-85, caratterizzato da una capacità del condensatore ghiaccio di raggiungere la temperatura di  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . È disponibile anche l'opzione di termoregolare la temperatura dei ripiani nell'unità dove poggiano i campioni. Per la liofilizzazione dei campioni di *mcl*-PHA è stata elaborata una ricetta *multi-step* come riportato in **Tabella 3**:

Step	Processo	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Pressione (mbar)	Tempo (hh:mm)
1	<i>Freezing</i>			36:00
2	<i>Cool + Vacuum</i>	-80	0,400	12:00
3	<i>Cool + Vacuum</i>	-80	0,100	48:00
4	<i>Heat shelves</i>	25	0,100	25:00
5	<i>Stop</i>			

**Tabella 3.** *Freezing*: fase di raffreddamento del sistema e del condensatore; *cool + vacuum*: il sistema è mantenuto freddo e portato alla pressione impostata; *heat shelves*: i ripiani vengono riscaldati fino alla temperatura impostata.

Il campione finale liofilizzato viene pesato e dal valore di massa viene calcolata la resa (%) di estrazione del processo, secondo questa formula:

$$Resa (\%) = \frac{massa PHA_{post-essiccamento}}{massa PHA_{iniziale}} * 100$$

Per  $massa PHA_{iniziale}$  si intende la quantità di biopolimero presente nelle cellule del fermentato iniziale, in relazione al volume successivamente sottoposto a trattamento; il contenuto (%) di PHA all'interno delle cellule viene fornito da analisi TGA sui campioni cellulari.

### 3.6. TERMOBILANCIA

La termobilancia Mettler-Toledo Moisture Analyzer HB43-S è stata usata per il calcolo dell'umidità presente in un campione. Il principio di funzionamento prevede il riscaldamento del campione fino a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  e la percentuale di umidità persa è restituita in valore percentuale (MC – *Moisture Content*), basandosi sulla perdita di massa del campione dovuta all'umidità evaporata durante il processo. In queste condizioni evapora l'acqua, ma anche altri solventi

e, di conseguenza, il campione rimanente è costituito da una componente solida non evaporabile (WIS – *Water Insoluble*) e dai solidi solubili (WS – *Water soluble*) precipitati per la perdita di umidità. La somma della componente WIS e WS dà la componente solida totale (TS – *Total Solid*). Con questa tecnica non è possibile monitorare la perdita della componente solida volatile (VS – *Volatile solid*) tramite l'evaporazione del solvente. Lo strumento fornisce un valore percentuale negativo (es.  $MC = -75,3\%$ ) corrispondente all'umidità persa e, di conseguenza, è possibile ottenere la percentuale della componente TS con la formula:

$$TS = 100 - |MC|$$

(es.  $TS = 100\% - 75,3\% = 24,7\%$ ).

Con il valore TS è possibile calcolare la concentrazione della componente solida del campione iniziale con la formula:

$$\left[ \frac{g}{kg} \right] = |TS| * 10$$

(es.  $[g/kg] = 24,7 * 10 = 247 g/kg$ ).

### 3.7. TGA – ANALISI TERMOGRAVIMETRICA

La tecnica TGA (*Thermal Gravimetric Analysis*) misura le variazioni di massa di un campione sottoposto a un preciso programma di riscaldamento in atmosfera controllata; la sua applicazione nel campo dei polimeri riguarda caratterizzazione del materiale e stabilità termica. I processi chimici studiati sono, per i polimeri, i fenomeni di desorbimento, disidratazione, sublimazione, vaporizzazione e decomposizione. Per le analisi sul polimero PHBv il programma di analisi prevede la presenza di azoto nell'atmosfera di reazione (passaggio gas-azoto 20 mL/min) con il seguente programma di temperatura:

1. 1 min a 30 °C
2. Riscaldamento da 30 °C a 610 °C a 10 °C/min
3. Riscaldamento da 610 °C a 800 °C a 40 °C/min

L'analisi termogravimetrica è un metodo particolarmente semplice e rapido per dare un'indicazione della purezza del campione sottoposto a indagine. Uno dei modi possibili per

definire la purezza misurare i due parametri indici di Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%): minori saranno questi valori (%), maggiore sarà la purezza del campione. Per i campioni presentati in questa Tesi, la purezza (%) è stata calcolata come segue:

$$\text{Purezza (\%)} = 100 - \text{Residuo al Gomito (\%)}$$

considerando, durante l'analisi, tutto ciò che viene degradato dopo la temperatura di Residuo al Gomito (%) come componente non contenente PHA.

### 3.8. DSC – CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE

La tecnica DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) misura le variazioni di energia termica nei materiali. Si misura la quantità di energia richiesta per mantenere il campione e il riferimento alla stessa temperatura. L'applicazione della DSC nel campo dei polimeri riguarda l'identificazione delle temperature di transizione di fase o strutturali e la stabilità termica. I processi chimici studiati sono, per i polimeri, i fenomeni di cristallizzazione, fusione, rimozione di solvente e decomposizione. Per l'analisi dei campioni generalmente sono previsti un primo ciclo di riscaldamento (per rimuovere ogni tipo di storia termica che il campione possa avere subito nel corso dei trattamenti di estrazione), seguito da uno di raffreddamento e infine un secondo ciclo di riscaldamento. Per le analisi sul polimero PHBv è stato seguito il seguente programma di analisi:

1. Riscaldamento da 0 °C a 175 °C a 10 °C/min
2. Raffreddamento da 175 °C a 0 °C a 10 °C/min
3. Riscaldamento da 0 °C a 200 °C a 10 °C/min

Lo strumento fornisce un grafico che riporta il flusso di calore in funzione della temperatura da cui è possibile ricavare i valori di picco delle curve di riscaldamento (temperatura di fusione  $T_m$ ) e raffreddamento (temperatura di cristallizzazione,  $T_c$ ), il relativo valore  $\Delta H_m$  di entalpia di fusione e il valore  $X$  definito come:

$$X (\%) = \frac{\Delta H}{146} \cdot 100$$

Il valore pari a 146 J/g corrisponde all'entalpia di fusione di un PHA perfettamente cristallino.

### 3.9. GPC – GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY

La tecnica GPC (*Gel Permeation Chromatography*) è un tipo di cromatografia ad esclusione in grado di separare una miscela in base ai pesi molecolari, dimensione e diametro. La fase stazionaria è costituita da *beads* di gel poroso, la fase mobile invece da cloroformio. Il campione, solubilizzato nel solvente, viene caricato sulla colonna ed eluito dalla fase mobile. Il campione viene separato nelle sue componenti a seconda della loro dimensione rispetto a quella dei pori del gel della fase stazionaria: componenti di dimensioni maggiori non sono in grado di attraversare i pori del gel e dunque eluiscono più velocemente delle componenti di dimensioni minori, che rimangono intrappolate nei pori generando una eluizione più lenta. La capacità di selezione di questa tecnica dipende dalla dimensione media dei pori del gel della fase stazionaria.

All'uscita della colonna è presente un *detector* in grado di rivelare la presenza di materiale nell'eluato. Il dato fornito dello strumento è un cromatogramma intensità in funzione del tempo: confrontando l'eluizione del campione con standard di peso molecolare noto è possibile ricavare i seguenti dati:  $M_n$ ,  $M_w$  e il PDI (*PoliDispersivity Index*), dato dal rapporto:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

Il valore  $M_n$  (massa molecolare media numerale) fornisce la media dei pesi delle catene polimeriche; il valore  $M_w$  (massa molecolare media ponderale) fornisce invece un'indicazione di come il peso del polimero è distribuito tra le unità monomeriche. Il valore di PDI rappresenta l'uniformità di distribuzione dei pesi molecolari in un polimero: più il valore è vicino a 1, più il polimero viene definito monodisperso, viceversa, più il valore si discosta da 1, più il polimero è polidisperso.

### 3.10. EVAPORAZIONE A PRESSIONE RIDOTTA

L'evaporazione forzata di solventi durante i processi di estrazione è effettuata a pressione ridotta con l'uso del Rotavapor, strumento che consente di regolare la temperatura del campione da sottoporre ad evaporazione, la temperatura del liquido refrigerante e la pressione dell'impianto (mbar), a seconda delle caratteristiche del solvente da evaporare (temperatura di ebollizione). Per determinare le condizioni operative di temperatura e pressione viene preso come riferimento un nomogramma temperatura-pressione, per mettere in relazione la temperatura a cui portare il materiale con la pressione da raggiungere mantenendo come riferimento la temperatura di ebollizione del solvente.

### 3.11. REAGENTI E SOLVENTI

Sono riportati in **Tabella 4** Tutti i reagenti e i solventi utilizzati negli esperimenti descritti in questa Tesi, con le relative indicazioni commerciali e specifiche tecniche. Tutti i prodotti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich®.

NOME	CAS
Acetone	67-64-1
Acido etilendiamminotetraacetico	60-00-4
Ciclopentanone	120-92-3
Etanolo	64-17-5
Sodio dodecil solfato	151-21-3
Cloroformio	67-66-3

Tabella 4. Reagenti e solventi utilizzati negli esperimenti descritti

### 3.12. ENZIMI

In **Tabella 5** sono riportati tutti gli enzimi utilizzati negli esperimenti descritti in questa Tesi, con le relative indicazioni commerciali e specifiche tecniche. Tutti i prodotti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich®.

ENZIMA	EC	CLASSE	CAS
Bromelina	3.4.22.33	Idrolasi, peptidasi, cistein-proteasi	37189-34-7
Enzima idrolitico	/	Idrolasi, glicosilasi, glicossidasi	/
Tripsina	3.4.21.4	Idrolasi, peptidasi, serin-proteasi	9002-07.2

Tabella 5. Enzimi utilizzati negli esperimenti descritti

### 3.13. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI PHB<sub>v</sub> CON BROMELINA

Il protocollo è stato sviluppato per l'estrazione di PHB<sub>v</sub> con l'uso dell'enzima Bromelina. Il biopolimero è prodotto da *C. necator*, partendo da un fermentato cellulare fresco. Sono riportati di seguito i passaggi del processo.<sup>30</sup>

#### 1. Trattamento in omogeneizzatore

Il fermentato contenente le cellule batteriche in peso (8,25 g) è sospeso in un buffer citrato 100 mM pH 4,75, sottoposto a un trattamento meccanico in omogeneizzatore e filtrato (0,15 mm).

## 2. Lisi enzimatica con Bromelina

Il fermentato trattato è risospeso nel buffer citrato 100 mM pH 4,75 fino a una concentrazione finale di 25 g/L. La soluzione viene pre-incubata a 50 °C a 200 rpm. Si aggiungono 5 mL di soluzione enzimatica contenente Bromelina per avere una concentrazione finale nella soluzione di 2%  $\text{g}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$  (attività enzima 14,1 U/mL). La lisi è condotta a 50 °C sotto agitazione a 200 rpm per 7,5 ore.

## 3. Centrifugazione e lavaggi

La soluzione subisce un ciclo di centrifugazione a 42000 RCF per 10 min a 4 °C; il pellet viene risospeso in una soluzione salina 0,85% e centrifugato nelle medesime condizioni. La procedura viene ripetuta due volte.

### 3.14. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI PHBV CON TRIPSINA

Il protocollo è stato sviluppato per l'estrazione di PHBV con l'uso dell'enzima Tripsina coadiuvato dall'azione dell'EDTA e dell'SDS. Il processo è stato messo a punto per l'estrazione di PHBV prodotto da *C. necator*, partendo da un fermentato cellulare fresco. Sono riportati di seguito i passaggi del processo.<sup>45</sup>

#### 1. Centrifugazione e lavaggi

Il fermentato contenente le cellule batteriche e il biopolimero, non ancora estratto, subisce un ciclo di centrifugazione a 9000 RCF per 20 min; il surnatante viene separato e il pellet viene risospeso in acqua per poi subire un nuovo ciclo di centrifugazione nelle medesime condizioni.

#### 2. Lisi enzimatica con Tripsina, SDS e EDTA

Il pellet è risospeso in un buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5% w/v) pH 8,5 fino a concentrazione 5% w/v. Viene aggiunta Tripsina in concentrazione 0,3 AU/ $\text{g}_{\text{CDW}}$ , SDS in concentrazione 0,3 g/g e EDTA in concentrazione 0,01 g/g. La lisi è condotta a 55 °C a 150 rpm per 1 ora.

#### 3. Centrifugazione e lavaggi

Il fermentato contenente le cellule batteriche lisate subisce un ciclo di centrifugazione a 20000 RCF per 30 min; il surnatante viene separato e il pellet viene risospeso in

acqua, per poi subire tre cicli di centrifugazione e risospensione nelle medesime condizioni.

### **3.15. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI PHBv CON ENZIMA IDROLITICO E TENSIOATTIVO**

Il processo è stato messo a punto per l'estrazione di PHBv prodotto da *Cupriavidus necator*, partendo da un fermentato cellulare fresco, senza aver subito un processo di pastorizzazione o lavaggi iniziali; le procedure sono state elaborate basandosi su quanto riportato in letteratura. Sono riportati di seguito i passaggi del processo di estrazione.<sup>46</sup>

#### **1. Pretrattamento meccanico in omogeneizzatore**

Il fermentato contenente le cellule batteriche e il biopolimero, non ancora estratto, viene diluito a una concentrazione 50-250 g/kg e sottoposto a un pretrattamento meccanico in omogeneizzatore a pH fortemente basico (pH > 10) a una temperatura tra 15-45 °C a pressione 500-700 bar.

#### **2. Centrifugazione**

Il fermentato subisce un processo di lavaggio per centrifugazione a 9000-12000 RCF per 15-45 min a temperatura ambiente; dopo la prima centrifugazione, il surnatante viene eliminato, il pellet viene risospeso in acqua riportandolo al volume iniziale, per centrifugarlo nelle stesse condizioni. La procedura di lavaggio con acqua viene ripetuta due volte.

