

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Studio della crescita di *Cupriavidus necator* per la
cattura di CO₂ da biogas e applicabilità per la
produzione di poliidrossialcanoati**

Relatore: Prof. Laura Treu
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Prof. Tomas Morosinotto
Dipartimento di Biologia

Controrelatore: Prof. Elisabetta Bergantino
Dipartimento di Biologia

Laureando: Carlo Liberatore

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	4
Il biogas.....	4
Le bioplastiche.....	5
Capacità metaboliche e utilizzo di <i>C. necator</i>	7
SCOPO DELLA TESI.....	9
METODI	10
Ceppo batterico utilizzato e preparazione degli inoculi.....	10
Allestimento e monitoraggio delle colture in batch.....	10
Analisi e monitoraggio dei gas.....	11
Misurazione della densità ottica	12
Preparazione dei campioni e misurazione di PHB.....	12
Test della temperatura di crescita ottimale	13
Test degli effetti dei gas sulla crescita.....	14
Test degli effetti della limitazione di ossigeno	14
Allestimento e monitoraggio del fermentatore fed-batch	16
RISULTATI	17
Individuazione della temperatura ottimale per la crescita autotrofica	17
Valutazione della potenziale tossicità del metano.....	19
Valutazione degli effetti della limitazione di ossigeno.....	20
Produttività in un sistema di fermentatore fed-batch	23
CONCLUSIONI	26
BIBLIOGRAFIA	28

ABSTRACT

Il batterio chemiolitotrofo *Cupriavidus necator* è noto in letteratura per essere in grado di produrre polimeri biodegradabili chiamati poliidrossialcanoati (PHA), messi a disposizione alla cellula sotto forma di granuli citoplasmatici i quali hanno il ruolo di riserva di energia durante condizioni nutritive e ambientali sfavorevoli. Il batterio è in grado di sfruttare la CO₂ come fonte carboniosa per la sintesi di questi polimeri. La produzione del polimero può avere luogo a partire da substrati diversi in base alle disponibilità nell'ambiente circostante, utilizzando due diversi metabolismi. Nel metabolismo autotrofico la CO₂ è utilizzata come fonte di carbonio e l'H₂ e l'O₂ come donatore e accettore di elettroni, mentre nel metabolismo eterotrofico sono impiegati substrati organici come fruttosio, glicerolo o glucosio, a seconda del ceppo.

In questo elaborato si è affrontato e approfondito un potenziale utilizzo di *C. necator* per la cattura di CO₂ dal biogas, per ottenere biometano ad elevata purezza e contemporaneamente aumentare la produzione di poliidrossialcanoati sfruttando il metabolismo in autotrofia del batterio.

Nella prima parte dello studio si testano le capacità di crescita di *C. necator* in presenza di metano, biogas e miscele di gas sintetici [H₂:O₂:CO₂:CH₄] utilizzando colture in *batch* con volume di coltura 40 mL alimentando le colture con iniezioni di gas. Nella seconda parte invece viene effettuato uno *scale-up* utilizzando bottiglie in *batch* con volumi più grandi di coltura (180 mL) e un fermentatore *fed-batch* mantenendo la coltura monitorata e in agitazione, confrontando alla fine i risultati ottenuti con quelli degli esperimenti in piccola scala.

L'obiettivo del progetto è di valutare se in piccola scala *C. necator* sia in grado di crescere in maniera efficiente e mantenere inalterato il suo metabolismo in condizioni di colture diverse, di mantenere la sua capacità di *uptake* della CO₂ e in secondo luogo appurare se il batterio, fatto crescere in volumi più grandi e in fermentatore, riesca ad ottenere una migliore prestazione in termini di crescita e produzione di PHA, rendendo possibile un suo utilizzo per la cattura di CO₂ nell'*upgrading* del biogas.

INTRODUZIONE

Quando sentiamo parlare di cambiamenti climatici pensiamo subito alle attività antropiche che dall'inizio dell'età industriale fino ad oggi stanno mettendo a rischio la salute e la salvaguardia dell'ecosistema. I gas serra o *Green House Gases* (GHG) dei quali la CO_2 costituisce il 90%, vengono prodotti durante i processi di combustione delle fonti fossili per l'energia e per il trasporto merci (Islam Mozumder et al. 2015). I gas serra sono responsabili del riscaldamento globale e hanno un impatto notevole nell'innalzamento delle temperature. Riuscire a limitare le emissioni di gas serra è uno degli obiettivi principali della comunità scientifica, ma è uno sforzo che richiede la costituzione di un modello industriale che sia ad impatto zero sull'ambiente. In questo contesto, il progetto europeo "Harnessing potential of biological CO_2 capture for Circular Economy" (CooCE) si propone di accelerare lo sviluppo e l'*upscale* di piattaforme biotecnologiche di cattura della CO_2 . Uno degli obiettivi specifici del progetto è quello di fissare la CO_2 proveniente da biogas, ottenendo simultaneamente due prodotti: biogas purificato e prodotti chimici di elevato valore di mercato, in particolare poliidrossialcanoati (PHA), che rappresentano un'alternativa molto promettente alla plastica (**Figura 1**).

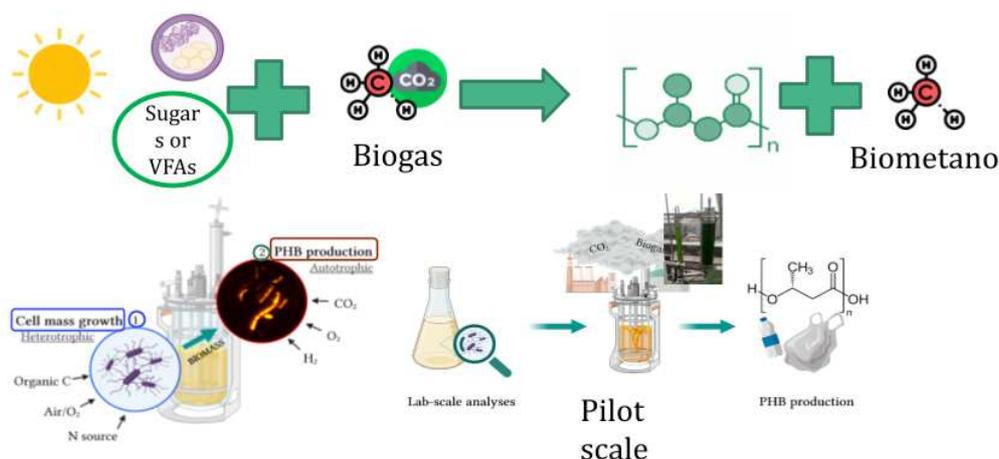


Figura 1. Schema di un processo produttivo che permette di ottenere simultaneamente *upgrading* del biogas e accumulo di PHA.

Il biogas

Un tema affrontato da numerose ricerche scientifiche è il nuovo ruolo del biogas nel prossimo futuro *green* per ottenere carburante, energia elettrica e prodotti chimici (Zhao et al. 2020). Il biogas è una miscela di gas ricavata dal trattamento dei rifiuti organici come scarti animali e vegetali attraverso la digestione

anaerobica (*anaerobic digestion*, AD). Il processo di digestione anaerobica ha come prodotti finali appunto il biogas e un residuo organico detto compost o digestato, contenente un alto contenuto di carbonio e azoto, utilizzabile come fertilizzante nell'agricoltura. Il biogas al termine del processo di digestione anaerobica è composto principalmente da CH₄ (45-75%), CO₂ (25-65%) con tracce (in ppmv) di altri gas come H₂S, estremamente tossico e corrosivo, e NH₃. La percentuale di CH₄ e CO₂ contenuta nel biogas può variare in base a diversi fattori come la provenienza e la natura del substrato utilizzato per la AD, le condizioni di processo (pH, temperatura, tempo di ritenzione) e la configurazione del digestore anaerobico utilizzato (Das, Ravishankar, e Lens 2022). L'*upgrading* del biogas è il processo grazie al quale si purifica il biogas dalla CO₂ ottenendo come prodotto finale il biometano, con una purezza intorno al 95%; a tale scopo si usano metodi chimici e fisici che seppur hanno alte rese sono dispendiose in termini energetici e di risorse poiché richiedono condizioni di processo estreme come alte pressioni e temperature, insieme a grandi quantità di energia elettrica e solventi come acqua, soda caustica e ammine (Hosseinipour e Mehrpooya 2019). Un metodo alternativo per effettuare l'*upgrading*, detto biometanazione, prevede l'utilizzo di comunità microbiche in grado di convertire la CO₂ in metano. Questa strategia sta prendendo piede grazie alla semplicità di processo, i bassi costi e soprattutto per la sua eco-compatibilità (Das, Ravishankar, e Lens 2022); la valorizzazione di rifiuti organici e la limitazione l'emissione di gas serra come la CO₂ e rendendo possibile una fornitura di energia per uso domestico o industriale. L'ipotesi di ottenere il biometano seguendo un sistema di economia circolare ha il potenziale di ridurre la nostra dipendenza dai combustibili fossili passando ad un sistema di produzione energetica *green*.

Le bioplastiche

La bioplastica di cui si tratterà in questo elaborato è il Poliidrossibutirrato (PHB), poliestere naturale appartenente alla famiglia dei poliidrossialcanoati (PHA). Questi polimeri, sintetizzati da ben 300 ceppi batterici diversi (McAdam et al. 2020), sono noti principalmente come fonte di energia di riserva in condizioni di carenza di nutrienti. La loro presenza aiuta inoltre a proteggere i componenti cellulari come RNA e proteine dall'esposizione a stress ossidativi, esposizione ai raggi UV, metalli pesanti e shock osmotici e altre condizioni ambientali sfavorevoli. I PHA possono essere sintetizzati a partire da diversi monomeri. Al momento ne sono noti circa 150 e il loro numero è in continua crescita grazie all'uso di tecniche fisiche, chimiche e con ingegnerizzazione di microrganismi per la produzione di nuovi monomeri con gruppi funzionali diversi.