#### **3. Lisi enzimatica**

La lisi enzimatica fa uso di un enzima idrolitico e di un tensioattivo. Al fermentato a concentrazione 50-250 g/kg viene aggiunto l'enzima in concentrazione 0,02-0,20% w/w e il tensioattivo in concentrazione 2-10% w/w; le percentuali sono indicate rispetto alla massa del biopolimero presente nel fermentato. La lisi viene condotta a 25-60 °C per 30-120 minuti, sotto agitazione.

#### **4. Centrifugazione**

Il fermentato subisce un processo di lavaggio per centrifugazione a 9000-12000 RCF per 15-45 min a temperatura ambiente; dopo la prima centrifugazione il surnatante

viene eliminato, il pellet viene risospeso in acqua riportandolo al volume iniziale per centrifugarlo nelle stesse condizioni. La procedura di lavaggio con acqua viene ripetuta due volte. Seguono due lavaggi con solvente organico nelle stesse condizioni.

## **5. Recupero del biopolimero**

Il biopolimero viene recuperato essiccando il pellet dell'ultimo lavaggio in solvente organico a pressione ridotta.

### **3.16. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI *mcl*-PHA CON SOLVENTI**

Il protocollo è stato sviluppato per l'estrazione di *mcl*-PHA con l'uso di solventi; nell'articolo da cui è tratto il protocollo viene testata l'efficienza di diversi solventi: cloroformio, acetone, ciclopentanone. Il processo è stato messo a punto per l'estrazione di *mcl*-PHA prodotto da *Pseudomonas putida*, partendo da un fermentato cellulare fresco. Sono riportati di seguito i passaggi del processo di estrazione, nella sua versione non modificata descritta nel brevetto.<sup>48</sup>

#### **1. Centrifugazione e trattamento termico**

Il fermentato contenente le cellule batteriche e il biopolimero, non ancora estratto, subisce un passaggio di centrifugazione a 13500 RCF per 10 min. Il pellet è poi trattato a 80 °C per 15 min.

#### **2. Lavaggi in Etanolo**

Al pellet viene aggiunto Etanolo 96% v/v in rapporto 1:3 (biomassa:EtOH). La soluzione viene incubata a temperatura ambiente per 30 min, sotto agitazione. Terminata la reazione, la soluzione viene filtrata s.v. con imbuto Buchner e filtro Whatman 595, l'Etanolo viene eliminato e il filtrato è risospeso in Etanolo fresco; la procedura è ripetuta complessivamente per tre volte.

#### **3. Estrazione con solvente**

Alla biomassa lavata con Etanolo viene aggiunto il solvente in rapporto 1:10 (biomassa:solvente) e la soluzione risultante viene incubata a 60 °C per 16 ore a 600 rpm. Successivamente la frazione di solvente viene recuperata per decantazione dopo un passaggio di centrifugazione ed essiccata sotto flusso di azoto. La biomassa residua

subisce un nuovo passaggio di estrazione nelle medesime condizioni. Il processo viene ripetuto complessivamente per tre volte.

### **3.17. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI *mcl*-PHA CON ENZIMI**

Il protocollo è stato sviluppato per l'estrazione di *mcl*-PHA con l'uso degli enzimi Tripsina e Lisozima, coadiuvati dall'azione dell'EDTA e dell'SDS. Il processo è stato messo a punto per l'estrazione di *mcl*-PHA prodotto da *P. putida*, partendo da un fermentato cellulare fresco. Sono riportati di seguito i passaggi del processo di estrazione, nella sua versione non modificata descritta nell'articolo.<sup>49</sup>

#### **1. Trattamento termico**

Il fermentato contenente le cellule batteriche e il biopolimero, non ancora estratto, subisce un trattamento termico in autoclave a 121 °C per 1 min.

#### **2. Lisi enzimatica con Tripsina e SDS**

Il fermentato trattato al calore è corretto a pH 8,5; viene aggiunto l'enzima Tripsina in concentrazione 0,3 AU/g<sub>CDW</sub> e l'SDS 0,08 g/g<sub>CDW</sub>. La lisi è condotta a 55 °C per 20 min.

#### **3. Lisi enzimatica con Lisozima e EDTA**

Il fermentato è raffreddato alla temperatura di 30 °C e corretto a pH 7; viene aggiunto l'enzima Lisozima in concentrazione 0,005 g/g<sub>CDW</sub> e l'SDS 0,4 g/g<sub>CDW</sub>. La lisi è condotta a 30 °C per 15 min.

#### **4. Centrifugazione e liofilizzazione**

Il fermentato viene centrifugato per rimuovere i detriti cellulari presenti nel surnatante, mentre il pellet costituito da *mcl*-PHA viene liofilizzato.

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### 4.1. PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE ENZIMATICA DALLA LETTERATURA

Il presente lavoro di Tesi è iniziato con una ricerca bibliografica volta ad esaminare lo stato dell'arte riguardante l'impiego degli enzimi nei processi *downstream* di estrazione di biopolimeri. La ricerca bibliografica si è basata sull'individuare articoli scientifici e brevetti registrati relativi all'estrazione di PHBV, sfruttando l'azione di enzimi, dal microrganismo produttore *C. necator*. La ricerca è stata rivolta non solo a estrazioni esclusivamente enzimatiche, ma anche a procedure comprendenti lisi dove l'enzima opera in sinergia con surfattanti o con pretrattamenti termici o meccanici del materiale di partenza.

La ricerca in questo campo si concentra generalmente sullo sviluppo di protocolli di estrazione che sfruttano enzimi proteolitici e degradativi della componente proteica delle membrane cellulari dei microrganismi, coadiuvati dall'azione di surfattanti; varia sensibilmente nei diversi protocolli la fase di pretrattamento del materiale di partenza che subisce trattamenti termici e meccanici di diversa tipologia e intensità.

La **Tabella 6** riporta la migliore letteratura identificata in termini di resa di estrazione e purezza del campione, e anche di applicabilità in termini di procedure operative e strumenti utilizzati, secondo le disponibilità del laboratorio del centro di ricerca; dal momento che l'obiettivo ultimo consiste nell'applicazione della metodologia a livello pilota e industriale, si è tenuto conto anche della scalabilità delle procedure descritte nei lavori pubblicati, su volumi e strumentazioni di dimensione maggiore. Nel capitolo "Materiali e metodi" di questa Tesi sono riportati per esteso i protocolli di estrazione (cfr. paragrafi 3.13, 3.14 e 3.15). Per ogni prova effettuata, è stato utilizzato come materiale di partenza il brodo di fermentazione di *C. necator*, dopo un primo ciclo di lavaggio per centrifugazione e un processo di pastorizzazione a 90 °C per 15 min a pH 5.

<b>PROTOCOLLO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>ENZIMA</b>	Celumax® BC 0,02% w/w	Bromelina 2% w/w	Tripsina 0,3 AU/w	Enzima idrolitico 0,02-0,20% w/w
<b>EC NUMBER</b>	Formulato di vari enzimi	3.4.22.32	3.4.21.4	/
<b>COADIUVANTI</b>	Cloroformio 25% (v/v) Buffer acetato pH 4	Buffer citrato 100 mM pH 4,75	Buffer Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8.3 EDTA 0,3 w/w SDS 0,01 w/w	Tensioattivo 2-10% w/w
<b>CONDIZIONE DI REAZIONE</b>	60 °C per 1 h	50 °C per 7.5 h a 200 rpm	55 °C per 1.5 h a 150 rpm	25-60 °C per 30-120 min
<b>PRETRATTAMENTO</b>	120 °C per 15 min	Termico: 95 °C per 45 min e 85 °C per 15 min Meccanico: omogeneizzazione	/	Omogeneizzazione a pH >10 a pressione 500-700 bar
<b>RESA</b>	87%	90%	/	/
<b>PUREZZA</b>	94%	89%	97%	> 99%
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	Neves et al.; 2012; "Use of enzymes in extraction of PHAs produced by <i>C. necator</i> ". <sup>50</sup>	Kapritchkoff et al.; 2006; "Enzymatic recovery and purification of PHB produced by <i>R. eutropha</i> ". <sup>30</sup>	Martino et al.; 2014; "Recovery of amorphous PHB granules from <i>C. necator</i> cells grown on used cooking oil". <sup>45</sup>	Pérez-Rivero et al.; 2019; "A sustainable approach for the downstream processing of bacterial PHAs: State-of-the-art and latest developments." <sup>46</sup>

**Tabella 6.** Riassunto dei protocolli identificati in letteratura.

- **Svolgimento delle prove in laboratorio e raccolta dati**

- Il protocollo 1 con il formulato di enzimi Celumax<sup>®</sup> BC è stato selezionato per gli alti valori di resa e purezza e per la sua applicabilità in laboratorio, avendo passaggi operativi non dissimili dalla procedura brevettata Versalis, già in uso per l'estrazione di PHBv (riportata nel paragrafo 1.6.5). Per verificarne la riproducibilità in laboratorio sono state tuttavia applicate importanti modifiche: Celumax<sup>®</sup> BC è stato sostituito con l'enzima EC 200 di produzione propria interna a Versalis S.p.A., avendo uno spettro e delle caratteristiche d'azione simili; inoltre, sono state eseguite due prove in parallelo, mantenendo il trattamento termico iniziale come descritto nel lavoro, ma con due concentrazioni di enzima: 1X e 10X al fine di assicurarsi, con la prova 10X, di operare in condizioni di eccesso ed eliminare la possibilità che la concentrazione di enzima fosse la variabile critica in caso di insuccesso della prova 1X. Avendo modificato l'enzima in uso, sono cambiate anche le condizioni di reazione: una temperatura minore (53 °C invece di 60 °C) a pH 4,5 in assenza del buffer acetato pH 4. La separazione non è avvenuta per l'azione del cloroformio, bensì per centrifugazione a 11000 RCF per 20 min.

La prova non ha portato alla lisi delle cellule batteriche e all'estrazione del biopolimero, che pertanto non è stato caratterizzato.

- Il protocollo 2 con l'enzima Bromelina è stato selezionato per gli alti valori di resa e purezza, per la sua applicabilità in laboratorio, avendo passaggi operativi non dissimili dalla procedura brevettata Versalis già in uso per l'estrazione di PHBv ed infine per l'assenza di coadiuvanti nella fase di lisi. Nel replicare la prova in laboratorio sono state eseguite due prove in parallelo a concentrazione 1X e 10X di enzima al fine di assicurarsi, con la prova 10X, di operare in condizioni di eccesso ed eliminare la possibilità che la concentrazione di enzima fosse la variabile critica in caso di insuccesso della prova 1X. Sono state apportate ulteriori modifiche al protocollo: dal momento che il materiale di partenza ha subito già un processo di pastorizzazione a 90°C per 15 min a pH 5, la fase di trattamento termico è stata eliminata, così come la fase di trattamento meccanico in omogeneizzatore (per mancanza di informazioni sulle condizioni operative condivise nel lavoro originario).

Sono riportati nella **Tabella 7** i risultati della prova:

PROVA	RESA	PUREZZA
<b>A (1X enzima)</b>	59%	/
<b>B (10X enzima)</b>	63%	/

**Tabella 7.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.



**Figura 16.** Materiale di PHBv, dopo l'essiccamento in stufa. (SX prova A; DX prova B)

Il materiale finale di PHBv estratto si presenta per entrambe le prove, dopo l'essiccamento in stufa, di consistenza compatta e rugosa, di colore marrone scuro (**Figura 16**). Dalla sola analisi visiva del colore e della consistenza, il campione è stato reputato di bassa qualità e non state eseguite le analisi per valutarne la qualità e la purezza.

- Il protocollo 3 con l'enzima Tripsina è stato selezionato perché non presenta step di pretrattamento del materiale di partenza e perché sfrutta, durante la lisi, non solo l'enzima ma anche l'SDS, in un ambiente di reazione con EDTA e buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . È stato interessante valutare l'azione dell'EDTA e del buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , nella creazione di un ambiente di reazione più idoneo all'attività enzimatica.

Sono state eseguite in laboratorio due prove in parallelo a concentrazione 1X e 3X di enzima Tripsina, al fine di assicurarsi con la prova 3X di operare in condizioni di eccesso ed eliminare la possibilità che la concentrazione di enzima fosse la variabile critica in caso di insuccesso della prova 1X. Il volume operativo per ciascuna prova è stato di 250 mL in concentrazione tale da avere in lisi 12,5 g di componente solida.

Sono riportati nella **Tabella 8** i risultati della prova:

PROVA	RESA	PUREZZA
A (1X enzima)	71%	95%
B (3X enzima)	66%	96%

**Tabella 8.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.

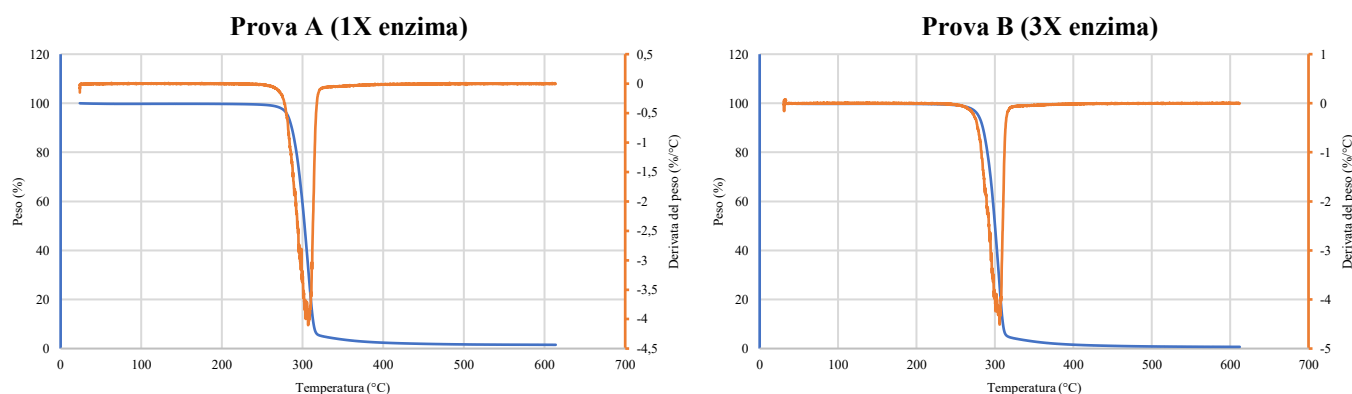


**Figura 17.** Materiale PHBv estratto dopo l'essiccamento in stufa. (SX prova A; DX prova B)

Il materiale finale di PHBv estratto si presenta per entrambe le prove, dopo l'essiccamento in stufa, di consistenza compatta e liscia, di colore marrone chiaro (**Figura 17**). Il biopolimero è stato caratterizzato per valutarne la qualità e la purezza con analisi TGA, DSC, MC e TN su solido. Il parametro di TN (TN – *Total Nitrogen*) permette di quantificare la percentuale di azoto presente nel campione. Di seguito nella **Tabella 9** sono riportati i dati ottenuti, mentre nel **Grafico 1** sono riportate le curve TGA da cui sono ricavati i valori TGA riportati:

PROVA	TGA			DSC	MC (%)	TN (%)	PUREZZA
	Gomito (°C)	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Cristallinità (%) *			
A (1X enzima)	324	5	1,5	45	1,2	0,8	95%
B (3X enzima)	325	4	0,7	22	1,4	0,9	96%

**Tabella 9.** Caratterizzazione del biopolimero estratto. \*per il calcolo del valore Cristallinità (%) cfr. paragrafo 3.8 di questa Tesi.



**Grafico 1.** Termogramma TGA ricavato dalle analisi sul campione finale per la valutazione della purezza, da cui poi sono stati ricavati i valori di Residuo a 600°C (%) e Residuo al Gomito (%) e la temperatura al Gomito (°C).

- Il protocollo 4 con l'enzima idrolitico è stato selezionato i) per avere blande condizioni di reazione di lisi; ii) per avere passaggi della metodologia sovrapponibili alla procedura brevettata Versalis già in uso; iii) per l'impiego di un enzima a basso costo, facilmente reperibile e già utilizzato a livello industriale, che è usato in sinergia con un tensioattivo a basse concentrazioni.

Le differenze rispetto al protocollo descritto nel lavoro riguardano i passaggi di separazione e concentrazione per centrifugazione del materiale prima e dopo la reazione di lisi enzimatica, dove sono state applicate le condizioni di 9000-12000 RCF per 15-45 min. Sono state eseguite tre prove in parallelo a concentrazione 1X di enzima, 3X di enzima e un controllo negativo, in modo da operare in condizioni di eccesso, eliminando la possibilità che la concentrazione di enzima fosse la variabile critica in caso di insuccesso della prova 1X; e valutare l'impatto dell'azione dell'enzima a due diverse concentrazioni sull'intera procedura, confrontando i dati con il controllo negativo, senza enzima.

Nella **Tabella 10** sono riportati i risultati della prova:

PROVA	RESA	PUREZZA
<b>A (1X enzima)</b>	80-85%	> 98%
<b>B (3X enzima)</b>	80-85%	> 98%
<b>Controllo negativo (senza enzima)</b>	80-85%	> 97%

**Tabella 10.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.

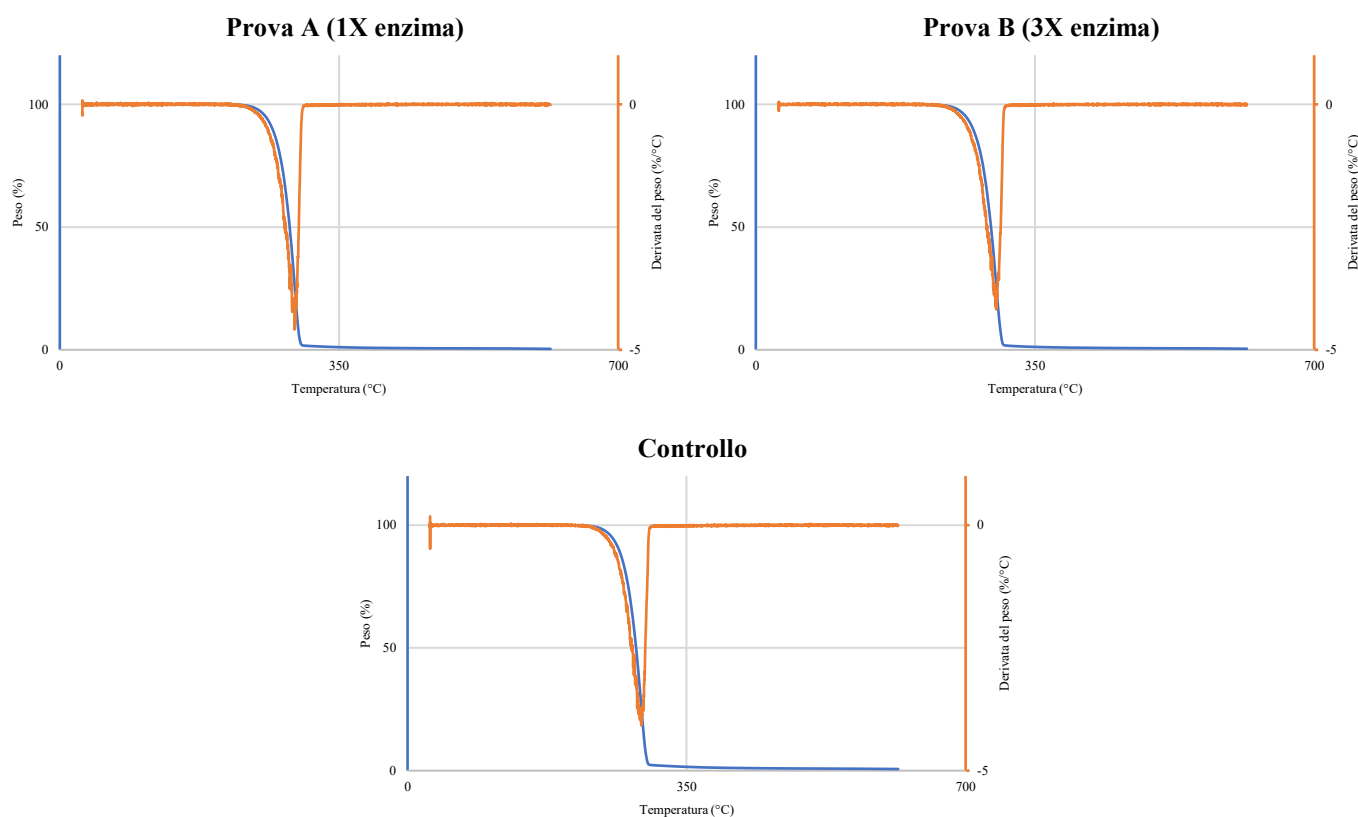


**Figura 18.** Materiale PHBv estratto dopo l'essiccamento in stufa. (da SX prova A; prova B e Controllo).

Il materiale finale di PHBv estratto si presenta per tutte e tre le prove, dopo l'essiccamento in stufa, di consistenza compatta e gessosa, di colore bianco (**Figura 18**). Il biopolimero è stato caratterizzato per valutarne la qualità e la purezza con analisi TGA, DSC, MC e TN su solido. Di seguito nella **Tabella 11** sono riportati i dati ottenuti, mentre nel **Grafico 2** le curve TGA da cui sono ricavati i valori TGA riportati:

PROVA	TGA			DSC		PUREZZA	
	Gomito (°C)	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Cristallinità (%) *	MC (%)		TN (%)
A (1X enzima)	300-315	1,5-2,0	< 0,5	21-31	1,0-1,5	< 0,3	> 98%
B (3X enzima)	300-315	1,8-2,0	0,5-0,7	19-29	< 0,8	< 0,3	> 98%
Controllo	300-315	2,3-3,0	0,7-0,9	20-30	< 0,8	< 0,3	> 97%

**Tabella 11.** Caratterizzazione del biopolimero estratto. \*per il calcolo del valore di Cristallinità (%) cfr. paragrafo 3.8 di questa Tesi.



**Grafico 2.** Termogramma TGA ricavato dalle analisi sul campione finale per la valutazione della purezza, da cui poi sono stati ricavati i valori di residuo a 600°C (%) e Gomito (%) e la temperatura al Gomito (°C).

- **Discussione dei dati**

Tutti i dati ottenuti dalle prove di estrazione sono confrontati con il riferimento Versalis, ossia il polimero di PHBv estratto e caratterizzato con il protocollo sviluppato internamente al centro di ricerca, brevettato, e utilizzato come procedura standard di estrazione, il quale permette di avere rese finali di estrazione del 85-90% e purezze del campione finale > 98% (**Tabella 13**).

Osservando i dati delle analisi sulla qualità del PHBv estratto, si nota come i protocolli di estrazione con EC 200 e Bromelina non abbiano portato al recupero del polimero che

quindi non è stato caratterizzato, mentre per i protocolli con Tripsina e Lisozima si evidenziano risultati positivi.

Il protocollo con Tripsina ha dato, per entrambe le prove, rese di estrazione discrete del 65-70% e purezza intorno al 93% per la prova A e del 95% per la prova B (**Tabella 8**); considerando i valori di Residuo a 600 °C (%), si nota tra la prova A e B come una concentrazione 3X di enzima porti ad un residuo minore e dunque ad un campione più pulito. I valori di Residuo al Gomito (%), MC e TN sono simili tra le due prove. Se si confrontano i dati con il riferimento Versalis, si rileva come tutti i valori della prova Tripsina siano superiori, tranne per il Residuo a 600 °C (%) della prova B, che è in linea con il riferimento (**Tabella 9**).

Il protocollo con enzima idrolitico ha portato, per tutte e tre le prove, buone rese di estrazione, intorno all'80-85%, in linea con la resa del riferimento Versalis, mentre i valori di purezza anche in questo caso risultano elevati, superiori al 97%, in linea con il riferimento Versalis (**Tabella 10**); valutando i dati tra le tre prove si nota come i valori di Residuo a 600 °C (%) e Residuo al Gomito (%) del controllo negativo siano più elevati rispetto alle prove A e B, confermando il ruolo positivo dell'enzima durante la lisi (**Tabella 11**); incrociando questi dati con i valori di resa si nota come le rese però siano pressoché uguali tra le tre prove, suggerendo un mancato apporto positivo dell'enzima all'estrazione; queste considerazioni rappresentano una parziale conferma della teoria di come l'enzima idrolitico non influisca tanto nell'estrarre il polimero dalle cellule (ruolo svolto dal tensioattivo), quanto nel "pulire" il polimero e ottenere un prodotto finale di maggiore purezza. Confrontando i valori di Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%) delle tre prove, con quelli del riferimento Versalis si notano, per il primo parametro, valori superiori tranne per la prova A, mentre per i valori di Residuo a 600 °C tutte e tre le prove hanno fornito valori paragonabili e in linea col riferimento (**Tabella 13**).

Si riporta anche un confronto delle specifiche di consumo (%) per i reagenti usati per svolgere le tre prove (**Tabella 12**), rispetto al riferimento Versalis: base (per la correzione del pH), tensioattivo e quantità di enzima idrolitico.

REAGENTE	Prova A (1X)	Prova B (3X)	Controllo	Riferimento Versalis
<b>Base</b>	100%	100%	100%	<b>11%</b>
<b>Tensioattivo</b>	<b>15%</b>	<b>15%</b>	<b>15%</b>	100%
<b>Enzima idrolitico</b>	<b>33%</b>	100%	/	/

**Tabella 12.** Specifiche di consumo (%) calcolate sulle quantità di reagenti usati per l'estrazione di PHBv.

Si osserva come la quantità di base necessaria nel protocollo di riferimento Versalis è circa l'11% di quella richiesta nelle prove di estrazione con il protocollo, che prevede l'uso dell'enzima idrolitico. Tale differenza è giustificata dalla presenza, in quest'ultimo protocollo, di un pretrattamento meccanico in omogeneizzatore a un pH fortemente basico, superiore a 10; si evidenzia, invece, la necessità di una quantità di tensioattivo pari al 85% in meno rispetto al protocollo di riferimento Versalis, fornendo comunque valori di resa e purezza paragonabili. Questi valori, a fronte dei valori di Resa (%) e Purezza (%), suggeriscono come l'ambiente fortemente basico in fase di pretrattamento induca fin da subito una lisi chimica delle cellule accoppiata ad una lisi meccanica aggressiva, permettendo a valle, in fase di lisi enzimatica, condizioni di reazione più blande, con minore quantità di tensioattivo richieste.

Nella **Tabella 13** sono riassunti tutti i parametri misurati e discussi precedentemente, relativamente alle quattro prove svolte; a fronte delle considerazioni fatte finora è stato valutato, come migliore, il protocollo di estrazione con enzima idrolitico e tensioattivo, rivelandosi una valida alternativa al protocollo interno Versalis.