I PHA vengono classificati in base alla lunghezza dei monomeri da cui sono composti. I *short length chain* (scl) di cui fa parte il PHB sono composti da monomeri di 3-5 atomi di carbonio, i *medium length chain* (mcl) contengono monomeri di 6-14 atomi di carbonio e infine i *long chain length* (lcl) contengono monomeri con più di 14 atomi di carbonio (Lu, Tappel, e Nomura 2009; Sehgal e Gupta 2020). I PHA composti da monomeri di diversa dimensione possiedono specifiche caratteristiche fisiche e meccaniche e sono suddivisi in co-polimeri, contenenti 2 monomeri diversi, e ter-co-polimeri se sono costituiti da 3 o più monomeri di diversa lunghezza. Questi monomeri hanno la loro struttura chimica di base e formano legami esterei con processi di condensazione tra il gruppo idrossilico di un monomero il gruppo carbossilico di un altro. Il poliidrossibutirrato (PHB), omopolimero appartenente al gruppo dei scl PHA [monomeri lunghi 3-5 atomi di carbonio], ha come monomero il 3-idrossibutirrato (3-HB) (**Figura 2**).

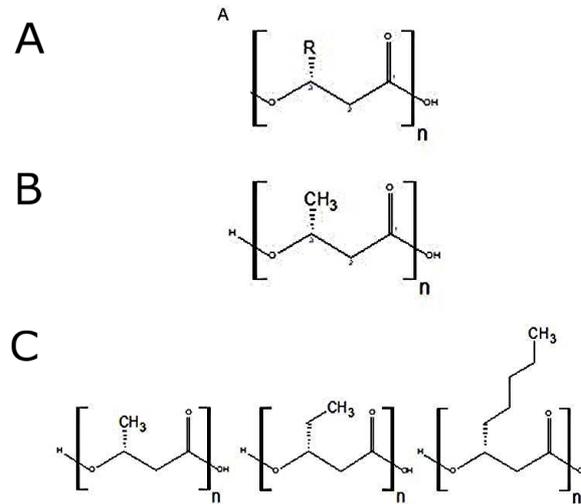


Figura 2. (a) Struttura chimica dei 3-idrossialcanoati con gruppo R e numero degli atomi di carbonio. (b) Struttura chimica del 3-idrossibutirrato, monomero costitutivo del PHB. (c) Si può confrontare la struttura dei monomeri 3-idrossialcanoati i quali differiscono tra loro dal gruppo sostituyente R. Il primo da sinistra è il 3-idrossivalerato con il suo gruppo metilico (CH₃-), in centro il 3-idrossivalerato con il gruppo etilico (-C₂H₅), a destra il 3-idrossioctanoato (-C₅H₁₁). Immagine adattata dalla review (Sehgal e Gupta 2020) creata con il software ACD/Chemsketch.

Il 3-R-idrossibutirrato, composto da una catena principale a 3 atomi di carbonio, con un gruppo sostituyente metilico (-CH₃) è il monomero del PHB ed essendo il monomero più piccolo di questo gruppo di bioplastiche, conferisce al polimero una maggiore cristallinità, maggior resistenza termica una minore permeabilità all'ossigeno rispetto agli altri polimeri appartenenti ai PHA (Zhang et al. 2022). La lunghezza del gruppo sostituyente R e la presenza di monomeri diversi nella stessa

catena determina le proprietà meccaniche e fisiche del materiale come temperatura di fusione (T_m), modulo elastico, idrofobicità e temperatura di transizione vetrosa (T_g) (Sehgal e Gupta 2020). Queste caratteristiche sono importanti per stabilire i processi di lavorazione dei PHA, le forme dei prodotti che si possono ottenere e i loro utilizzi finali.

Le proprietà meccaniche e fisiche dei PHA sono paragonabili alle plastiche tradizionali provenienti da fonti fossili (Lopar et al. 2014) di conseguenza, questi polimeri naturali possono essere processati e trattati con le tradizionali tecnologie industriali per il processamento della plastica al fine di ottenere prodotti utilizzati nella vita quotidiana (sacchi per la spesa, stoviglie, *packaging* ecc...) ma è utilizzabile anche in agricoltura sotto forma di pellicole per la pacciamatura e in ambito biomedicale per suturazioni, costruzione di scaffold, cartilagini e capsule per il *drug delivery*. (Fernandez-Bunster e Pavez 2022; Sehgal e Gupta 2020). Questo ultimo utilizzo è stato sollecitato da uno studio in cui sono stati rinvenuti naturalmente in campioni di sangue umano e animale tracce di monomeri e oligomeri del 3-HB e il risultato dimostra la biocompatibilità del polimero con i sistemi biologici. Purtroppo la produzione di bioplastiche come i PHA tuttora è 2-3 volte più costosa rispetto alla produzione della plastica tradizionale (Sehgal e Gupta 2020). Nonostante i costi attuali, le caratteristiche che suscitano interesse per questa famiglia di bioplastiche sono la biodegradabilità, la compostabilità e la biocompatibilità che le rendono vantaggiose per l'economia circolare di domani.

Capacità metaboliche e utilizzo di *C. necator*

Il processo di *biogas upgrading* e la produzione di PHA sono temi di studio di questo elaborato incentrati su *Cupriavidus necator*, un batterio Gram-negativo, con capacità eterotrofe e chemiolitotrofe, aerobio facoltativo, mesofilo appartenente alla famiglia delle *Burkholderiaceae*. Questo batterio possiede un genoma di 7,4 Mbp contenente più di 6000 geni (Cramm 2009) ed è noto per la sua capacità di produrre granuli di PHB nel citoplasma come riserva di energia. In presenza di alcuni substrati organici, *C. necator* cresce in eterotrofia. In natura utilizza infatti il fruttosio e l'N-acetil-glucosammina come substrati, ma non è in grado di utilizzare il glucosio (Cramm 2009; Lopar et al. 2014). Si può inoltre ingegnerizzare il suo metabolismo rendendolo in grado di utilizzare altri substrati. Il ceppo utilizzato in questo elaborato è stato ottenuto da un processo di mutagenesi grazie al quale è stato selezionato il ceppo mutante in grado di

utilizzare il glucosio come substrato principale per il suo metabolismo (Raberg et al. 2011). Inoltre, *C. necator* è dotato di un metabolismo chemiolitotrofo, grazie al quale assimila la CO₂ attraverso il ciclo Calvin-Benson-Bassham (CBB) (Raberg et al. 2011; Sohn et al. 2021). L'idrogeno funge da donatore di elettroni per ottenere il potere riducente necessario alla fissazione della CO₂. A questo scopo, *C. necator* utilizza delle idrogenasi [Ni-Fe], una famiglia di enzimi per ossidare l'idrogeno atmosferico in protoni e elettroni: la *membrane bound hydrogenase* (MBH), inserita nella membrana plasmatica, la *NAD⁺-reducing hydrogenase* (SH) che è solubile e si trova nel citoplasma, e un'idrogenasi regolatoria (RH) che funge da sensore dell'idrogeno e attiva la trascrizione delle altre idrogenasi quando questo è disponibile (Cramm 2009; Kleihues et al. 2000; Schäfer, Friedrich, e Lenz 2013).

La produzione dei PHB nella cellula viene indotta da stress metabolici o situazioni ambientali sfavorevoli come la scarsa disponibilità di nutrienti, o anche stress dovuti a una bassa concentrazione di gas come l'ossigeno (Islam Mozumder et al. 2015; McAdam et al. 2020). I granuli possono raggiungere 46-78% del peso secco della massa batterica (*Cell Dry Weight* o CDW) (Zhang et al. 2022). Il *pathway* responsabile della sintesi dei PHB utilizza come precursore l'acetil-CoA e coinvolge poche reazioni enzimatiche per ottenere il prodotto finale (**Figura 3**). L'insieme dei geni che prende parte alla sintesi del polimero è codificato in un unico operone chiamato *PHA biosynthetic operon*. La via di biosintesi è costituita da tre reazioni: PHA sintasi (PhaC), β-chetotilasi (PhaA) e NADPH-acetoacetil-CoA reductasi (PHaB).

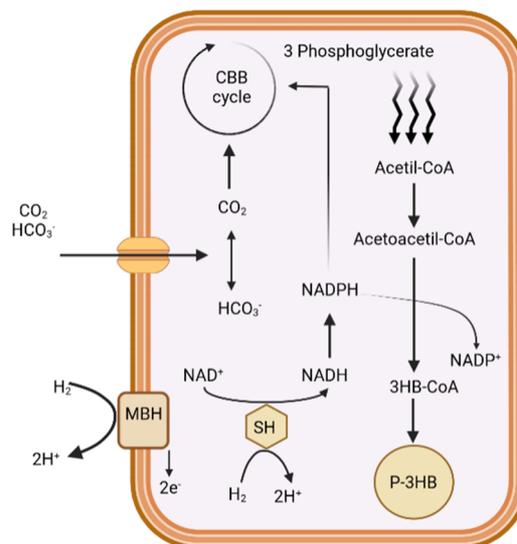


Figura 3. Pathway metabolico in autotrofia con l'utilizzo della CO₂ per la produzione del PHB. Immagine creata con Biorender adattata dalla review (Miyahara et al. 2022).

La possibilità di *C. necator* di produrre PHA a partire da CO₂ è stata dimostrata in diversi lavori ed è nota da molti anni (A., K., e N. 2001; Garcia-Gonzalez e De Wever 2017). Tuttavia, non sono noti esperimenti in cui la produzione di PHA sia stata accoppiata all'*upgrading* del biogas. Soprattutto, non sono noti i possibili effetti negativi che alte concentrazioni di metano o altri gas presenti nel biogas grezzo possono avere sulla crescita autotrofica. Pertanto, in questo elaborato l'intento è di studiare l'idoneità di *C. necator* per lo sviluppo di un processo che combini l'*upgrading* del biogas e la produzione di PHA.

SCOPO DELLA TESI

L'elaborato è strutturato in due parti principali.

La prima parte descrive alcuni test di crescita di *C. necator* in autotrofia, studiando in particolare l'effetto di temperature diverse (30°C e 37°C) e la messa a punto della crescita prima in presenza di miscele artificiali di [H₂:O₂:CO₂:CH₄], e successivamente in presenza di biogas ottenuto da un impianto di digestione anaerobica. Con l'allestimento di questi esperimenti vogliamo saggiare la capacità di *C. necator* di mantenere un profilo di crescita in autotrofia in presenza di alte percentuali di metano e di utilizzare la CO₂ presente nel biogas come fonte di carbonio per il metabolismo rendendo possibile il processo di *upgrading*.