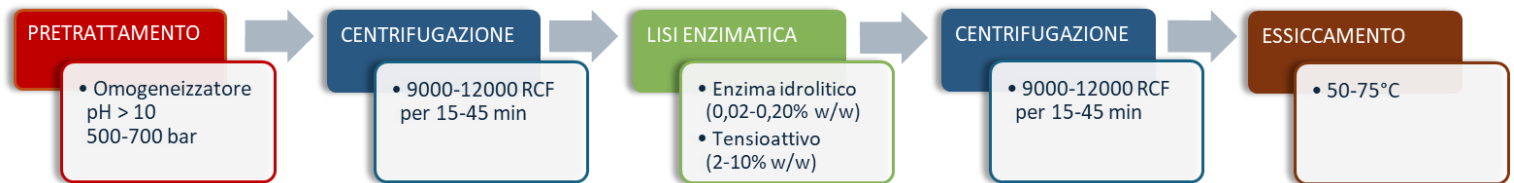
ENZIMA	PROVA	TGA		MC (%)	TN (%)	PUREZZA	RESA
		Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)				
EC 200	A (1X)	Estrazione non avvenuta. Polimero non caratterizzato.					
	B (10X)						
Bromelina	A (1X)	Estrazione di bassa qualità. Polimero non caratterizzato.					
	B (10X)						
Tripsina	A (1X)	5	1,5	1,2	0,8	93%	71%
	B (3X)	4	0,7	1,4	0,9	95%	66%
Enzima idrolitico	A (1X)	1,5-2,0	< 0,5	1,0-1,5	< 0,3	> 98%	80-85%
	B (3X)	1,8-2,0	0,5-0,7	< 0,8	< 0,3	> 98%	80-85%
	Controllo	2,3-3,0	0,7-0,9	< 0,8	< 0,3	> 97%	80-85%
<b>Riferimento Versalis</b>		<b>0,3-1,7</b>	<b>0,2-0,8</b>	/	<b>&lt; 0,3</b>	<b>&gt; 98%</b>	<b>85-90%</b>

Tabella 13. Analisi effettuate sui campioni estratti di PHBv per valutare qualità e purezza.

#### 4.2. OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO CON ENZIMA IDROLITICO E TENSIOATTIVO

Dati i risultati promettenti e le valutazioni positive ottenute nel replicare in laboratorio il protocollo di estrazione di PHBv con un enzima idrolitico e un tensioattivo, si è proceduto nell'attività di ricerca con l'ottimizzazione del protocollo, al fine di individuare una

procedura di estrazione con un ridotto impiego di reagenti e che abbia passaggi di lavorazione ottimizzati e semplici, tenendo sempre in considerazione come scopo ultimo l'applicazione a livello pilota e industriale. Per tale motivo, nell'organizzare gli obiettivi di ottimizzazione del protocollo ci si è sempre riferiti ai vantaggi acquisibili in fase di *scale-up* della procedura, alla compatibilità con le strumentazioni e alle capacità del centro di ricerca e del suo impianto di produzione. Lo schema della **Figura 19** riassume tutti i passaggi previsti dal protocollo con le relative condizioni operative.



**Figura 19.** Schema riassuntivo dei passaggi presenti nel protocollo di estrazione di PHBv con l'enzima idrolitico e il tensioattivo, nella sua versione iniziale descritta nel lavoro originale e replicata in laboratorio.

Riassumendo, dalla prova di replicabilità in laboratorio del protocollo e dai relativi dati ottenuti, è stato evidenziato che:

- l'enzima idrolitico influisce principalmente sull'ottenimento di un prodotto più pulito, piuttosto che sull'azione migliorativa sulla resa di estrazione;
- l'ambiente fortemente basico in fase di pretrattamento ed un trattamento meccanico aggressivo in omogeneizzatore, inducono fin da subito una lisi delle cellule batteriche, combinando l'azione chimica della base con la forza meccanica dell'omogeneizzazione, producendo molti detriti cellulari;
- il passaggio di centrifugazione tra il pretrattamento e la lisi enzimatica permette di eliminare una grande quantità di detriti cellulari prodotti in fase di pretrattamento, consentendo in fase di lisi di utilizzare una minore quantità di tensioattivo, per emulsionare il materiale.

Dalle considerazioni precedenti sono state reputati come punti di forza di questa procedura:

1. La quantità necessaria di tensioattivo, pari al 85% in meno rispetto al protocollo Versalis;
2. L'utilizzo di un enzima disponibile in commercio, già in uso industrialmente e a basso costo;
3. I risultati di resa e purezza, in linea con il riferimento Versalis.

- **Primo monitoraggio dell'andamento del processo di estrazione**

Per avere ulteriore conferma della veridicità di queste considerazioni, il protocollo è stato replicato nelle medesime condizioni, ma effettuando campionamenti a ogni passaggio significativo, al fine di monitorare l'andamento del processo di estrazione. Sono state prelevate aliquote del campione in fase di lavorazione, da analizzare per ottenere dati sulla purezza del materiale; sono state effettuate analisi MC e TGA sulle aliquote, MC, pH e conducibilità sui surnatanti ottenuti dai cicli di centrifugazione e concentrazione.

I risultati delle analisi sono mostrati nella **Tabella 15** e l'andamento del Residuo al Gomito (%), Residuo a 600°C (%) e Purezza (%) sono rappresentati nel **Grafico 3**; osservando come varia il valore di Residuo al Gomito (%) nell'avanzare del processo, si rileva una progressiva diminuzione del dato; per quanto riguarda il Residuo a 600 °C (%), dal passaggio 3 (1° centrifugazione) si evidenzia un andamento stabile dei valori, con delle oscillazioni minime. Per entrambi i parametri ci si aspetterebbe in linea teorica una progressiva diminuzione dei valori con un leggero aumento solamente a livello del passaggio 4 (post-lisi enzimatica), dove per l'azione del tensioattivo e dell'enzima idrolitico avviene la disgregazione delle membrane cellulari ed un conseguente aumento della presenza di detriti cellulari in soluzione; non si notano tali differenze così puntuali in questo campionamento, bensì un andamento più lineare dei valori di Residuo al Gomito (%) ed uno più stabile per i valori di Residuo a 600 °C. Spostando invece l'analisi sui parametri rilevati dai surnatanti dei cicli di centrifugazione, si osserva come al termine di entrambi i passaggi si ottenga un valore finale di pH inferiore a 8 ( $\text{pH}_{\text{iniziale}} > 10$  per il pretrattamento); stesse considerazioni per i valori di conducibilità che arrivano ad attestarsi a valori inferiori a 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

La **Tabella 14** riporta i valori dei parametri per valutare la purezza dei campioni finali ottenuti dalle varie prove di estrazione, considerati come riferimento di un biopolimero

di buona qualità e purezza; tali soglie sono parametri elaborati internamente al centro di ricerca e ottenuti dalle analisi di campioni di polimero estratti con la procedura in uso interno e brevettata da Versalis S.p.A.

pH	Conducibilità (µS/cm)	Residuo al Gomito	Residuo a 600 °C	TN	MC
< 8	< 300	< 1,5%	< 0,8 %	< 0,9 %	< 1,2 %

**Tabella 14.** Valori dei parametri per decretare di buona qualità il polimero estratto; i valori di pH e Conducibilità sono riferiti ai surnatanti dei cicli di lavaggio per centrifugazione, mentre i restanti al campione finale essiccato a fine estrazione.

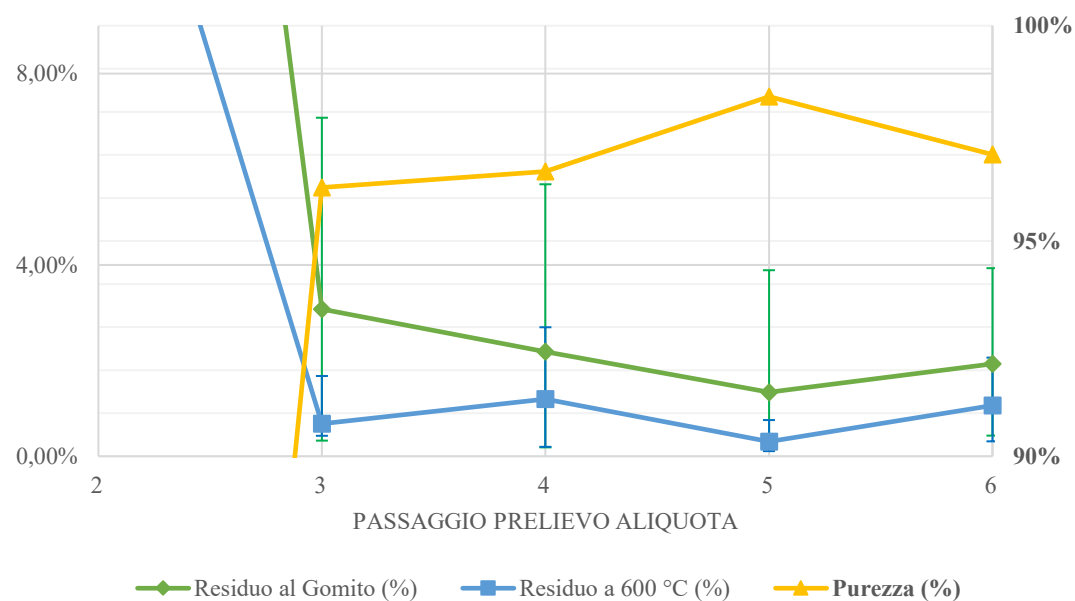
Grazie a questo campionamento si è compreso: quali siano i passaggi critici del processo; quali quelli meno influenti sulle caratteristiche finali del prodotto; l'andamento generale del processo di estrazione; permettendo di proseguire lo studio di questo protocollo di estrazione. Su tali basi sono stati stabiliti tre obiettivi del processo di ottimizzazione del protocollo:

1. Riduzione dei cicli di lavaggio e concentrazione;
2. Valutazione dell'impatto della riduzione cicli di omogeneizzazione;
3. Valutazione della diminuzione o eliminazione del tensioattivo in fase di lisi enzimatica.

La riduzione dei cicli di lavaggio e concentrazione è giustificata dalla presenza di passaggi di centrifugazione dove i valori di Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%) si attestano già inferiori ai parametri presi come riferimento, e riportati nella **Tabella 14**; l'impatto della riduzione dei cicli di lavaggio e concentrazione si dovrebbe rilevare a livello della purezza e qualità del campione finale, poiché lo scopo di questi passaggi consiste nell'eliminazione della componente di impurezze (detriti cellulari e soluti vari del materiale trattato). L'impatto della riduzione dei cicli di omogeneizzazione si dovrebbe rilevare a livello del valore di resa di estrazione del processo, siccome l'azione di tale pretrattamento ha la funzione di disgregare meccanicamente il sistema membranoso della cella batterica e di rendere maggiormente accesibili all'azione dell'enzima e del surfattante i granuli di PHBv da estrarre.

PASSAGGIO	ETICHETTA GRAFICO	ANALISI					PUREZZA	NOTE
		MC	pH	Conducibilità (µS/cm)	TGA			
					Residuo al Gomito (%)	Residuo 600 °C (%)		
Fermentato iniziale		60-75%						
Pre-omogeneizzatore	1	75-95%			40-50%	12-17%	50-60%	Dopo diluizione a 50-250 g/kg
Post-omogeneizzatore	2	>90%			40-50 %	12-17%	50-60%	
1° centrifuga	3	> 99%	< 8	< 100	2,8-4,0%	0,3-1,0%	> 96%	MC, pH e conducibilità su surnatante; TGA su pellet
Pre-lisi enzimatica		75-95%						Dopo diluizione a 50-250 g/kg
Post-lisi enzimatica	4	75-95%			2,5-4,0%	1,0-1,5%	> 96%	
2° centrifuga	5	> 99%	< 8	< 100	1,6-2,0%	0,2-0,4%	> 98%	MC, pH e conducibilità su surnatante; TGA su pellet
Post-essiccamento	6	0,5-1,0%			1,2-2,0%	0,8-1,0%	> 98%	

**Tabella 15.** Sono riportati i dati ottenuti dalle analisi sulle aliquote prelevate durante il primo campionamento del protocollo iniziale senza modifiche.



**Grafico 3.** Mostra gli andamenti del Gomito e Residuo a 600 °C (asse verticale SX) e della Purezza (asse verticale DX); i valori dei passaggi 1 e 2 non sono mostrati per ragioni di scala; per i valori di Gomito e Residuo a 600 °C sono riportati degli intervalli di variabilità calcolati in base al range di valore espresso nella **Tabella 15**; per le etichette dell'asse orizzontale riferirsi alla **Tabella 15**.

- **Secondo monitoraggio dell'andamento del processo di estrazione e primo tentativo di ottimizzazione del protocollo**

Sulla base dei risultati e delle considerazioni precedenti, sono state condotte due nuove prove di estrazione, integrando un primo tentativo di ottimizzazione con un nuovo campionamento, eseguito nelle stesse condizioni della prova precedente per confermare i dati ottenuti. Nello specifico, sono stati predisposti i seguenti due test in parallelo:

- PROVA A:** riduzione dei cicli in omogeneizzatore e relativo campionamento;
- PROVA B:** riduzione dei cicli di lavaggio e relativo campionamento.

Nella **Tabella 16** è riportato l'esito della prova a confronto con il riferimento Versalis:

PROVA	RESA	PUREZZA
<b>A (cicli ridotti in omogeneizzatore)</b>	/	> 97%
<b>B (cicli ridotti di lavaggio)</b>	/	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>85-90%</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 16.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.



**Figura 20.** Materiale PHBv estratto, come si presenta dopo l'essiccamento in stufa. (SX prova A; DX prova B).

Il biopolimero per entrambe le prove si presenta compatto e gessoso, di colore bianco (**Figura 20**). I valori di resa non sono riportati nella **Tabella 16**, poiché è stato eseguito un campionamento con prelievo di massa dal materiale iniziale e non è stato possibile quantificare la massa persa col prelievo; nonostante ciò l'obiettivo della prova è stato quello di ottenere un materiale da valutare in termini di purezza, i cui valori si attestano per entrambe le prove superiori al 97%, in linea con il riferimento Versalis.

Per la Prova A i risultati delle analisi, riportati nella **Tabella 17**, e i loro andamenti nel proseguo della reazione, mostrati nel **Grafico 4**, mostrano per il Residuo al Gomito

(%) e il Residuo a 600 °C (%) una progressiva diminuzione dei valori, con un rialzo per il Residuo a 600 °C (%) a livello del passaggio 4 (post-lisi enzimatica). Osservando il dato di Purezza (%), si rileva un aumento della purezza del campione per tutto l'avanzare del processo, con conferma anche del picco di diminuzione del valore a livello del passaggio 4 (post-lisi enzimatica).

Per quanto riguarda l'analisi dei surnatanti dei cicli di centrifugazione, si osserva un valore di pH basico per la 1° centrifugazione valore che vira poi verso la neutralità al termine della 2° centrifugazione; invece, guardando il dato di Conducibilità si rileva come, già al termine della 1° centrifugazione, si abbia un valore inferiore a quelli stabiliti come soglia di riferimento (**Tabella 14**). La qualità del campione finale dopo l'essiccamento è paragonabile ai riferimenti, avendo un valore di Residuo a 600 °C (%) inferiore al riferimento Versalis, sebbene il Residuo al Gomito (%) sia superiore; tuttavia, la Purezza (%) è in linea con il riferimento Versalis.

Per la Prova B, i risultati delle analisi, riportati nella **Tabella 18**, e i loro andamenti nel proseguo della reazione, mostrati nel **Grafico 5**, evidenziano per il Residuo al Gomito (%) e il Residuo a 600 °C (%), una progressiva diminuzione dei valori, con un rialzo per il Residuo a 600 °C (%) a livello del passaggio 4 (post-lisi enzimatica). Osservando il dato di Purezza (%), si rileva un aumento di quest'ultima per tutto l'avanzare del processo, con conferma anche del picco di diminuzione del valore a livello del passaggio 4 (post-lisi enzimatica).

Per quanto riguarda l'analisi dei surnatanti dei cicli di centrifugazione, si osserva un valore di pH basico per la 1° centrifugazione che vira poi verso un valore inferiore a 8 al termine della 2° centrifugazione; riguardo il dato di Conducibilità, i valori si attestano notevolmente sopra la soglia di 300 µS/cm, come riportato nella **Tabella 14**. La qualità del campione finale dopo l'essiccamento è paragonabile ai riferimenti, avendo un valore di Residuo al Gomito (%) poco superiore a quello del protocollo Versalis, ed un valore di Residuo a 600 °C (%) invece confrontabile; la Purezza (%) è in linea con il riferimento Versalis.

A fronte di questi risultati si può affermare come una riduzione dei cicli di lavaggio non influisca sulla qualità del prodotto finale, mentre, per la valutazione dell'impatto della riduzione dei cicli di trattamento di omogeneizzazione, si rende necessaria un'ulteriore prova specifica di verifica.

PASSAGGIO	ETICHETTA GRAFICO	ANALISI					PUREZZA	NOTE
		MC	pH	Conducibilità (μS/cm)	TGA			
					Residuo al Gomito (%)	Residuo 600 °C (%)		
Fermentato iniziale		60-75%						
Pre-omogeneizzatore	1	75-95%						Dopo diluizione a 50-250 g/kg
Post-omogeneizzatore	2	> 91%				50-60%	20-25%	40-50%
1° centrifuga	3	> 99%	10-13	< 200	3,5-4,0%	0,3-0,7%	> 96%	MC, pH e conducibilità su surnatante; TGA su pellet
Pre-lisi enzimatica		> 90 %						Dopo diluizione a 50-250 g/kg
Post-lisi enzimatica	4				3,5-5,0%	1-2%	> 95%	
2° centrifuga	5	> 99%	< 7	< 50	2,4-3,0%	0,5-1,0%	> 97%	MC, pH e conducibilità su surnatante; TGA su pellet
Post-essiccamento	6	0,5-1,0%			2,4-2,0%	0,3-0,5%	> 98%	

Tabella 17. Sono riportati i dati ottenuti dalle analisi sulle aliquote prelevate durante il secondo campionamento della Prova A.

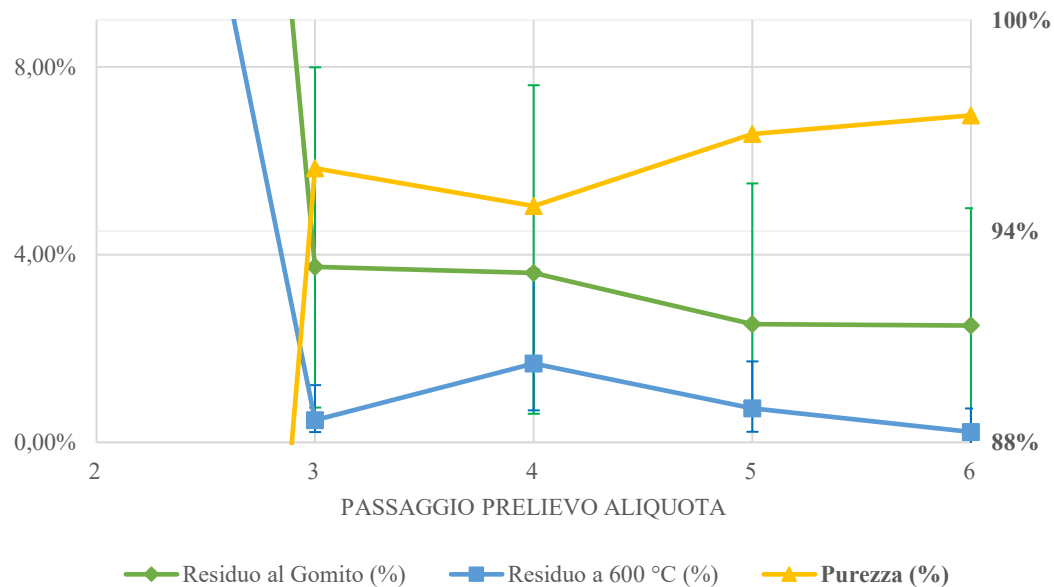


Grafico 4. Mostra gli andamenti del Gomito e Residuo a 600 °C (asse verticale SX) e della Purezza (asse verticale DX); i valori dei passaggi 1 e 2 non sono mostrati per ragioni di scala; per i valori di Gomito e Residuo a 600 °C sono riportate delle intervalli di variabilità calcolate in base al range di valore espressi nella Tabella 17; per le etichette dell'asse orizzontale riferirsi alla Tabella 17.

PASSAGGIO	ETICHETTA GRAFICO	ANALISI					PUREZZA	NOTE
		MC	pH	Conducibilità (µS/cm)	TGA			
					Residuo al Gomito (%)	Residuo 600 °C (%)		
Fermentato iniziale		60-75%						
Pre-omogeneizzatore	1	75-95%						Dopo diluizione a 50-250 g/kg
Post-omogeneizzatore	2	> 93%			50-55%	20-25%	45-50%	
1° centrifuga	3	> 99%	11-13	> 1000	3,6-4,0%	0,7-1,2%	> 96%	MC, pH e conducibilità su surnatante; TGA su pellet
Pre-lisi enzimatica		85-90%						Dopo diluizione a 50-250 g/kg
Post-lisi enzimatica	4				3,6-5,0%	1,2-1,8%	> 95%	
2° centrifuga	5	> 99%	< 8	< 900				MC, pH e conducibilità su surnatante; TGA su pellet
Post-essiccamento	6	0,5-1,0%			1,4-2,0%	0,2-0,4%	> 98%	

Tabella 18. Sono riportati i dati ottenuti dalle analisi sulle aliquote prelevate durante il secondo campionamento della Prova B.

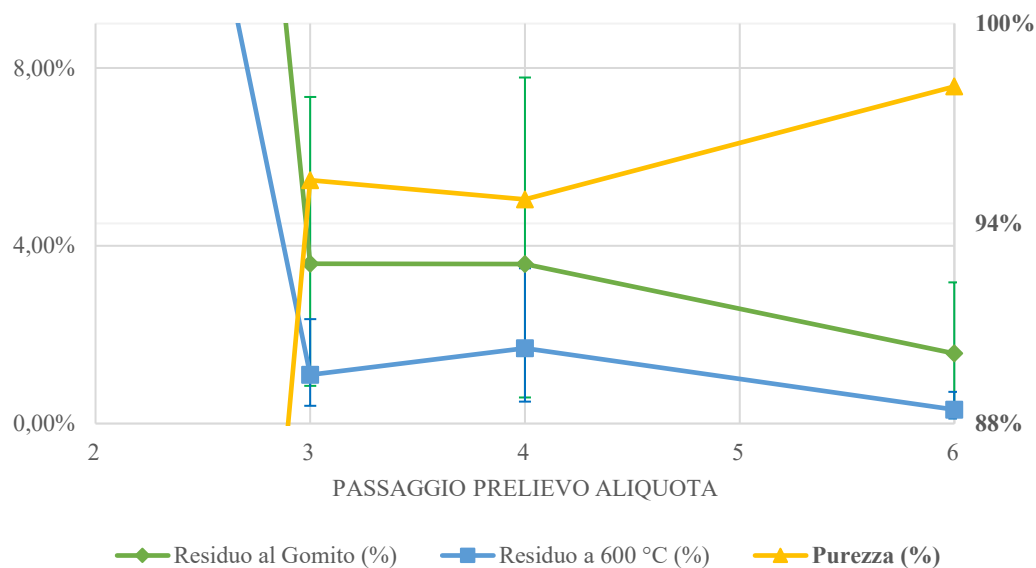


Grafico 5. Mostra gli andamenti del Gomito e Residuo a 600 °C (asse verticale SX) e della Purezza (asse verticale DX); i valori dei passaggi 1 e 2 non sono mostrati per ragioni di scala; per i valori di Gomito e Residuo a 600 °C sono riportate delle intervalli di variabilità calcolate in base al range di valore espressi nella Tabella 18; per le etichette dell'asse orizzontale riferirsi alla Tabella 18.

- **Valutazione del primo tentativo di ottimizzazione del protocollo**

Data la necessità di ottenere un dato di resa, con l’allestimento di una prova specifica per la valutazione dell’impatto della riduzione del numero di cicli di omogeneizzazione, è stato ripetuto il protocollo di estrazione allestendo due nuove prove in parallelo: nella prima applicando il protocollo standard, senza modifiche, nella seconda contemplando la riduzione dei cicli di trattamento; il tutto senza effettuare ulteriori prelievi di materiale, al fine di ottenere un dato finale di resa di estrazione il più possibile attendibile. Sono riportati di seguito, nella **Tabella 19**, i risultati della prova a confronto con la prima prova di ottimizzazione con campionamento ed il riferimento Versalis:

<b>PROVA</b>	<b>RESA</b>	<b>PUREZZA</b>
<b>Protocollo standard</b>	93-98%	> 98%
<b>Protocollo cicli ridotti omo.</b>	80-85%	> 98%
<b>Protocollo cicli ridotti omo. (campionamento)</b>	/	> 97%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>85-90%</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 19.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione. *Abbreviazioni:* omo. omogeneizzazione.

Dai dati ottenuti si nota come la prova dove è stato applicato il protocollo standard senza modifiche, abbia portato ad una resa di estrazione superiore a tutte le prove svolte finora, mentre il valore di resa della prova con i cicli ridotti di omogeneizzazione risulta in linea con quanto ottenuto dalla prima prova effettuata applicando questo protocollo (cfr. **Tabella 13**). Tuttavia rimane essere un valore inferiore al riferimento Versalis.

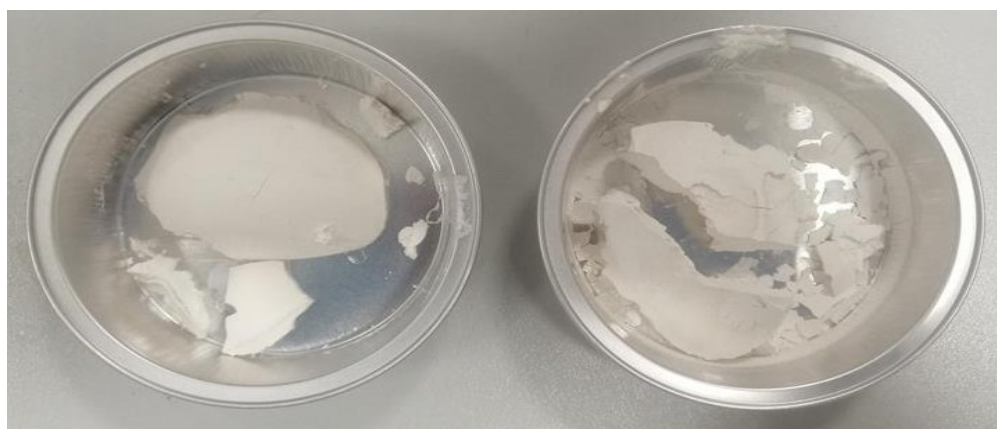
Queste prove hanno avuto comunque esito positivo nel confermare il dato di resa per il protocollo con cicli ridotti di omogeneizzazione, il cui valore non peggiora, nonostante un trattamento meccanico più blando. I valori di Purezza (%) sono in linea con il riferimento Versalis, così come i valori dei parametri rilevati dalle analisi sul prodotto essiccato.

Avendo finora verificato l’efficacia della riduzione dei cicli in omogeneizzatore e dei cicli di lavaggio in prove indipendenti, il passo successivo nel processo di ottimizzazione è stato quello di testare in un’unica prova entrambe le modifiche. Sono state dunque allestite due prove di estrazione in parallelo, applicando a entrambe tutte e due le modifiche del protocollo, e effettuando in una delle due prove un campionamento, al fine di monitorare l’andamento della purezza del campione nel

proseguo del processo. I risultati della prova sono riportati nella **Tabella 20**, con il confronto con i protocolli testati con le modifiche effettuate singolarmente ed il riferimento Versalis:

PROVA	RESA	PUREZZA
<b>Protocollo cicli ridotti in omo. e lav.</b>	80-85%	> 98%
<b>Protocollo con campionamento</b>	/	> 97%
<b>Protocollo cicli ridotti omo.</b>	80-85%	> 98%
<b>Protocollo cicli ridotti di lav.</b>	/	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>85-90%</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 20.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione. *Abbreviazioni:* omo. omogeneizzazione; lav. lavaggi di centrifugazione.