La seconda parte dell'elaborato si concentra sulla produzione di PHB da parte di *C. necator* in condizioni di microaerofilia. Gli effetti della disponibilità limitata di ossigeno sono stati studiati in fermentatore *fed batch* e in bottiglie da 550 mL, misurando la percentuale intracellulare di PHB prima e dopo l'induzione dello stress.

METODI

Ceppo batterico utilizzato e preparazione degli inoculi

Il ceppo di *Cupriavidus necator* utilizzato negli esperimenti presentati è il DSM 545 (<https://www.dsmz.de/>). Questo ceppo è stato selezionato da un processo di mutagenesi allo scopo di renderlo capace di utilizzare il glucosio come fonte di energia. Per ogni esperimento viene preparato un inoculo al fine di avere sufficiente biomassa di partenza. Una coltura di *C. necator* è mantenuta in crescita su piastra Petri, con terreno Luria-Bertani (LB) addizionato di agar 1% p/v. Per preparare l'inoculo, una piccola quantità di biomassa è prelevata dalla piastra mediante l'utilizzo di un'ansetta sterile ed è lasciata crescere *overnight* in medium 81 (<https://www.dsmz.de/>) addizionato di glucosio alla concentrazione di 5 g/L. La crescita avviene in una beuta sterile mantenuta in agitazione alla temperatura di 30°. Il terreno di coltura utilizzato per la crescita di *C. necator* è il DSMZ 81 (<https://www.dsmz.de/>), preparato secondo le indicazioni specificate dal DSMZ. In breve, si tratta di un terreno contenente sali minerali, microelementi e vitamine essenziali per la crescita in autotrofia. Per le colture eterotrofiche, lo stesso mezzo di crescita è addizionato di glucosio alla concentrazione di 5 g/L.

Allestimento e monitoraggio delle colture in *batch*

Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando colture *batch*, ovvero colture a sistema chiuso con un volume costante di liquido, in cui lo scambio di gas è controllato. Per allestire le bottiglie delle colture *batch* ogni operazione di preparazione viene svolta sotto cappa biologica per mantenere la sterilità. Si introducono in sequenza prima il medium e l'inoculo con una siringa. Le bottiglie vengono chiuse con un tappo di gomma butilica e sigillate da una ghiera, in modo da impedire scambi di gas tra lo spazio di testa e l'ambiente. Il *working volume* delle colture e la composizione dello spazio di testa vengono stabiliti in base allo scopo, alle condizioni e alla durata dell'esperimento. La crescita di *C. necator* è stata monitorata attraverso la misurazione dei valori di densità ottica a 600 nm (*optical density*, OD) e le concentrazioni dei gas. I prelievi per le misurazioni e l'inserimento di gas, così come i prelievi di campioni per la misurazione dell'OD, sono stati effettuati con aghi sterili. La crescita in autotrofia dipende dalla presenza di idrogeno, ossigeno e anidride carbonica. Per assicurare la presenza di questi tre gas, la loro concentrazione è stata misurata ogni 24 ore circa con un gascromatografo Bioanalyzer 8860 (Agilent, Santa Clara, CA, Stati Uniti) e la pressione dentro le bottiglie è stata misurata prima e dopo l'inserimento dei gas con un manometro Delta OHM HD2124.2. Inoltre, la crescita delle cellule

batteriche è stata monitorata misurando l'OD del terreno mediante un lettore di piastre Spark (Tecan, Männedorf, Svizzera), misurando ciascuna coltura in triplicato e sottraendo a ciascuna misura l'OD del medium senza inoculo.

Analisi e monitoraggio dei gas

Le analisi della composizione dei gas nello spazio di testa delle colture *batch* sono state eseguite ogni 24 h circa almeno 1 volta soprattutto per osservare la composizione dei gas nello spazio di testa e se necessario si faceva partire una seconda analisi dopo un *refilling* ovvero iniezione di uno o più gas in coltura nel caso mancassero alcuni gas fondamentali per la crescita del batterio. Se dopo il *refilling* al gascromatografo la percentuale dei gas raggiunge un livello sufficiente per la continuità della crescita autotrofa si conclude la fase di analisi per procedere alla fase successiva. Il gascromatografo Bioanalyzer 8860 (Agilent, Santa Clara, CA, Stati Uniti, **Figura 4**) permette di conoscere la composizione in % di gas iniettando con una siringa sterilizzata con alcool etilico 1 ml di volume proveniente dallo spazio di testa nell'iniettore dei gas e il risultato è rappresentato dalle percentuali dei gas presenti nel campione.

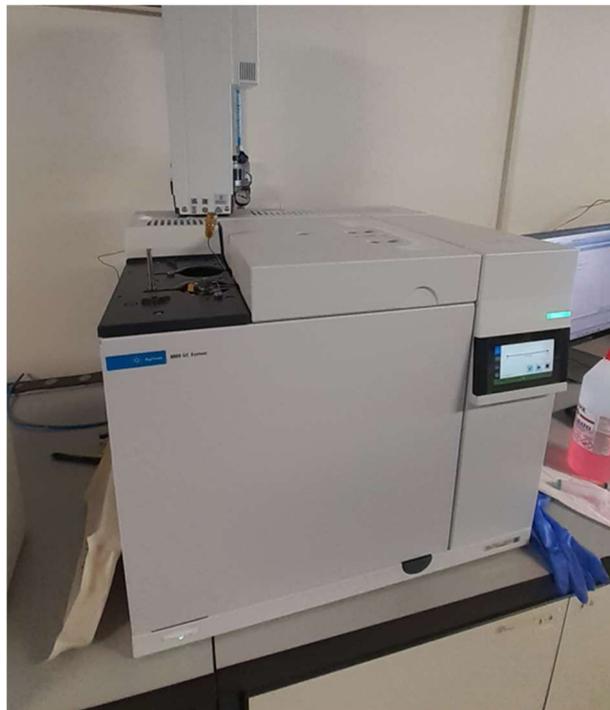


Figura 4. Gascromatografo utilizzato nel corso dell'elaborato di tesi.

La pressione all'interno delle colture in batch viene misurata prima delle analisi al gas cromatografo e dopo la fase di refilling dei gas, utilizzando un manometro Delta OHM HD2124.2. Con la misura della pressione e utilizzando l'equazione di stato dei gas perfetti:

$$pV = nRT$$

si possono ricavare le moli totali di gas presente; il volume equivalente di gas a 1 atmosfera è calcolato usando l'equazione. Infine, conoscendo le percentuali dei singoli gas grazie alle misure al gas cromatografo, per ciascun gas è calcolato il volume equivalente. Questi calcoli aiutano ad ottenere una buona approssimazione della quantità di gas assoluta nello spazio di testa, e di quanto del loro volume *C. necator* produce o utilizza. Queste misurazioni le troviamo nell'esperimento sulla limitazione di ossigeno (cfr. sezione Risultati).

Misurazione della densità ottica

Per l'analisi della densità ottica di una coltura, la lettura è strutturata nelle seguenti fasi: ogni coltura in batch viene agitata vigorosamente per alcuni secondi in modo da eliminare ogni aggregato cellulare e usando una siringa con ago sterilizzato, si prelevava una aliquota di coltura da depositare in una provetta eppendorf. Dalla provetta eppendorf l'aliquota viene distribuita in 3 pozzetti su una piastra da 96 pozzetti. La procedura è ripetuta per ciascuna coltura da analizzare. La piastra da 96 viene inserita nel lettore di piastre Spark (Tecan, Männedorf, Svizzera) impostando la lunghezza d'onda a 600 nm. Si ottengono 3 valori di OD di ogni coltura con i quali si fa la media aritmetica. Le letture dell'OD sono state fatte con un diverso coefficiente di diluizione (1:2 o 1:3) determinato in base alla torbidità iniziale delle colture.

Preparazione dei campioni e misurazione di PHB

Per preparare i campioni all'estrazione e calcolare la percentuale di PHB bisogna separare le cellule dalla fase liquida. Le provette allestite per i campionamenti vengono prima pretrattate in incubatore a 100 °C e poi messe in essiccatore per eliminare l'umidità. Si pesa la tara di ogni provetta su bilancia analitica. Dopo aver depositato un'aliquota di coltura in una falcon pretrattata, si imposta la temperatura della centrifuga da banco Eppendorf 5810R a 4 °C e si centrifugano i campioni a 4000 rpm per 30 minuti. Dopo la centrifugazione, il surnatante viene eliminato da ogni falcon conservando il pellet sul fondo. I campioni vengono depositati e conservati in freezer.

La fase successiva di preparazione consiste nel processo di liofilizzazione, grazie al quale si elimina ogni residuo d'acqua presente nel pellet. I campioni vengono sigillati con del parafilm, che viene poi forato più volte in modo da permettere all'acqua di fuoriuscire dalla falcon. I campioni sigillati si lasciano chiusi con i loro tappi corrispondenti in congelatore a -89 °C per 24 ore. Dopo il surgelamento, i campioni vengono aperti e introdotti nel liofilizzatore Edwards ed essiccati per 24

ore per eliminare al meglio ogni molecola d'acqua. Dopo la liofilizzazione, i campioni vengono pesati di nuovo su bilancia analitica per poter calcolare il peso netto del pellet (CDW).

La fase di estrazione e misurazione della percentuale di PHB consiste per prima cosa nel polverizzare completamente il campione liofilizzato, utilizzando una spatola, fino ad ottenere una polvere uniforme; si pesano con bilancia analitica circa 10 mg di pellet, che vengono poi trasferiti in una provetta di vetro Pyrex. Nella provetta contenente la pesata si inseriscono, operando sotto cappa, in ordine 1 mL di acido benzoico, 1 mL di cloroformio e 2 mL di metanolo. Dopo aver introdotto questi solventi, si centrifuga per 1 min e si mette il campione sigillato con il proprio tappo in incubatore a 100° per 4h. Dopo l'incubazione si formano 2 fasi: una fase acquosa superiore e una fase organica nel fondo, contenente il cloroformio e gli altri solventi. Il PHB si rimescola nella fase organica, dato che il polimero ha un'alta idrofobicità e affinità con i solventi clorurati. Dopo la separazione delle due fasi si può iniziare a estrarre la fase organica nella quale è disciolto il PHB, mediante una pipetta Pasteur la cui punta si inserisce sul fondo della provetta e si aspira il maggior volume possibile di fase organica. Questa è poi inserita dentro a delle *sample vials* da 2 mL per la gas cromatografia liquida. Il risultato finale sarà la percentuale finale di PHB in rapporto w/w contenuto nei 10 mg di campione estratto. (Braunegg, Sonnleitner, e Lafferty 1978).