**Figura 21.** Materiale PHBv estratto, come si presenta dopo l'essiccamento in stufa. (SX prova con cicli ridotti di omogeneizzazione e lavaggio; DX prova con cicli ridotti di omogeneizzazione e lavaggio con campionamento).

Il biopolimero si presenta visivamente uguale al materiale ottenuto con le prove precedenti (**Figura 21**). Valutando i valori ottenuti di resa della prova ottimizzata con quelli della prova precedente di estrazione, dove è stata testata solo la riduzione dei cicli di omogeneizzazione, non si notano differenze; tuttavia, tali rese si attestano comunque a un valore inferiore al riferimento Versalis. Dalle analisi effettuate per verificare la purezza del materiale (**Tabella 21**) non risultano particolari differenze per i valori di Residuo a 600 °C (%) rispetto al riferimento Versalis, mentre il valore di Residuo al Gomito (%) risulta essere invece superiore; tuttavia dal calcolo della Purezza si nota come il valore sia in linea con il riferimento Versalis.

PROVA	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Purezza (%)
<b>Protocollo cicli ridotti in omo. e lav.</b>	1,7-2,0	0,3-0,5	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>0,3-1,7</b>	<b>0,2-0,8</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 21.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sui campioni per valutarne la purezza. *Abbreviazioni:* omo. omogeneizzazione; lav. lavaggi di centrifugazione.

- **Ottimizzazione del protocollo con riduzione della concentrazione di tensioattivo**  
Fino a questo punto della ricerca sono stati indagati i primi due dei tre obiettivi di miglioramento del protocollo prefissati all'inizio dell'intero processo; dati i buoni risultati ottenuti dalle prove precedenti, la ricerca è proseguita analizzando l'impatto della riduzione della concentrazione di tensioattivo usata durante la fase di lisi enzimatica.

Al fine di verificare con sicurezza eventuali effetti della riduzione della concentrazione di tensioattivo, si è ripetuta una prova di estrazione con il protocollo standard senza alcuna ottimizzazione, se non riducendo la concentrazione di tensioattivo. I risultati della prova sono riportati di seguito nella **Tabella 22**, a confronto con il protocollo standard e il riferimento Versalis:

<b>PROVA</b>	<b>RESA</b>	<b>PUREZZA</b>
<b>Protocollo con [tensioattivo] ridotto</b>	90-95%	> 98%
<b>Protocollo standard</b>	80-85%	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>85-90%</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 22.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.

Osservando i valori di resa tra la prova con il protocollo standard e quella con la sola riduzione del tensioattivo, si nota un aumento per il protocollo con concentrazione minore di tensioattivo. Un aumento interessante da valutare, se si considera che l'azione principale del surfattante sia quella di disgregare le membrane delle cellule batteriche e dunque, a priori, una maggiore quantità di tensioattivo dovrebbe portare a una maggiore lisi cellulare e rilascio dei granuli di PHBv (e di conseguenza un aumento di resa); anche confrontando il valore di resa del protocollo con tensioattivo in concentrazione ridotta, con il riferimento Versalis si evidenzia tale aumento; questi valori potrebbero essere dovuti alla variabilità sperimentale, ma rimane da evidenziare come la resa non sia diminuita con la riduzione della concentrazione, dando esito positivo alla prova.

Si riportano nella **Tabella 23** i valori di Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%) ottenuti con analisi TGA per quantificare la purezza del polimero estratto; si nota come l'unica differenza significativa sia presente nel valore di Residuo a 600 °C (%) di entrambe le prove rispetto al riferimento Versalis, ma nonostante ciò il valore finale di Purezza (%) per le due prove si mantiene in linea con il riferimento Versalis.

PROVA	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Purezza (%)
<b>Protocollo con [tensioattivo] ridotto</b>	1,6-2,0	0,4-0,5	> 98%
<b>Protocollo standard</b>	1,4-2,0	0,4-0,5	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>0,3-1,7</b>	<b>0,2-0,8</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 23.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sui campioni per valutarne la purezza.

Dunque, da questa prova di estrazione si possono trarre due conclusioni: la riduzione di tensioattivo durante la lisi enzimatica non inficia la resa di estrazione finale, e non ha impatti negativi significativi sulla purezza del campione finale estratto.

Dati questi presupposti, è stato possibile proseguire il processo di miglioramento del protocollo allestendo una prova di estrazione applicando tutte le ottimizzazioni testate finora: riduzione dei cicli di passaggio di omogeneizzazione; riduzione dei cicli di lavaggio e concentrazione totali per centrifugazione; e riduzione della concentrazione di tensioattivo. I risultati della prova sono riportati di seguito nella **Tabella 24** a confronto con il riferimento Versalis:

PROVA	RESA	PUREZZA
<b>Protocollo ottimizzato</b>	90-95%	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>85-90%</b>	<b>&gt; 98%</b>

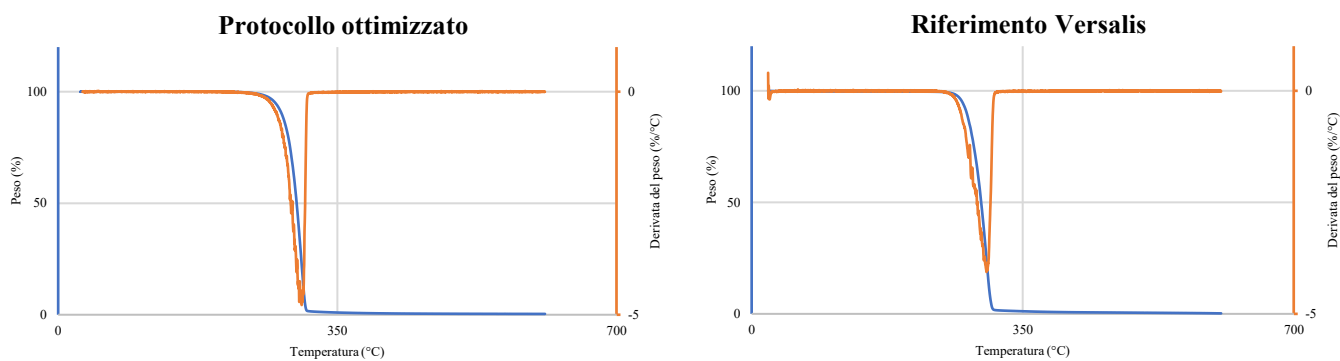
**Tabella 24.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.

Osservando i valori di resa ottenuti si può constatare come la resa per il protocollo ottimizzato sia significativamente superiore rispetto a quella del riferimento Versalis, dimostrando come tutte le ottimizzazioni applicate non inficino globalmente sulla resa di estrazione finale.

Si riportano di seguito brevemente, nella **Tabella 25**, i valori di Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%) ottenuti con analisi TGA per quantificare la purezza del polimero estratto, e nel **Grafico 6** le curve TGA da cui sono ricavati i valori TGA riportati; non si notano differenze significative per entrambi i valori, infatti la purezza del campione estratto col protocollo ottimizzato è analoga a quella del riferimento Versalis.

PROVA	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Purezza (%)
<b>Protocollo ottimizzato</b>	1,4-2,0	0,3-0,4	> 98%
<b>Riferimento Versalis</b>	<b>0,3-1,7</b>	<b>0,2-0,8</b>	<b>&gt; 98%</b>

**Tabella 25.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sui campioni per valutarne la purezza.



**Grafico 6.** Termogramma TGA ricavato dalle analisi sul campione finale per la valutazione della purezza, da cui poi sono stati ricavati i valori di residuo a 600°C (%) e Gomito (%) e la temperatura al Gomito (°C).

Concludendo, si può affermare come:

- l’ottimizzazione del protocollo di estrazione perseguendo i tre obiettivi prefissati all’inizio porti ad avere un prodotto finale con un grado di purezza paragonabile a quello ottenibile applicando il protocollo di riferimento Versalis;
- come tale processo dia una resa finale di estrazione paragonabile, se non superiore, al protocollo di riferimento Versalis decretando il successo della ricerca.

### 4.3. ESTRAZIONE DI *mcl*-PHA DA *P. putida*

#### 4.3.1. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE ENZIMATICA

Parallelamente alla ricerca svolta sul polimero di PHBv si è sviluppata una nuova linea di interesse riguardo i polimeri di *mcl*-PHA prodotti da *P. putida*. Nel paragrafo 4.1 di questa Tesi si è trattato della ricerca preliminare in letteratura dello stato dell’arte in fatto di estrazione per via enzimatica di polimero di PHA, e di come essa non si fosse concentrata solamente sul polimero di PHBv, bensì anche sulla varia classe di polimeri *mcl*-PHA; per tali polimeri è stato individuato un protocollo sviluppato e testato specificatamente per estrarre tale categoria polimerica da *P. putida*.

Del protocollo, descritto al paragrafo 3.17, ne è stata verificata la replicabilità in laboratorio, conservando il passaggio finale di liofilizzazione.

Durante la lavorazione iniziale del brodo di fermentazione di *P. putida*, da sottoporre poi al processo di estrazione, si sono verificate difficoltà a livello della centrifugazione e

lavaggio iniziali del fermentato, dove a termine del processo di separazione non si identificavano solo la fase di pellet (contenente le cellule batteriche) e di surnatante (residui del brodo di fermentazione), bensì tre fasi (**Figura 22**): una inferiore di pellet con cellule batteriche, una intermedia acquosa di surnatante, e una superiore più corposa di composizione non nota; quest'ultima, tuttavia, non è stata scartata come surnatante, bensì recuperata e assieme al pellet processata, poiché ad analisi visive aveva colorazione e morfologia simile al pellet, e dunque probabilmente contenente materiale batterico.



**Figura 22.** È possibile distinguere le tre fasi ottenute a seguito della centrifugazione del brodo di fermentazione di *P. putida*. La fase inferiore e superiore hanno colorazione e morfologia simile, mentre quella intermedia di surnatante è di consistenza acquosa e di colore giallo.

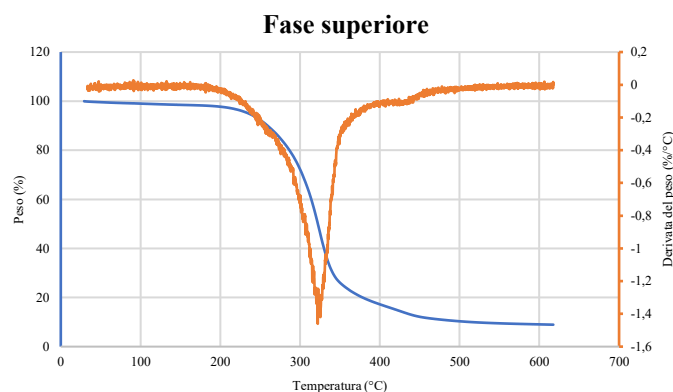
La centrifugazione è stata condotta a 54000 RCF per 15 min per assicurarsi di ottenere una separazione in fasi. Condizioni più blande (5000 RCF per 20 min) non sono risultate sufficienti per ottenere una buona separazione

Della fase superiore è stata recuperata una aliquota, essiccata, e analizzata per TGA ottenendo i seguenti valori:

Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	PHA da calcolo con Onset (%)	PHA da calcolo con Area (%)	Purezza (%)
17	9	80	78	83

**Tabella 26.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sul campione di fase superiore per valutarne la composizione.

Si nota dai valori di Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%) riportati nella **Tabella 26** e dal **Grafico 7**, come effettivamente sia presente del polimero in questa fase di separazione, quantificabile approssimativamente a circa il 79% del volume totale; questo valore è il prodotto della media tra i valori di Onset (%) e Area (%).



**Grafico 7.** Termogramma TGA ricavato dalle analisi sul campione finale per la valutazione della purezza, da cui poi sono stati ricavati i valori di residuo a 600°C (%) e Gomito (%) e la temperatura al Gomito (°C).

Di seguito nella **Tabella 27** invece sono riportati i risultati della prova di estrazione:

PROVA	RESA	PUREZZA
Liofilizzazione	15%	77%

**Tabella 27.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.

Osservando il valore di purezza, si potrebbe considerare il campione di bassa qualità; tuttavia, non si possiede un campione di riferimento completamente caratterizzato con cui confrontare con sicurezza i dati ottenuti da questa prova e fare dunque le relative conclusioni. Nella **Tabella 28**, riportata di seguito, si riportano più in dettaglio i valori di Residuo al Gomito (%), e di Residuo a 600 °C (%) per il calcolo della Purezza (%).

PROVA	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Purezza (%)
Liofilizzazione	23	6	77%

**Tabella 28.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sui campioni per valutarne la purezza.

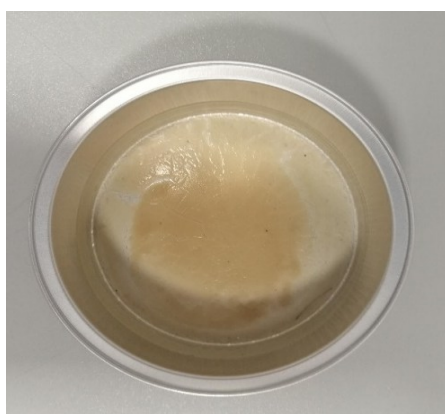
In questa prova di estrazione si è ottenuto un valore finale di resa di estrazione molto basso; non è possibile imputare la causa al protocollo di estrazione, poiché è stato sviluppato appositamente per l'*mcl*-PHA. Sarebbe potuto invece essere una questione di essiccamento finale del campione, perciò successivamente a queste attività, è stata svolta una prova di estrazione con il medesimo protocollo, applicando un essiccamento finale in stufa ventilata a 25 °C, al posto del passaggio di liofilizzazione, come previsto dai protocolli di estrazione per il PHBv, con l'unica accortezza di svolgere la procedura a una temperatura inferiore a 65 °C; è bene ricordare come la classe polimerica degli *mcl*-PHA sia composta da polimeri amorfi (come riportato nel. paragrafo 1.1.3) per i quali è possibile identificare una temperatura di fusione attestabile mediamente sui 55-70 °C;

operando a temperature minori si scongiura inoltre il rischio di degradare il polimero stesso.