Test della temperatura di crescita ottimale

Si allestiscono colture in bottiglie dal volume totale di 80 mL e uno spazio di testa di 40 mL. Le colture n°1 (medium 81 - glucosio 5 g/L) e n°2 (medium 81 senza glucosio) hanno il ruolo di controlli positivi e negativi per osservare l'andamento di *C. necator* DSM 545 nelle migliori e peggiori condizioni di coltura. I controlli utilizzeranno nello spazio di testa solo l'aria a pressione atmosferica introdotta durante l'operazione di chiusura e non vengono riempite con altri gas per tutto l'esperimento. Le colture n°3 ('gases') [H₂:O₂:CO₂] dopo la chiusura vengono insufflate per 10 minuti con azoto inserendo un ago sterile per sostituire completamente i gas. Per evitare sovrappressione e per permettere l'eliminazione dei gas con l'azoto, viene inserito un altro ago sterilizzato da cui i gas possono fuoriuscire. Subito dopo il *flushing* si inizia la fase di *feeding* nella quale introduciamo ogni 24 h con siringa sterilizzata una miscela di gas [H₂:O₂:CO₂] per mantenere la crescita autotrofica. L'operazione di allestimento illustrata è identica per le colture a 30° e 37°, per un totale di 34 bottiglie. Le due serie vengono fatte crescere alle loro temperature concordate per 30 giorni.

L'esperimento è impostato e svolto con le stesse modalità dell'esperimento precedente, ma vengono allestite più colture in batch nella serie del controllo senza glucosio e nella serie contenente la miscela dei gas con un totale di 34 bottiglie. Vengono regolarmente prelevate (circa ogni 24 h) due colture, una appartenente alla serie del controllo e una appartenente alla miscela dei gas che vengono poi trasferite ciascuna in una falcon da 50 mL per essere preparate alla centrifugazione e alla liofilizzazione con lo scopo di osservare la variazione nella percentuale di PHB nel corso del tempo. La durata complessiva dell'esperimento è di 14 giorni.

Test degli effetti dei gas sulla crescita

L'esperimento ha lo scopo di testare la crescita di *C. necator* DSM 545 in presenza di biogas e di CH₄ e stabilire quali effetti CH₄ e CO₂ possono avere sul profilo di crescita del batterio. Sono state allestite colture in bottiglie da 120 mL, con un *working volume* di 40 mL. Le colture sono state mantenute alla temperatura di 30°C per 14 giorni. Sono state testate sei diverse condizioni, allestite come segue. I controlli con e senza glucosio vengono allestiti come negli esperimenti precedenti lasciando che consumino i gas presenti nello spazio di testa al momento della chiusura. Viene allestito in maniera simile, in medium 81 senza glucosio, un controllo da mantenere in crescita autotrofica senza metano. Altre due condizioni vengono preparate in modo analogo ma aggiungendo 20 mL e 40 mL di CH₄ nello spazio di testa, rispettivamente. L'ultima condizione è stata allestita insufflando per alcuni minuti il mezzo con il biogas proveniente da un fermentatore e aggiungendo poi la miscela [H₂:O₂:CO₂]. I controlli sono stati monitorati solo attraverso l'OD, mentre nelle altre condizioni è stata misurata anche la composizione dello spazio di testa. Le colture in autotrofia sono state alimentate con la miscela di gas [H₂:O₂:CO₂] per tutto l'esperimento.

Test degli effetti della limitazione di ossigeno

Nell'esperimento si effettua uno *scale-up* mantenendo la modalità *batch*, passando da un *working volume* di 40 mL a 180 mL. Il volume totale delle bottiglie è di 550 mL. L'aliquota di inoculo da inserire in ogni coltura viene concordata al 8% v/v cioè 14,4 mL e la preparazione viene sempre svolta sotto cappa per mantenere la sterilità. Le condizioni di coltura sono rappresentate da controllo con glucosio, controllo senza glucosio con miscela di gas [H₂:O₂:CO₂], CH₄ al 10% e 50%; ciascuna serie è in triplicato, per un totale di 12 bottiglie.

La procedura di preparazione per i controlli con glucosio è la stessa usata negli esperimenti precedenti. Tutte le altre bottiglie sono state portate a una pressione

di circa 2 atm inserendo i gas necessari a ottenere la composizione desiderata. Per i triplicati della serie di controlli con miscela di gas [H₂:O₂:CO₂], si introduce nella bottiglia medium 81 senza glucosio e l'aliquota dell'inoculo; fatto ciò si sigilla con tappo in gomma butilica e ghiera e in seguito si insufflano con siringa sterilizzata 70 mL di azoto, 50 di CO₂ e 250 di H₂. Per preparare i triplicati della serie 'CH₄ 10%' si procede come nel caso precedente, insufflando però metano al posto dell'azoto. I triplicati della serie 'CH₄ 50%' vengono prima insufflati con metano puro per 10 minuti e in seguito vengono inseriti 250 mL di idrogeno, 70 di ossigeno e 50 di anidride carbonica. Ogni giorno vengono fatte due misurazione della pressione con il manometro: la prima misurazione viene fatta prima della misura al gas cromatografo; dopo aver ottenuto la composizione dei gas viene rilasciata la sovrappressione dalle colture con un ago sterilizzato e si inietta in ciascuna condizione una miscela di gas come da **Tabella 1** mediante una siringa sterilizzata. Dopo il *refill*, viene misurata per una seconda volta la pressione.

Tabella 1. Quantità di gas (mL) utilizzate per il *refill* nelle varie condizioni nella prima fase e nella seconda fase dell'esperimento

		Aria	H ₂	CO ₂	O ₂	CH ₄
prima	Controllo con miscela di gas	220	125	25		
	10% CH ₄	185	125	25		35
	50% CH ₄		125	25	35	185
seconda	Controllo con miscela di gas	190	150	50	-	
	10% CH ₄	155	150	50	-	35
	50% CH ₄		150	50	-	190

Ogni giorno vengono reintrodotte le stesse quantità di gas nelle colture per mantenere invariata nel tempo la composizione dello spazio di testa. Le colture vengono fatte crescere seguendo questa procedura ogni 24 ore, fino a che l'OD non raggiunge il suo valore massimo. Con il raggiungimento della fase di latenza si inizia la fase di stress: viene interrotto il rifornimento giornaliero di ossigeno, lasciando che venga completamente consumato quello presente, per indurre uno stress metabolico. Le quantità di gas iniettate giornalmente sono riportate in **Tabella 1**. Lo scopo della limitazione di ossigeno è di indurre *C. necator* ad

aumentare la percentuale di PHB intracellulare (Islam Mozumder et al. 2015). La misura delle pressioni e il calcolo delle quantità effettive di gas sono state effettuate come descritto nel paragrafo “Misurazione pressione e calcolo quantità assoluta dei gas”. La durata complessiva dell’esperimento è di 10 giorni dei quali gli ultimi 3 sono stati impiegati per indurre lo stress in mancanza di ossigeno.

Allestimento e monitoraggio del fermentatore *fed-batch*

In questo esperimento si realizza un secondo *scale-up*: la coltura viene allestita in un fermentatore della New Brunswick Scientific da 2 L con sensori per misurare la temperatura, il pH e l’ossigeno disciolto (*dissolved oxygen*, DO). Il fermentatore ha inoltre al suo interno un rotore, il quale mescola costantemente la coltura in modo da facilitare la dissoluzione dell’ossigeno dallo spazio di testa al mezzo. Il fermentatore contiene una valvola di estrazione che permette durante l’esperimento di estrarre a intervalli prestabiliti un'aliquota di coltura in una falcon, con lo scopo di analizzare la percentuale di PHB prodotta al momento dell’estrazione. Oltre a poter estrarre aliquote di coltura, è anche possibile inserire ossigeno per mantenerlo disponibile nel fermentatore utilizzando una siringa inserendola nell’apposita valvola di iniezione mantenendo la sterilità.

L’esperimento ha previsto l’allestimento di una coltura di tipo *fed-batch*. Con il termine *fed-batch* si parla di un sistema semi-aperto, in cui sono introdotti in entrata nutrienti come mezzo di crescita e gas per mantenere efficiente la crescita di *C. necator*, ma non è previsto alcun flusso in uscita. Inizialmente è stato inserito all’interno del fermentatore un volume di coltura preparata precedentemente pari a 500 mL. Il batterio è stato fatto crescere a una temperatura di 30°C in medium 81 addizionato con 5 g/L di glucosio. La durata totale dell’esperimento è stata di 21 giorni, rinfrescando il mezzo di coltura e iniettando ossigeno quando la crescita raggiungeva la fase stazionaria.

RISULTATI

Al fine di verificare l'applicabilità di *C. necator* in un processo coordinato di upgrading del biogas e di produzione di PHB sono stati eseguiti degli esperimenti per studiare in primo luogo la temperatura ottimale di crescita in autotrofia, in secondo luogo una verifica sulla possibile tossicità del metano, in terzo luogo gli effetti della limitazione di ossigeno ed infine gli effetti dello scale-up con l'ausilio di un fermentatore fed-batch sulla produzione del PHB.

Individuazione della temperatura ottimale per la crescita autotrofica

In primis, al fine di appurare la temperatura ottimale per la crescita di *C. necator* DSM 545, sono state allestite colture *batch* mantenute a 30°C e 37°C in cui *C. necator* è stato fatto crescere autotroficamente. Le colture sono state monitorate misurando l'OD e le percentuali di idrogeno, ossigeno ed anidride carbonica nello spazio di testa delle bottiglie. I profili di crescita e di consumo dei gas evidenziano un comportamento molto diverso a seconda della temperatura (**Figura 5**). In particolare, si osserva che nelle colture a 30°C si raggiunge un valore massimo di OD_{600nm} quasi doppio rispetto alle colture mantenute a 37°C.

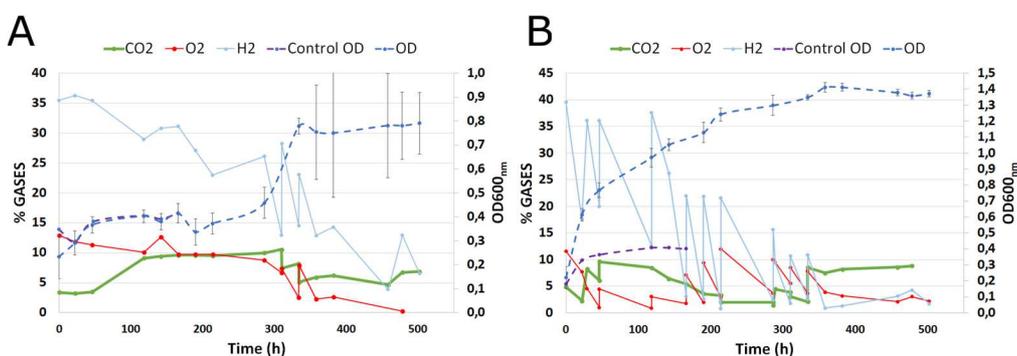


Figura 5. Curve di crescita e consumo dei gas a 37°C (**a**) e a 30°C (**b**). I valori riportati sono ottenuti dalla media aritmetica di tre repliche biologiche con le relative deviazioni standard. Le linee continue fanno riferimento alle percentuali di gas nelle bottiglie, mentre quelle tratteggiate descrivono l'andamento della densità ottica a 600 nm (OD_{600nm}).

Un'altra caratteristica da notare è la differenza negli andamenti delle curve di OD. A 37°C si evidenzia una fase di *lag* molto lunga, mentre a 30° la curva presenta una fase di *lag* molto breve seguita da una fase di crescita costante e stabile. Oltre alle curve di OD, anche la composizione dei gas hanno un profilo di variazione molto diverso nelle due condizioni. A 30°C si osservano variazioni nette nelle percentuali di gas nell'arco di 24h, segno che il batterio a questa temperatura ha un profilo

metabolico molto più efficiente sia per quanto riguarda la velocità di duplicazione che per la migliore capacità di utilizzare i gas utili per l'autotrofia. Il miglior profilo di crescita raggiunto da *C. necator* a 30°C potrebbe dipendere dalla diversa solubilità dei gas al variare della temperatura. Aumentare la temperatura di una coltura causa una diminuzione della solubilità dei gas, che perciò saranno meno presenti nel mezzo. Viceversa, una scarsa dissoluzione dei gas significa per *C. necator* non essere in grado di crescere in autotrofia.

L'esperimento è stato ripetuto con l'obiettivo di misurare la percentuale intracellulare di PHB e la sua variazione nel tempo. Inoltre, è stato allestito un controllo con glucosio a ciascuna temperatura per verificare gli effetti della variazione in eterotrofia. Come nell'esperimento precedente, possiamo osservare l'andamento della crescita a 30 e 37°C (**Figura 6**) che conferma come *C. necator* sia in grado di avere un profilo di crescita migliore in autotrofia a 30°C (Zhila et al. 2021). Oltre alla temperatura di crescita, sono state misurate le percentuali di PHB nel peso secco delle colture con la miscela dei gas (**Figura 6**) per osservare le differenze di produzione di PHB.

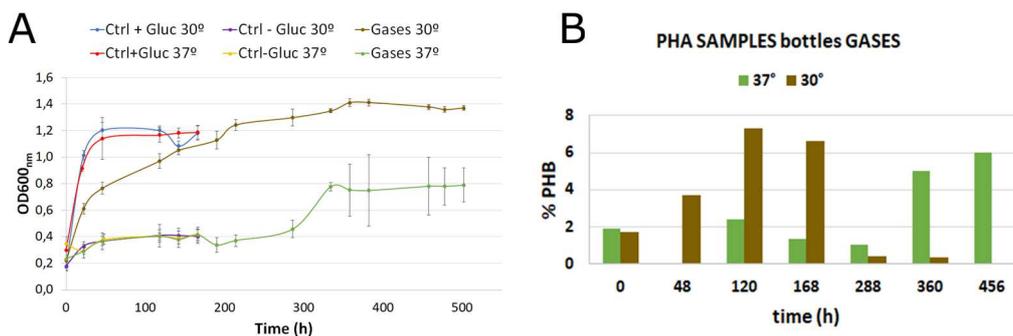


Figura 6. (a) Valori medi di OD_{600nm}, con le relative deviazioni standard, comparando la crescita cellulare nel tempo a 30° e a 37°C. (b) Percentuali di PHB prodotte a 30°C e 37°C nel corso dell'esperimento dalle colture n°3.

Sia a 30°C che a 37°C i controlli con e senza glucosio danno risultati simili: le curve di crescita delle rispettive serie a diverse temperature si sovrappongono (**Figura 6**). Questa informazione ottenuta dal grafico dimostra come la temperatura non influenzi la duplicazione cellulare quando *C. necator* è in eterotrofia se i nutrienti come il glucosio sono disponibili nel mezzo di coltura.

Il secondo risultato ricavato dall'esperimento (**Figura 6**) quantifica la percentuale di PHB intracellulare durante il corso dell'esperimento campionando ogni 24h due colture, ciascuna proveniente dai replicati "gases" delle colture autotrofiche a 30°C e a 37°C. Nel grafico la percentuale di PHB cresce rapidamente nelle colture

in autotrofia a 30°C nella prima metà dell'esperimento fino a 168 h (6-7%), per poi diminuire nei giorni successivi. Le colture in autotrofia a 37°C invece danno valori percentuali di PHB molto bassi (1-2%) nella fase iniziale, ma cominciano ad aumentare nella fase tardiva dell'esperimento raggiungendo valori intorno al 5-6% (colonne in verde).

La percentuale massima di PHB raggiunta nelle due condizioni di temperatura è stata simile, ma la produzione è avvenuta in fasi diverse della crescita in autotrofia. Si può notare anche che l'aumento di PHB nella serie a 37°C coincide con un aumento dell'OD che avviene a circa 300 ore. Non è chiaro cosa possa aver determinato questo aumento. In letteratura, gli esperimenti sulla crescita in autotrofia sono in genere condotti a 30°C, di conseguenza questa condizione di temperatura è stata avvalorata come la più efficiente per poter stimolare la crescita autotrofica di *C.necator* (Tanaka et al. 1995; Yu 2018).

Valutazione della potenziale tossicità del metano

Nella seconda serie di esperimenti si è voluto verificare la capacità di *C.necator* di crescere in autotrofia in presenza di biogas, di una miscela di gas sintetica [H₂:O₂:CO₂], e in presenza di diversi volumi di metano nello spazio di testa (20 e 40 mL). Sono stati misurati i valori di OD di tutte le colture in autotrofia che, al termine dell'esperimento, raggiungono più o meno lo stesso valore finale (2,0-2,2). Questo dato è utile perché dimostra come *C. necator* riesca a crescere costantemente anche in presenza di alte concentrazioni di metano e in presenza di biogas. La possibilità di poter allestire una coltura ad alte concentrazioni di metano è significativa se si ragiona in prospettiva su un processo di *upgrading*. In particolare indica che il batterio, in presenza di idrogeno e ossigeno, sarà in grado di continuare a fissare la CO₂, permettendo di ottenere il biometano alle concentrazioni desiderate (> 95% CH₄). In genere, l'*upgrading* biologico è solitamente svolto con microbi anaerobici che in presenza di idrogeno convertono la CO₂ in metano (Lai et al. 2021). Non esistono molti dati sulla tolleranza al metano di specie microbiche aerobiche. Pertanto, i risultati del presente lavoro sono estremamente rilevanti da un punto di vista biotecnologico.

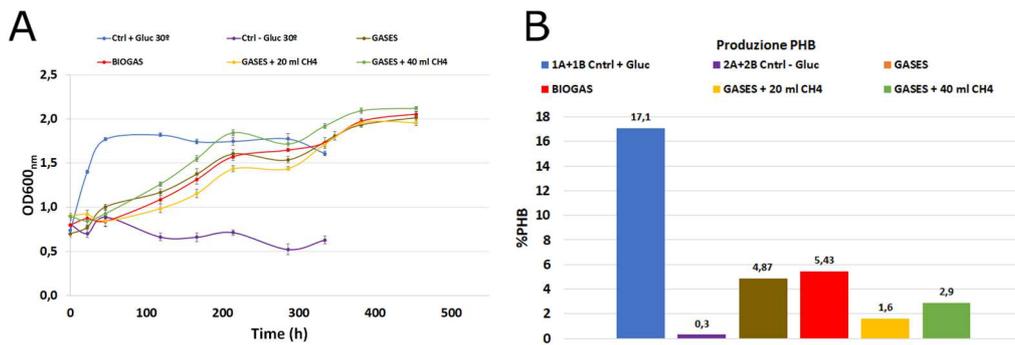


Figura 7. (a) Le curve della densità ottica delle colture nel corso dell'esperimento con le relative deviazioni standard. **(b)** La produzione di PHB da ciascuna serie di colture. Nell'asse delle ordinate i risultati sono riportati in percentuale di PHB dalla CDW. I valori ottenuti sono stati ricavati dalla media aritmetica delle repliche.

Le percentuali di PHB hanno dato risultati attesi: nel controllo con glucosio si è ottenuto il valore percentuale di PHB più alto perché *C. necator* lo ha potuto utilizzare come fonte carboniosa per la crescita in eterotrofia (**Figura 7**). Nel controllo in assenza di glucosio, il batterio non ha alcuna fonte di carbonio e coerentemente la percentuale di PHB è praticamente nulla. Le colonne appartenenti alle altre colture con le diverse percentuali di gas dimostrano come *C. necator* riesca a mantenere attiva la produzione di PHB. Le percentuali ottenute sono piuttosto basse (dall'1% al 5%), in accordo col fatto che non sono stati applicati stress che stimolassero un forte accumulo di PHB.