Sono riportati nella **Tabella 29** i risultati della prova a confronto con la precedente:

PROVA	RESA	PUREZZA
<b>Liofilizzazione</b>	15%	77%
<b>Essiccamento a 25 °C</b>	74%	85%

**Tabella 29.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.



**Figura 23.** Materiale *mcl*-PHA estratto, come si presenta dopo l'essiccamento in stufa.

All'osservazione visiva il campione (**Figura 23**), dopo l'essiccamento in stufa, si presenta di colore marrone chiaro, molto viscoso e simile ad una colla; come previsto, proprietà ben diverse dai campioni di PHBv (compatti, gessosi e bianchi).

Osservando i valori di resa si nota un drastico aumento della resa rispetto alla prova precedente con liofilizzazione; mentre riguardo i valori di Purezza (%), per la prova con liofilizzazione finale si registra un valore inferiore rispetto alla prova con essiccamento in stufa. Sono riportati nella **Tabella 30** i valori di Residuo al Gomito (%), e di Residuo a 600 °C (%) per il calcolo della Purezza (%).

PROVA	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Purezza (%)
<b>Liofilizzazione</b>	23	6	77%
<b>Essiccamento a 25 °C</b>	15	6	85%

**Tabella 30.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sui campioni per valutarne la purezza.

Possiamo notare come la differenza più significativa la rileviamo nei valori di Residuo al Gomito (%) tra le due prove, mentre quelli di Residuo a 600 °C (%) sono uguali.

#### 4.3.2. PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE CON SOLVENTI

I risultati e valori dei parametri ottenuti con le precedenti prove di estrazione enzimatica di *mcl*-PHA da *P. putida*, hanno rilevanza limitata se non possono essere confrontati con un riferimento di un campione di polimero dall'alta qualità e purezza, completamente caratterizzato. Poiché è mancante questo riferimento, alla ricerca sui protocolli di estrazione enzimatica si sono affiancate una serie di attività volte a ottenere un polimero dall'alto grado di purezza, indipendentemente dal processo utilizzato; per raggiungere tale scopo si è individuato in letteratura un protocollo di estrazione con solventi (riportato nel paragrafo 3.16 di questa Tesi) che permette di ottenere un polimero altamente puro mediante l'uso di vari solventi, i quali possono essere meno o più efficaci, e ciò dipende dalle caratteristiche del polimero *mcl*-PHA da estrarre. Per verificare quale sia il solvente più performante nell'estrarre il polimero dal brodo di fermentazione ottenuto nel centro di ricerca, sono stati testati i solventi: cloroformio, ciclopentanone e acetone.

Sono riportati nella **Tabella 31** i valori di Resa e Purezza per tutte e tre le estrazioni con solvente:

PROVA	RESA	PUREZZA
Cloroformio	47%	98,8%
Ciclopentanone	37%	98,7%
Acetone	51%	99,6%

**Tabella 31.** Valori di Resa (%) e Purezza (%) per le varie prove di estrazione.



**Figura 24.** Materiale *mcl*-PHA estratto, come si presenta dopo l'essiccamento in stufa. (SX estrazione con cloroformio; CENTRO estrazione con ciclopentanone; DX estrazione con acetone).

La **Figura 24** mostra come i tre polimeri ottenuti siano di colore marrone, con tonalità più scura per il polimero estratto con ciclopentanone e più chiara per quello con cloroformio; anche questi polimeri si presentano viscosi e collosi.

A livello di rese finali di estrazione si nota come la resa maggiore si ottenga utilizzando come solvente l'acetone (51%), mentre con ciclopentanone si ottiene la resa minore (37%); comunque, tutte e tre le rese sono basse. Si è approfondito ulteriormente questo aspetto relativo alle basse rese di estrazione finale, analizzando il surnatante ottenuto dal passaggio di centrifugazione iniziale; le tre soluzioni residue dei lavaggi in Etanolo (cfr. passaggio 1. e 2. del protocollo descritto nel paragrafo 3.16); e il residuo cellulare finale ottenuto al termine del processo di estrazione, al fine di individuare il passaggio critico responsabile della perdita di materiale, che si ripercuote sul valore della resa. Dalle analisi TGA di questi campioni si è constatato come in media l'11,70% del polimero totale presente nella cellula non venga estratto dal solvente ma rimanga all'interno della cellula (**Tabella 32**); mentre la restante parte di polimero (approssimativamente il 40-50%) sia presente nelle soluzioni dei lavaggi con Etanolo e nel surnatante del lavaggio iniziale; solo per quest'ultimo è possibile avere una stima della quantità di polimero presente, tali valori sono riportati nella **Tabella 33**. I lavaggi con Etanolo dovrebbero eliminare la componente lipidica presente nel brodo di fermentazione e disidratare le cellule batteriche al fine di rendere più accessibile i granuli di biopolimero al solvente, migliorandone l'azione e l'efficienza di estrazione, senza solubilizzare il polimero, poiché il PHA è insolubile in Etanolo; tuttavia dai dati appena riportati comunque una parte di polimero viene estratta e persa durante tali lavaggi iniziali, e ciò impatta sulla resa di estrazione finale; probabilmente i lavaggi con Etanolo non sono idonei per questa tipologia di fermentato.

Solvente	<i>mcl</i> -PHA da calcolo con Onset (%)	<i>mcl</i> -PHA da calcolo con Area (%)	Media (%)	Media <sub>totale</sub> (%)
Cloroformio	11,0	8,3	9,6	11,7
Ciclopentanone	10,7	7,6	9,2	
Acetone	17,2	15,4	16,3	

**Tabella 32.** Contenuto di *mcl*-PHA da Onset (%) e Area (%) ottenuti tramite analisi TGA sui campioni di residuo cellulare finale. La media dei due valori fornisce una stima della quantità di polimero presente nel campione.

Solvente	<i>mcl</i> -PHA da calcolo con Onset (%)	<i>mcl</i> -PHA da calcolo con Area (%)	Media (%)	Media <sub>totale</sub> (%)
Cloroformio	35,5	33,3	34,4	23,8
Ciclopentanone	19,0	23,6	21,3	
Acetone	16,6	14,9	15,8	

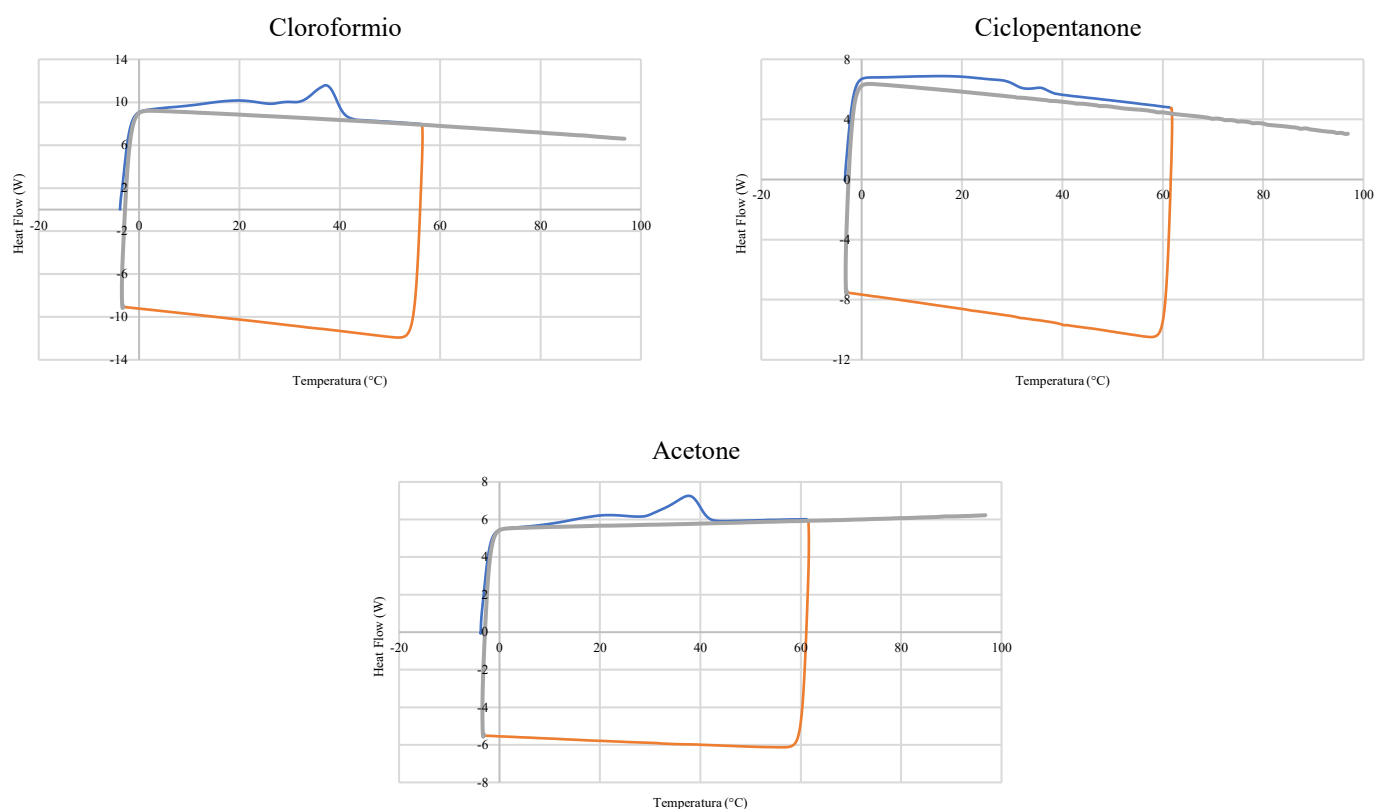
**Tabella 33.** Contenuto di *mcl*-PHA da Onset (%) e Area (%) ottenuti tramite analisi TGA sui campioni di surnatante del lavaggio iniziale. La media dei due valori fornisce una stima della quantità di polimero presente nel campione.

Nonostante le considerazioni sulle rese, lo scopo di queste attività è stato quello di ottenere un polimero puro: infatti, osservando le Purezze (%) si evidenzia come siano elevate, con campioni altamente puri (**Tabella 31**). La purezza maggiore si raggiunge con l'acetone (99,54%).

Sono riportate nella **Tabella 34** maggiori informazioni sui parametri ricavati dalle analisi sulla purezza per i tre campioni, mentre nel **Grafico 8** le curve DSC da cui si evince la natura amorfa del biopolimero:

PROVA	TGA		DSC	GPC		PUREZZA (%)
	Residuo al Gomito (%)	Residuo a 600 °C (%)	Cristallinità (%)	M <sub>w</sub> (kDa)	PDI	
Cloroformio	1,2	0,2	2,4	118,1	1,83	98,8%
Ciclopentanone	1,3	0,2	2,2	117,9	1,80	98,7%
Acetone	0,4	0,1	3,1	124,0	1,79	99,6%

**Tabella 34.** Parametri principali ottenuti tramite analisi sui campioni per valutarne la purezza.



**Grafico 8.** Termogramma DSC ricavato dalle analisi sul campione finale per la valutazione della qualità, da cui poi è stato ricavato il valore di cristallinità (%).

Si osserva come le differenze significative si riscontrino a livello del Residuo al Gomito (%) e Residuo a 600 °C (%): tra la prova con cloroformio e quella con ciclopentanone non si notano differenze, ma confrontandoli con quelli della prova in acetone, si rileva come tali due parametri abbiano valori nettamente superiori. È interessante osservare per tutti e

tra i solventi testati i valori di  $M_w$  attorno a 100 kDa e un valore di PDI tra 1,7-1,8; i polimeri di PHBv hanno  $M_w$  superiori (almeno 10 volte quelli) e intervalli di PDI più larghi. Tale risultato è particolarmente significativo, poiché con questi  $M_w$  gli *mcl*-PHA estratti non sono molto interessanti per le applicazioni industriali; per avere un interesse è necessario trovare il modo di produrli ed estrarli con  $M_w$  decisamente superiori.

Tuttavia, in conclusione possiamo affermare come tra i solventi testati si può quindi decretare l'acetone come solvente più efficace ad estrarre e pulire il polimero di *mcl*-PHA.

## **5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE**

## 5.1. CONCLUSIONI DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE DI PHBv

L'attività di ricerca descritta in questa Tesi ha permesso di valutare l'efficacia di diversi protocolli di estrazione per il recupero di PHBv, confrontandoli con il metodo brevettato da Versalis S.p.A. L'obiettivo principale è stato quello di individuare strategie di estrazione più efficienti e sostenibili, riducendo il quantitativo di reagenti e semplificando i passaggi di pretrattamento del fermentato di partenza, garantendo al contempo Rese (%) e Purezze (%) del polimero recuperato in linea con il brevetto Versalis S.p.A.

L'analisi comparativa tra i protocolli testati, individuati attraverso una ricerca approfondita in letteratura, ha evidenziato come il metodo più promettente sia quello basato sull'azione sinergica di un enzima idrolitico e di un tensioattivo. I risultati ottenuti dimostrano come questo protocollo rappresenti una valida direzione alternativa al metodo brevettato da Versalis S.p.A., offrendo rese comparabili (80-85%) e una purezza finale superiore al 98%.