Valutazione degli effetti della limitazione di ossigeno

Le colture del terzo set di esperimenti sono state fatte crescere a 30° per ottimizzare la crescita di *C. necator* in autotrofia (**Figura 8**). Il controllo con glucosio raggiunge la fase stazionaria a circa 100 h dall'inizio dell'esperimento. Le altre 3 curve raggiungono il valore massimo di OD del controllo seppur con tempi più dilatati. La curva delle colture cresciute con la composizione di metano al 50% ha un andamento lievemente inferiore rispetto alle altre. Tutte le colture in autotrofia riescono comunque a raggiungere e superare il valore massimo di OD del controllo.

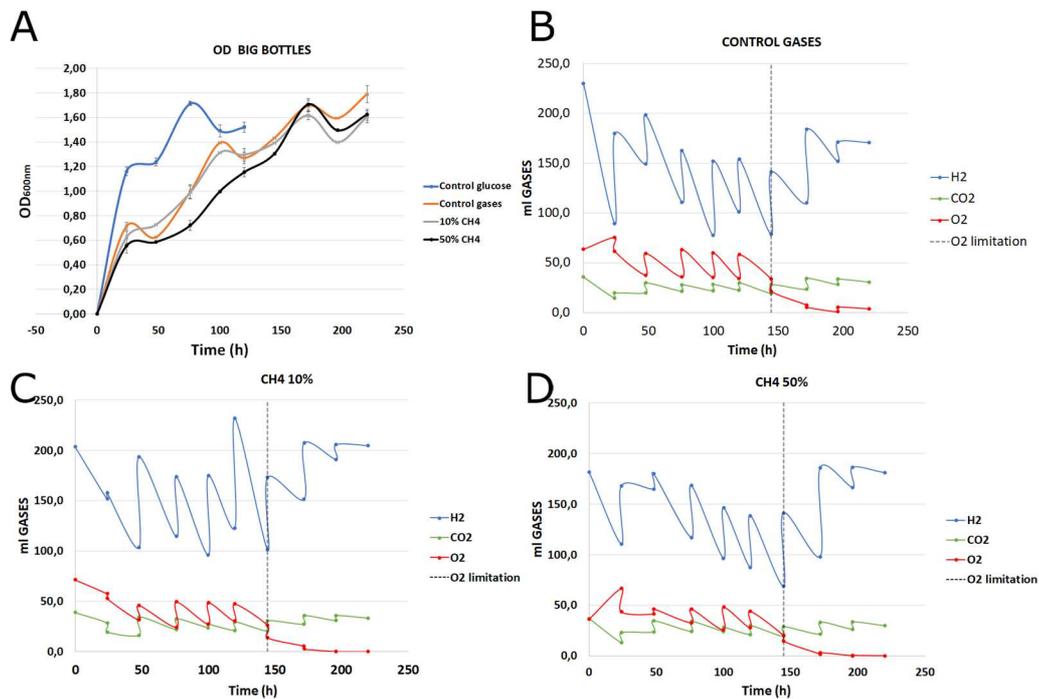


Figura 8. Andamento dell'OD_{600nm} in funzione del tempo (a) e (b) composizione dei gas nel tempo. Le linee continue mostrate nel grafico rappresentano i volumi in mL dei gas nei replicati della serie "CONTROL GASES". La linea tratteggiata evidenzia l'inizio della fase di stress. Il volume dei gas in mL all'interno delle colture CH₄ 10% (c) e CH₄ 50% (d) nel corso del tempo. La linea nera tratteggiata raffigura l'inizio della limitazione di ossigeno.

I risultati confermano la capacità di *C. necator* di crescere in autotrofia consumando l'anidride carbonica, l'ossigeno e l'idrogeno nello spazio di testa. Un altro dato utile per studiare il metabolismo di *C. necator* in batch è la quantità di PHB prodotta dalle colture. Nella serie di replicati "CONTROL GASES" (Figura 8) possiamo osservare una panoramica della variazione della concentrazione dei gas dentro le colture. La prima cosa che possiamo riscontrare è la marcata e frequente variazione della concentrazione dei gas nel corso dell'esperimento. Mentre l'idrogeno e l'ossigeno calano rispettivamente del 5-10% e del 3-4%, l'anidride carbonica cala lievemente ma con ritmo costante nell'arco delle 24 ore. Si può notare come il consumo dei gas del batterio più o meno rispecchia questa stechiometria $[21.36\text{H}_2 + 6.21\text{O}_2 + 4.09\text{CO}_2 + 0.76\text{NH}_4^+]$ pubblicata in letteratura (Ishizaki e Tanaka 1990; Islam Mozumder et al. 2015). Questa rapida variazione delle percentuali misurate accerta l'attività metabolica di *C. necator* nel saper utilizzare i gas presenti nello spazio di testa quando si sciolgono nel medium di coltura.

Al giorno 7 dall'inizio della crescita viene interrotto l'approvvigionamento di ossigeno, al fine di indurre uno stress metabolico che ha il proposito di causare un

aumento di produzione del PHB nel citoplasma della cellula (Islam Mozumder et al. 2015). Questo accumulo di PHB indotto mira a rendere disponibile a *C. necator* una fonte di energia di riserva per sopravvivere allo stress. Subito dopo l'inizio dello stress si osserva il consumo dell'ossigeno residuo. Per quanto riguarda l'idrogeno la sua concentrazione continua a diminuire nelle prime 24 h dall'inizio dello stress insieme al consumo dell'ossigeno, alimentando il metabolismo in autotrofia. Nelle ore successive la concentrazione di ossigeno raggiunge lo zero, e conseguentemente il consumo di idrogeno e CO₂ rallenta costantemente fino alla fine dell'esperimento.

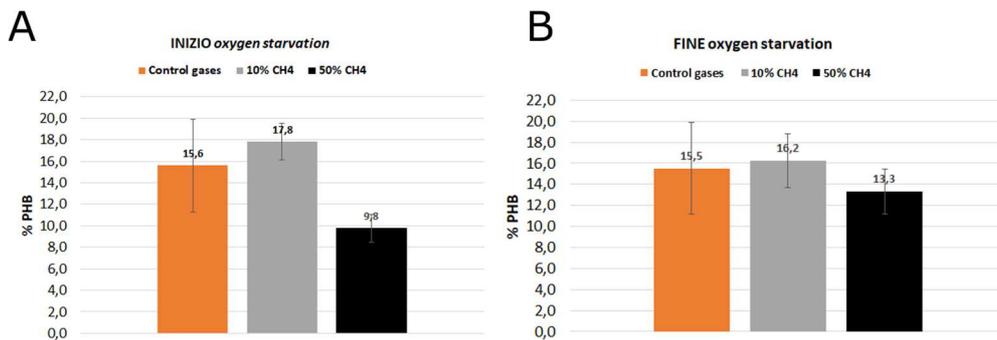


Figura 9. Percentuali di PHB ottenute all'inizio (a) e alla fine della starvation (b) dopo 3 giorni di stress.

Gli effetti della limitazione di ossigeno (**Figura 9**) non hanno dato un aumento di produzione del PHB come previsto, con l'esclusione della serie in cui viene testata la presenza di metano al 50% e che subisce un aumento del 3% nell'arco delle 72h. Si nota come le deviazioni standard, in particolare nei replicati relativi ai campioni in cui vengono testati i gas sono molto alte. Per avere un quadro completo della produzione di PHB (**Figura 10**) vengono rappresentate per ogni singola coltura le percentuali di PHB prima e dopo l'induzione dello stress.

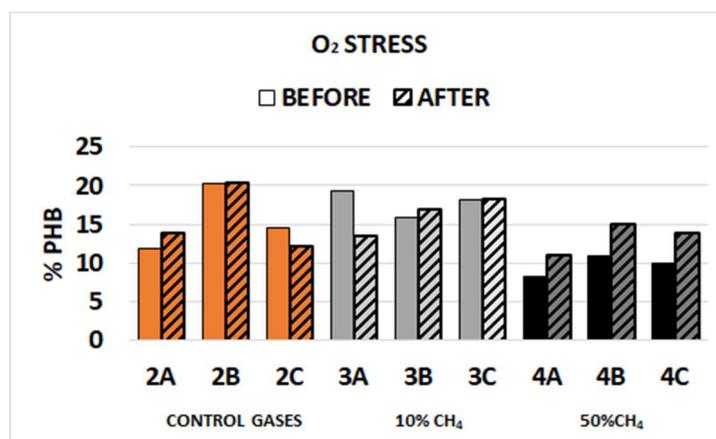


Figura 10. Percentuali di PHB per ogni singola coltura. Le colonne colorate mostrano la percentuale di PHB prima e dopo lo stress.

Nelle prime due condizioni ('control gases' e '10% CH₄') una coltura diminuisce la sua percentuale di PHB alterando i risultati dello stress; soltanto nell'ultima condizione tutti e 3 i replicati manifestano un aumento del PHB citoplasmatico. Invece che ottenere un marcato incremento di PHB come presente in letteratura (Tanaka et al. 1995; Tang et al. 2020) la privazione di ossigeno non ha portato ai risultati previsti: il motivo di questo risultato potrebbe essere dovuto ad un limitato discioglimento della CO₂ all'interno delle colture durante lo stress oppure la diminuzione dell'ossigeno potrebbe essere stata talmente limitante da non permettere a *C.necator* di metabolizzare l'anidride carbonica per il PHB. Il motivo rimane comunque da approfondire negli esperimenti futuri.

Produttività in un sistema di fermentatore *fed-batch*

Con l'utilizzo del fermentatore *fed-batch* si vuole massimizzare la crescita di *C.necator* e la produzione del PHB. Nell'esperimento sono stati raggiunti livelli di OD molto alti (**Figura 11**), di quasi 3 volte superiori ai valori ottenuti dagli esperimenti in *batch* fatte in precedenza e anche le percentuali di PHB nel peso secco superano i valori ottenuti precedentemente di ben 10 volte (Li e Wilkins 2020). Tra gli aspetti più vantaggiosi riscontrati con l'utilizzo del fermentatore ci sono la rapidità con la quale la coltura batterica è cresciuta e le percentuali di PHB ottenute: di fatto la coltura ha conseguito elevati valori di OD, raggiungendo un valore di 4 nelle prime 48h e questo dato è dovuto ad un miglior controllo dei parametri di crescita con il supporto dei sensori dell'ossigeno e della temperatura nel fermentatore.

Il controllo del livello di ossigeno ha permesso di capire quando era necessario rifornire ossigeno al sistema, permettendo di prolungare l'esperimento. La curva dell'OD nel fermentatore ha un tasso di crescita iniziale molto alto ma può essere confrontato con le curve OD dei controlli con glucosio allestite per colture in *batch* negli esperimenti precedenti: sia il fermentatore che i controlli con glucosio sono allestiti utilizzando medium 81 con una concentrazione 5g/L di glucosio e in tutte e due le condizioni si ha una elevata pendenza iniziale nella curva, questo perchè *C. necator* quando viene inoculato inizia ad assimilare il glucosio come substrato organico. Tuttavia, il fermentatore raggiunge livelli di OD due volte superiori a quelli ricavati dai controlli con glucosio; questo dato è riconducibile alle condizioni operative del fermentatore che, a differenza delle colture *batch*, viene costantemente monitorato.

La curva OD dopo le 48h ha ormai raggiunto la sua fase stazionaria e non è più in grado di crescere; per quanto riguarda le percentuali di PHB raggiungono il valore massimo 300h dopo dall'inizio dell'esperimento.

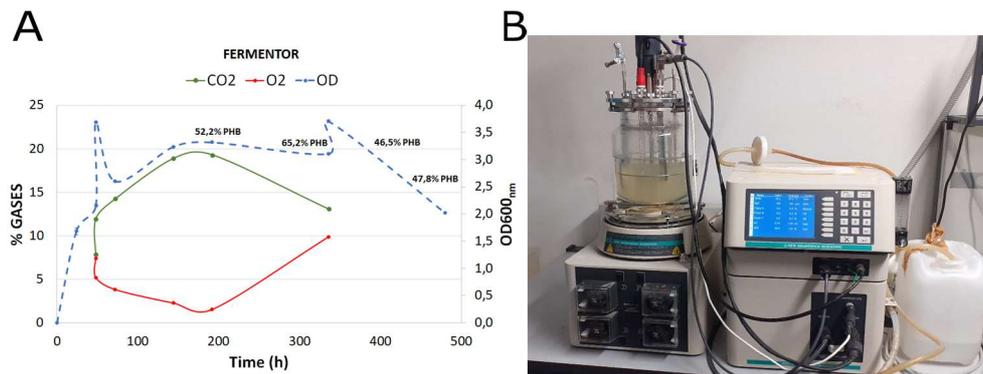


Figura 11. Valori di OD_{600nm} presenti nel fermentatore in base al tempo (a). Sulla linea dell'OD nel grafico sono messi in risalto i valori percentuali di PHB ottenuti al momento dell'estrazione. I valori di OD sono stati ottenuti facendo una diluizione 1:3. Le linee continue rappresentano l'ossigeno (linea rossa) e l'anidride carbonica (linea verde). Immagine del fermentatore durante la fase operativa (b) .

Durante la crescita, la percentuale di ossigeno nel fermentatore tende ad abbassarsi mentre la curva dell'anidride carbonica cresce perché *C. necator* sta consumando il glucosio e l'ossigeno, rilasciando anidride carbonica grazie al metabolismo in eterotrofia; di conseguenza, per ottemperare al bisogno di ossigeno della coltura sono state fatte in totale due iniezioni di 60 mL di O₂ a 72 e 168 h dall'inizio della crescita in fermentatore utilizzando una siringa. Inoltre, il mezzo di coltura a metà dell'esperimento è stato sostituito per ristabilire la concentrazione iniziale di glucosio e altri nutrienti per mantenere la crescita di *C. necator* DSM 545 nel fermentatore.

La curva dell'OD tra le 48 e le 72h subisce un calo ma dopo l'iniezione di ossigeno la coltura ricomincia a crescere quindi questa ripresa della crescita è riconducibile al primo approvvigionamento di ossigeno. Con la seconda iniezione e con il cambio di medium invece non si nota un aumento dell'OD: il fermentatore ha raggiunto il valore massimo di crescita cellulare. A 500h dall'inizio dell'esperimento la curva dell'OD comincia a calare dato che nelle fasi finali non vengono aggiunti altro medium e ossigeno. Un dato interessante è che la percentuale di PHB comincia a diminuire verso la fine dell'esperimento: questo fenomeno è riconducibile alla mancanza di glucosio nel medium di coltura che stimola *C. necator* ad utilizzare il PHB come fonte di energia.

I campioni liofilizzati estratti dal fermentatore hanno dato come migliore risultato il 65% di PHB w/w. Questa alta percentuale del polimero nei campioni, l'alto livello di OD nel fermentatore e la diminuzione dell'ossigeno durante la crescita nel corso dell'esperimento dimostrano come *C. necator* DSM 545 utilizzi il glucosio come

substrato organico per sintetizzare il PHB in eterotrofia (Islam Mozumder et al. 2015). Il fermentatore ci è servito per studiare e ottenere dati preliminari per la crescita in eterotrofia; dalla letteratura si è già al corrente dei buoni risultati in autotrofia dal punto di vista di crescita cellulare e produzione del PHB anche se l'utilizzo di un fermentatore per la crescita autotrofica rivela delle problematiche di natura tecnica relativa principalmente alla dissoluzione dei gas all'interno del medium; infatti l'ausilio di un rotore per l'agitazione del medium nel fermentatore aumenta gli scambi gassosi nello spazio di testa ma non basta per poter incrementare l'efficienza di processo su scala industriale. Per ottemperare a questa necessità di massimizzare la dissoluzione dei gas sono presenti in letteratura reattori con configurazioni specifiche allo scopo come il reattore a sistema chiuso con ricircolo dei gas (Tanaka et al. 1995; Yu 2018), il reattore 'air lift' (Taga, Tanaka, e Ishizaki 1997) e il reattore con il ricircolo di liquido (Yu e Munasinghe 2018), soluzioni che danno la possibilità di reintrodurre nel sistema e recuperare i substrati sia gassosi che organici in modo da massimizzare il loro utilizzo e la resa finale del processo.

CONCLUSIONI

Attualmente, la produzione annuale di bioplastiche costituisce appena l'1% della produzione annuale di plastica nel mondo e come accennato nell'introduzione, il suo costo di produzione è 2-3 volte maggiore rispetto alle plastiche provenienti da fonti fossili (Sehgal e Gupta 2020). Un'altra prospettiva per incrementare la produzione dei PHA è utilizzare substrati a basso costo derivanti da prodotti di scarto come amido, grassi animali o olio da cucina usato (Zhang et al. 2022). Un'importante fonte di carbonio a basso costo è rappresentata dalla CO₂ proveniente da gas di scarico di diversi processi industriali, e presente in grande quantità nel biogas. Negli esperimenti descritti in questo elaborato, si è pertanto cercato di valutare i parametri di crescita e la produzione di PHB di *C. necator* per capire come potrebbe essere impiegato in un processo in cui la bioconversione di CO₂ è concomitante alla purificazione del biogas.

Gli esperimenti svolti in questo elaborato hanno innanzitutto permesso di individuare la temperatura di 30°C per la crescita in autotrofia, in cui il batterio utilizza l'idrogeno e l'ossigeno per convertire l'anidride carbonica in biomassa e

PHB. Inoltre, i risultati ottenuti dagli esperimenti attestano in primo luogo come la crescita di *C. necator* non venga influenzata negativamente dalla presenza di metano in alte concentrazioni nello spazio di testa; in secondo luogo, il batterio è in grado di crescere in autotrofia sia in presenza di miscele di gas sintetiche [H₂:O₂:CO₂:CH₄] che di biogas; questi risultati confermano la possibilità di utilizzare *C. necator* per il processo di *upgrading* del biogas.

Per quanto concerne la produzione di PHB, il batterio negli esperimenti in colture *batch* da 40mL è stato in grado di raggiungere una percentuale di PHB intracellulare massimo del 10%, mentre una volta passati ad un volume più grande di coltura (180 mL) la produzione è quasi raddoppiata raggiungendo percentuali massime del 18%. Insieme ai dati dalla produzione del PHB nel fermentatore, che ha dato la percentuale massima di PHB del 65%, si può ipotizzare un possibile utilizzo nel futuro di *C.necator* in un processo industriale con il duplice scopo di realizzare l'*upgrading* del biogas e produzione di bioplastiche per un'economia circolare sempre più forte.

Un aspetto da considerare è che il PHB viene prodotto in granuli intracellulari insolubili in acqua e perciò per poter estrarre questo polimero è essenziale lisare le cellule, e la fase di estrazione per poter essere scalabile e sostenibile deve essere economica e non deve impattare sull'ambiente; in questo elaborato sono stati utilizzati solventi organici come il cloroformio, il metanolo e l'acido benzoico che su scala industriale sono molto costosi e inquinanti se rilasciati nell'ambiente; di conseguenza, l'utilizzo di solventi *green* che sostituiscano questi solventi tossici è uno degli obiettivi per una produzione di bioplastiche su scala industriale che diminuisca i costi e l'impatto sull'ambiente, allo stesso tempo mantenendo l'efficienza di estrazione.

Alcune procedure di estrazione *green* dei PHA utilizzano tecniche di natura sia chimica che fisica, come l'utilizzo di un detergente anionico, ad esempio il sodio dodecilsolfato (SDS), l'utilizzo di CO₂ e acqua sotto forma di liquido supercritico, gli ultrasuoni, o anche metodi enzimatici (Kourmentza et al. 2017; Meneses et al. 2022; Sehgal e Gupta 2020)

Un diverso approccio per incrementare la produzione è l'ingegneria metabolica andando a modificare il metabolismo di *C. necator* utilizzando la tecnica di CRISPR-Cas9 agendo a diversi livelli come la sovraespressione del PHA *biosynthetic operon*, aumentare l'approvvigionamento di NADPH/NADH per indurre la sintesi dei PHA e inibire i *pathway* che competono la loro produzione nella cellula. (Sehgal e Gupta 2020).