Un aspetto chiave emerso è il ruolo dell'enzima idrolitico non solo nella fase di lisi enzimatica, ma soprattutto nella purificazione del biopolimero. Il confronto con il riferimento Versalis ha mostrato come il protocollo ottimizzato consenta di ottenere campioni con un minor contenuto di impurezze, come evidenziato da valori più bassi di Residuo al Gomito (1,4-2,0%) e Residuo a 600 °C (0,3-0,4%) nelle analisi TGA. Questo suggerisce come l'enzima idrolitico favorisca la rimozione selettiva della componente NPCM, migliorando la qualità complessiva del biopolimero, senza comprometterne l'integrità.

Le ottimizzazioni introdotte nel protocollo, come la riduzione dei cicli di omogeneizzazione e lavaggio, hanno dimostrato di non alterare significativamente la qualità del prodotto finale. In particolare, la diminuzione dei cicli di omogeneizzazione non ha influenzato l'efficienza del processo, mantenendo rese elevate, mentre la riduzione dei cicli di lavaggio ha semplificato il trattamento del materiale, garantendo comunque un'elevata purezza. Inoltre, la riduzione della concentrazione di tensioattivo permetterebbe un risparmio di reagenti, senza compromettere né la resa del processo né la qualità del polimero estratto. Questi risultati evidenziano la possibilità di migliorare l'efficienza dell'estrazione riducendo sia i passaggi operativi che l'uso di sostanze chimiche, un aspetto cruciale per la scalabilità industriale del protocollo.

Tuttavia, affinché il metodo possa essere adottato su larga scala, saranno necessarie ulteriori sperimentazioni su scala pilota, per confermare la riproducibilità e l'efficienza del processo. Inoltre, sarà fondamentale valutare l'impatto economico della metodologia proposta rispetto ai processi tradizionali, verificandone la convenienza e la sostenibilità.

Nel complesso, il protocollo sviluppato rappresenta una strategia innovativa per l'estrazione di PHBv, coniugando efficienza, sostenibilità e qualità del prodotto finale. L'ottimizzazione delle condizioni sperimentali ha permesso di migliorare le prestazioni del metodo, rendendolo competitivo rispetto ai processi consolidati. In futuro, ulteriori miglioramenti potranno essere raggiunti tramite l'integrazione di approcci biotecnologici come l'impiego di enzimi immobilizzati, o l'ottimizzazione delle condizioni di fermentazione, con l'obiettivo di rendere la produzione di biopolimeri sempre più sostenibile e accessibile su larga scala.

## **5.2. CONCLUSIONI DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE DI *mcl*-PHA**

L'estrazione di *mcl*-PHA da *P. putida* ha evidenziato differenze significative rispetto ai metodi utilizzati per il PHBv, sia in termini di efficienza di recupero sia di proprietà e caratteristiche del polimero. In particolare, le caratteristiche chimico-fisiche del biopolimero estratto confermano la sua natura amorfa, come evidenziato dalle analisi DSC, con una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g \approx -40$  °C), coerente con i dati di letteratura.<sup>11,18</sup> Questo risultato è particolarmente rilevante, poiché il comportamento termico del polimero influisce direttamente sulle sue potenziali applicazioni industriali, in particolare nella produzione di materiali e rivestimenti biodegradabili.

L'approccio enzimatico, pur risultando meno efficace in termini di purezza rispetto ai metodi con solventi organici (75-85% contro >99%), ha mostrato un notevole potenziale in termini di sostenibilità ambientale, riducendo l'impiego di solventi chimici e minimizzando l'impatto ecologico del processo di estrazione. Tuttavia, per migliorare le prestazioni di questo metodo, sarà necessario ottimizzare ulteriormente le condizioni di pretrattamento del fermentato e perfezionare le reazioni di lisi enzimatica, al fine di ottenere un prodotto finale con rese di estrazione e purezza più elevate.

L'ottenimento di un campione di riferimento di *mcl*-PHA altamente puro, utilizzato per caratterizzare il biopolimero e confrontare i protocolli di estrazione enzimatica, ha inoltre permesso di valutare l'efficacia di diversi solventi organici. I risultati ottenuti hanno mostrato

differenze significative: cloroformio e ciclopentanone hanno garantito discrete rese e un'elevata purezza del polimero estratto; l'acetone si è dimostrato il solvente più efficiente, producendo un *mcl*-PHA con la purezza migliore e con rese superiori rispetto agli altri solventi testati. Tuttavia, per tutti e tre i solventi analizzati, i polimeri estratti hanno mostrato valori di  $M_w$  attorno a 100 kDa e un PDI compreso tra 1,7 e 1,8, significativamente inferiori rispetto ai PHBV, che presentano  $M_w$  almeno dieci volte superiori e un intervallo di PDI più ampio. Questo risultato evidenzia come gli *mcl*-PHA ottenuti, con le attuali condizioni di estrazione, abbiano un  $M_w$  troppo basso per applicazioni industriali di interesse, rendendo necessaria l'identificazione di strategie per aumentarne il peso molecolare.

Nel complesso, l'analisi comparativa tra metodi enzimatici e solventi organici mostra da un lato come i solventi organici garantiscono i migliori risultati in termini di purezza, mentre l'approccio enzimatico rappresenta un'alternativa promettente per una produzione più ecocompatibile, con prospettive di miglioramento attraverso ulteriori ottimizzazioni sperimentali a livello dei pretrattamenti del fermentato di partenza e delle condizioni di reazione della lisi.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

1. Rodighiero V., Snidero A., “Produzione microbiologica di copolimeri PHA da singola fonte di carbonio.” Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie Avanzate, Università degli Studi di Pavia, 2024.
2. Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V., “Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging.” *Express Polym Lett*, 2014, 8, 791–808.
3. Meereboer K.W., Misra M., Mohanty A.K., “Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites.” *Green Chem*, 2020, 22, 5519–5558.
4. Morlino M.S., García R.S., Savio F., Zampieri G., Morosinotto T., Treu L., Campanaro S., “*Cupriavidus necator* as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches.” *Biotechnol. Ad.*, 2023, 69, 108264.
5. Vicente D., Proença D.N., Morais P.V., “The role of bacterial polyhydroxyalkanoate (PHA) in a sustainable future: a review on the biological diversity.” *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2023, 20, 2959.
6. Koller M., Mukherjee A., “A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters.” *Bioengineering*, 2022, 9, 74.
7. Zhou W., Bergsma S., Colpa D.I., Euverink G.J.W., Krooneman J., “Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy.” *J. Environ. Manage.*, 2023, 341, 118033.
8. Dilkes-Hoffman L.S., Lant P.A., Laycock B., Pratt S., “The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study.” *Mar Pollut Bull*, 2019, 142, 15–24.
9. Son J., Lim S.H., Kim Y.J., Lim H.J., Lee J.Y., Jeong S., Park C., Park S.J., “Customized valorization of waste streams by *Pseudomonas putida*: State-of-the-art, challenges, and future trends.” *Bioresour Technol*, 2023, 371, 128607.
10. Prieto A., Escapa I.F., Martínez V., Dinjaski N., Herencias C., de la Peña F., Tarazona N., Revelles O., “A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*.” *Environ. Microbiol.*, 2016, 18, 341–357.
11. Matsumoto K., Kageyama Y., “Increased production and molecular weight of artificial polyhydroxyalkanoate poly(2-hydroxybutyrate) above the glass transition temperature threshold.” *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7, 177.
12. Park H., He H., Yan X., Liu X., Scrutton N. S., Chen G.Q., “PHA is not just a bioplastic!” *Biotechnol. Ad.*, 2024, 71, 18320.
13. Pan P., Inoue Y., “Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters.” *Prog. Polym. Sci.*, 2009, 34, 605–640.
14. Koller M., De M.M., Dias S., Reiterer A., Braunegg G., “Modern biotechnological polymer synthesis: a review.” *Food Technol. Biotechnol*, 2010, 48, 255–269.
15. Jendrossek D., Pfeiffer D., “New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate).” *Environ. Microbiol.*, 2014, 16, 2357–2373.
16. Han J., Wu L.P., Liu X.B., Hou J., Zhao L.L., Chen J.Y., Zhao D.H., Xiang H., “Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers.” *Biomaterials*, 2017, 139, 172–186.

17. De Koning G.J.M., Kellerhals M., Van Meurs C., Witholt B., “A Process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* Part 2: process development and economic evaluation.” *Bioprocess Eng.*, 1997, 17, 15–21.
18. Pradhan S., Dikshit P.K., Moholkar V.S., “Production, Characterization, and Applications of Biodegradable Polymer: Polyhydroxyalkanoates.” *Mater. Horiz.*, 2020, 4, 51–94.
19. Kim D.-Y., Rhee Y.H., “Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates.” *J. Microbiol.*, 2007, 45, 87–97.
20. Grage K., Jahns A.C., Parlane N., Palanisamy R., Rasiah I.A., Atwood J.A., Rehm B.H.A., “Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications.” *Biomacromolecules*, 2009, 10, 660–669.
21. Kunasundari B., Sudesh K., “Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates.” *Express Polymer Letters*, 2011, 5, 620–634.
22. Koller M., “A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters.” *Fermentation*, 2018, 4, 30.
23. Galán B., Dinjaski N., Maestro B., de Eugenio L.I., Escapa I.F., Sanz J.M., García J.L., Prieto M.A., “Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442.” *Mol Microbiol*, 2011, 79, 402–418.
24. Griebel R.J., Merrick J.M., “Metabolism of poly-f-hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly-f-hydroxybutyrate granules.” *J. Bacteriol.*, 1971, 108, 782–789.
25. Merlick J.M., Lundgren G., Pfister R.M., “Morphological changes in poly-3-hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis.” *J. Bacteriol.*, 1965, 89, 234–239
26. Dinjaski N., Prieto M.A., “Swapping of phasin modules to optimize the in vivo immobilization of proteins to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida*.” *Biomacromolecules*, 2013, 14, 3285–3293.
27. Policastro G., Panico A., Fabbicino M., “Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review.” *Environ. Sci. Biotechnol.*, 2021, 20, 479–513.
28. Chavan S., Yadav B., Tyagi R.D., Drogui P., “A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks.” *Bioresour. Technol.*, 2021, 341, 125900.
29. Reddy V.U.N., Ramanaiah S.V., Reddy M.V., Chang Y.C., “Review of the developments of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs).” *Bioengineering*, 2022, 9, 225.
30. Kapritchkoff F.M., Viotti A.P., Rita C.P. Alli R.C.P., Zuccolo M., Pradella J.G.C., Maiorano A.E., Everson A. Mirandab E.A., Bonomia A., “Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*.” *Journal Biotechnol*, 2006, 122, 453–462.
31. Weimer A., Kohlstedt M., Volke D.C., Nickel P.I., Wittmann C., “Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, 104, 7745–7766.

32. Oliveira C.S.S., Silva C.E., Carvalho G., Reis M.A., “Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities.” *New Biotechnol*, 2017, 37, 69–79.
33. Yukesh K.R., Kumar M.D., Kavitha S., Banu J.R., Tyagi V.K., Rajaguru P., Kumar G., “Production and recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from waste streams – A review.” *Bioresour. Technol.*, 2022, 366, 128203.
34. Chen S., Dai X., Yang D., Dai L., Hua Y., “Polyhydroxyalkanoate synthesis from primitive components of organic solid waste: Comparison of dominant strains and improvement of metabolic pathways.” *Appl Energy*, 2023, 344, 121245.
35. Jacquel N., Lo C.W., Wei Y.H., Wu H.S., Wang S.S., “Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates).” *Biochem. Eng. J.*, 2008, 39, 15–27.
36. Pokhrel D.R., Sah M.K., Gautam B., Basak H.K., Bhattarai A., Chatterjee A., “Recent overview of surfactant-drug interactions and their importance.” *RSC Advances*, 2023, 13, 17685–17704.
37. Islam M.S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P.R., “A review on macroscale and microscale cell lysis methods.” *Micromachines*, 2017, 8, 83.
38. Shaban S.M., Kang J., Kim D.H., Surfactants: “Recent advances and their applications.” *Compos. Commun.*, 2020, 22, 100537.
39. Krister H., Jonsson B., Kronberg B., Lindman B., “Surfactants and polymers in aqueous solution.” *John Wiley & Sons Ltd*, 2003, 545.
40. Riva D., Prando T., del Seppia A., Frattini A., Mariani P., “Process for recovering and purifying of polyhydroxyalkanoates from a fermentation broth.” Patent WO2024/003698.
41. Mozejko-Ciesielska J., Szacherska K., Marciniak P., “*Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates.” *J. Polym. Environ.*, 2019, 27, 1151–1166.
42. Kassab A.C., Piskin E., Bilgic S., Denkbaz E.B., Xu K., “Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres: in vivo studies.” *J. Bioact. Compat. Polym.*, 1999, 14, 292–302.
43. Pieters K., Mekonnen T.H., “Stable aqueous dispersions of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) polymer for barrier paper coating.” *Prog Org Coat*, 2024, 187, 108101.
44. Rastogi V.K., Samyn P., “Bio-based coatings for paper applications.” *Coatings*, 2015, 5, 887–930.
45. Martino L., Cruz M.V., Scoma A., Freitas F., Bertin B., Scandola M., Reis M.A.M., “Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil.” *Int J Biol Macromol*, 2014, 71, 117–123.
46. Pérez-Rivero C., López-Gómez J.P., Roy I., “A sustainable approach for the downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates: State-of-the-art and latest developments.” *Biochem Eng J*, 2019, 150, 107283.
47. de Vrije T., Nagtegaal R.M., Veloo R.M., Kappen F.H.J., de Wolf F.A., “Medium chain length polyhydroxyalkanoate produced from ethanol by *Pseudomonas putida* grown in liquid obtained from acidogenic digestion of organic municipal solid waste.” *Bioresour Technol*, 2023, 375, 128825.

48. Yasotha K., Aroua M.K., Ramachandran K.B., Tan I.K.P., “Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration.” *Biochem Eng J*, 2006, 30, 260–268.
49. Neves A., Müller J., “Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*.” *Biotechnol Prog*, 2012, 28, 1575–1580.