La combinazione di questi approcci nella produzione industriale dei PHA rende possibile un rapido aumento nel futuro della produzione delle bioplastiche e l'approccio al processo di *upgrading* del biogas usando sistemi biologici sono le soluzioni promettenti per il futuro di fronte alla maggiore richiesta da parte dal mercato e dell'industria ad un utilizzo più consapevole delle risorse e ad un maggiore rispetto dell'ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. A., Ishizaki, Tanaka K., e Taga N. «Microbial Production of Poly- D- 3- Hydroxybutyrate from CO 2». *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, fasc. 1–2 (1 ottobre 2001): 6–12.
<https://doi.org/10.1007/s002530100775>.
2. Albuquerque, M.G.E., S. Concas, S. Bengtsson, e M.A.M. Reis. «Mixed Culture Polyhydroxyalkanoates Production from Sugar Molasses: The Use of a 2-Stage CSTR System for Culture Selection». *Bioresource Technology* 101, fasc. 18 (settembre 2010): 7112–22.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.019>.
3. Braunegg, G., B. Sonnleitner, e R. M. Lafferty. «A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly-?-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass». *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6, fasc. 1 (1978): 29–37.
<https://doi.org/10.1007/BF00500854>.
4. Cramm, Rainer. «Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia Eutropha* H16». *Microbial Physiology* 16, fasc. 1–2 (2009): 38–52.
<https://doi.org/10.1159/000142893>.
5. Das, Jewel, Harish Ravishankar, e Piet N.L. Lens. «Biological Biogas Purification: Recent Developments, Challenges and Future Prospects». *Journal of Environmental Management* 304 (febbraio 2022): 114198.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114198>.
6. Fernandez-Bunster, Guillermo, e Pamela Pavez. «Novel Production Methods of Polyhydroxyalkanoates and Their Innovative Uses in Biomedicine and Industry». *Molecules* 27, fasc. 23 (30 novembre 2022): 8351. <https://doi.org/10.3390/molecules27238351>.
7. Garcia-Gonzalez, Linsey, e Heleen De Wever. «Valorisation of CO2-Rich off-Gases to Biopolymers through Biotechnological Process». *FEMS Microbiology Letters* 364, fasc. 20 (1 novembre 2017).
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx196>.
8. Garcia-Gonzalez, Linsey, Md. Salatul Islam Mozumder, Majorie Dubreuil, Eveline I.P. Volcke, e Heleen De Wever. «Sustainable Autotrophic Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) from CO 2 Using a Two-Stage

- Cultivation System». *Catalysis Today* 257 (novembre 2015): 237–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.025>.
9. Hosseinipour, Sayed Amir, e Mehdi Mehrpooya. «Comparison of the Biogas Upgrading Methods as a Transportation Fuel». *Renewable Energy* 130 (gennaio 2019): 641–55.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.089>.
 10. Ishizaki, Ayaaki, e Kenji Tanaka. «Batch culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697T using recycled gas closed circuit culture system». *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69 (1990): 170–74.
 11. Islam Mozumder, Md. Salatul, Linsey Garcia-Gonzalez, Heleen De Wever, e Eveline I.P. Volcke. «Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Production from CO₂: Model Development and Process Optimization». *Biochemical Engineering Journal* 98 (giugno 2015): 107–16.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.031>.
 12. Kleihues, Laura, Oliver Lenz, Michael Bernhard, Thorsten Buhrke, e Bärbel Friedrich. «The H₂ Sensor of *Ralstonia Eutropha* Is a Member of the Subclass of Regulatory [NiFe] Hydrogenases». *Journal of Bacteriology* 182, fasc. 10 (15 maggio 2000): 2716–24.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2716-2724.2000>.
 13. Kourmentza, Constantina, Jersson Plácido, Nikolaos Venetsaneas, Anna Burniol-Figols, Cristiano Varrone, Hariklia N. Gavala, e Maria A. M. Reis. «Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production». *Bioengineering* 4, fasc. 4 (11 giugno 2017): 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>.
 14. Lai, Chun-Yu, Linjie Zhou, Zhiguo Yuan, e Jianhua Guo. «Hydrogen-Driven Microbial Biogas Upgrading: Advances, Challenges and Solutions». *Water Research* 197 (giugno 2021): 117120.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117120>.
 15. Li, Mengxing, e Mark Wilkins. «Fed-Batch Cultivation and Adding Supplements to Increase Yields of Polyhydroxybutyrate Production by *Cupriavidus Necator* from Corn Stover Alkaline Pretreatment Liquor». *Bioresource Technology* 299 (marzo 2020): 122676.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122676>.

16. Lopar, Markan, Ivna Vrana Špoljarić, Nikolina Cepanec, Martin Koller, Gerhart Braunegg, e Predrag Horvat. «Study of Metabolic Network of *Cupriavidus Necator* DSM 545 Growing on Glycerol by Applying Elementary Flux Modes and Yield Space Analysis». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, fasc. 6 (1 giugno 2014): 913–30. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1439-y>.
17. Lu, Jingnan, Ryan C. Tappel, e Christopher T. Nomura. «Mini-Review: Biosynthesis of Poly(Hydroxyalkanoates)». *Polymer Reviews* 49, fasc. 3 (5 agosto 2009): 226–48. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>.
18. McAdam, Blaithín, Margaret Brennan Fournet, Paul McDonald, e Marija Mojicevic. «Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics». *Polymers* 12, fasc. 12 (4 dicembre 2020): 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>.
19. Meneses, Liane, Asiyah Esmail, Mariana Matos, Chantal Sevrin, Christian Grandfils, Susana Barreiros, Maria A. M. Reis, Filomena Freitas, e Alexandre Paiva. «Subcritical Water as a Pre-Treatment of Mixed Microbial Biomass for the Extraction of Polyhydroxyalkanoates». *Bioengineering* 9, fasc. 7 (8 luglio 2022): 302. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9070302>.
20. Miyahara, Yuki, Chih-Ting Wang, Manami Ishii-Hyakutake, e Takeharu Tsuge. «Continuous Supply of Non-Combustible Gas Mixture for Safe Autotrophic Culture to Produce Polyhydroxyalkanoate by Hydrogen-Oxidizing Bacteria». *Bioengineering* 9, fasc. 10 (20 ottobre 2022): 586. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9100586>.
21. Raberg, Matthias, Katja Peplinski, Silvia Heiss, Armin Ehrenreich, Birgit Voigt, Christina Döring, Mechthild Bömeke, Michael Hecker, e Alexander Steinbüchel. «Proteomic and Transcriptomic Elucidation of the Mutant *Ralstonia Eutropha* G⁺ 1 with Regard to Glucose Utilization». *Applied and Environmental Microbiology* 77, fasc. 6 (15 marzo 2011): 2058–70. <https://doi.org/10.1128/AEM.02015-10>.
22. Schäfer, Caspar, Bärbel Friedrich, e Oliver Lenz. «Novel, Oxygen-Insensitive Group 5 [NiFe]-Hydrogenase in *Ralstonia Eutropha*». *Applied*

- and Environmental Microbiology* 79, fasc. 17 (settembre 2013): 5137–45.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01576-13>.
23. Sehgal, Rutika, e Reena Gupta. «Polyhydroxyalkanoate and Its Efficient Production: An Eco-Friendly Approach towards Development». *3 Biotech* 10, fasc. 12 (dicembre 2020): 549. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02550-5>.
24. Sohn, Yu Jung, Jina Son, Seo Young Jo, Se Young Park, Jee In Yoo, Kei-Anne Baritugo, Jeong Geol Na, et al. «Chemoautotroph *Cupriavidus Necator* as a Potential Game-Changer for Global Warming and Plastic Waste Problem: A Review». *Bioresource Technology* 340 (novembre 2021): 125693. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125693>.
25. Taga, Naohiko, Kenji Tanaka, e Ayaaki Ishizaki. «Effects of Rheological Change by Addition of Carboxymethylcellulose in Culture Media of an Air-Lift Fermentor on Poly-D-3-Hydroxybutyric Acid Productivity in Autotrophic Culture of Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Alcaligenes Eutrophus*». *Biotechnology and Bioengineering* 53, fasc. 5 (5 marzo 1997): 529–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970305\)53:5<529::AID-BIT11>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970305)53:5<529::AID-BIT11>3.0.CO;2-B).
26. Tanaka, Kenji, Ayaaki Ishizaki, Toshihisa Kanamaru, e Takeharu Kawano. «Production of Poly(D-3-Hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by High Cell Density Autotrophic Cultivation Of *Alcaligenes Eutrophus*». *Biotechnology and Bioengineering* 45, fasc. 3 (5 febbraio 1995): 268–75. <https://doi.org/10.1002/bit.260450312>.
27. Tang, Ruohao, Caihong Weng, Xiaowei Peng, e Yejun Han. «Metabolic Engineering of *Cupriavidus Necator* H16 for Improved Chemoautotrophic Growth and PHB Production under Oxygen-Limiting Conditions». *Metabolic Engineering* 61 (settembre 2020): 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.04.009>.
28. Yu, Jian. «Fixation of Carbon Dioxide by a Hydrogen-Oxidizing Bacterium for Value-Added Products». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34, fasc. 7 (luglio 2018): 89. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2473-0>.
29. Yu, Jian, e Pradeep Munasinghe. «Gas Fermentation Enhancement for

Chemolithotrophic Growth of *Cupriavidus Necator* on Carbon Dioxide». *Fermentation* 4, fasc. 3 (9 agosto 2018): 63.

<https://doi.org/10.3390/fermentation4030063>.

30. Zhang, Le, Zicheng Jiang, To-Hung Tsui, Kai-Chee Loh, Yanjun Dai, e Yen Wah Tong. «A Review on Enhancing *Cupriavidus Necator* Fermentation for Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10 (19 luglio 2022): 946085. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946085>.

31. Zhila, Natalia O., Kristina Yu. Sapozhnikova, Evgeniy G. Kiselev, Alexander D. Vasiliev, Ivan V. Nemtsev, Ekaterina I. Shishatskaya, e Tatiana G. Volova. «Properties of Degradable Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Synthesized by a New Strain, *Cupriavidus Necator* IBP/SFU-1, from Various Carbon Sources». *Polymers* 13, fasc. 18 (17 settembre 2021): 3142. <https://doi.org/10.3390/polym13183142>.