

Serie Energia

ETANOLO DA BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE

Produzione di etanolo da paglia di grano
mediante pretrattamento di *steam explosion*,
idrolisi enzimatica e fermentazione

ESMERALDA RICCI, EGIDIO VIOLA, FRANCESCO ZIMBARDI, GIACOBBE BRACCIO

ENEA - Divisione Fonti Rinnovabili di Energia
Centro Ricerche Trisaia, Pollicoro (MT)

DANIELA CUNA
FAUCITANO s.r.l., Milano

RT/ERG/2001/5

.. 33 / 16



ENTE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E L'AMBIENTE

Serie Energia

ETANOLO DA BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE

Produzione di etanolo da paglia di grano
mediante pretrattamento di *steam explosion*,
idrolisi enzimatica e fermentazione

ESMERALDA RICCI, EGIDIO VIOLA, FRANCESCO ZIMBARDI, GIACOBBE BRACCIO

ENEA - Divisione Fonti Rinnovabili di Energia
Centro Ricerche Trisaia, Policoro (MT)

DANIELA CUNA

FAUCITANO s.r.l., Milano

RT/ERG/2001/5

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Ente.

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily those of ENEA.

**PLEASE BE AWARE THAT
ALL OF THE MISSING PAGES IN THIS DOCUMENT
WERE ORIGINALLY BLANK**

ETANOLO DA BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE

Riassunto

Si riportano i risultati di un'attività di ricerca finalizzata all'ottimizzazione del processo di produzione di etanolo da paglia di grano.

Il processo esaminato consta di un pretrattamento mediante *steam explosion* della paglia, seguito da idrolisi enzimatica della cellulosa e fermentazione del glucosio ottenuto.

Per effettuare l'idrolisi sono stati utilizzati due preparati enzimatici disponibili commercialmente, costituiti da β -glucosidasi, *endo*-glucanasi ed *exo*-glucanasi.

Per la fermentazione del glucosio negli idrolizzati è stato impiegato il lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

È stata raggiunta un'efficienza massima di *idrolisi* del 97% utilizzando paglia pretrattata a 220°C per 3 minuti e un rapporto enzima/substrato del 4%.

Per ottenere la *fermentazione* degli idrolizzati è stato necessario lavare con acqua la paglia dopo il trattamento di *steam explosion*, ciò allo scopo di allontanare i prodotti di degradazione della biomassa che hanno un effetto inibente sulla bioconversione. Alle condizioni ottimali, si è raggiunta una resa di conversione del glucosio in etanolo pari al 95%.

Globalmente, nel processo di saccarificazione e fermentazione simultanea è stata raggiunta una conversione del 92%, che corrisponde alla produzione di circa 170 grammi di etanolo per chilo di materiale esplosivo.

Parole chiave: bioetanolo, *steam explosion*, idrolisi, fermentazione.

ETHANOL FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASSES

Abstract

In this report are presented results achieved on the process optimisation of bioethanol production from wheat straw, carried out within the ENEA's project of biomass exploitation for renewable energy.

The process consists of three main steps: 1) biomass pretreatment by means of steam explosion; 2) enzymatic hydrolysis of the cellulose fraction; 3) fermentation of glucose.

To perform the hydrolysis step, two commercial enzymatic mixtures have been employed, mainly composed by β -glucosidase (cellobiase), endo-glucanase and exo-glucanase.

*The ethanologenic yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used to ferment the glucose in the hydrolyzates.*

Hydrolysis yield of 97% has been obtained with steam exploded wheat straw treated at 220°C for 3 minutes and an enzyme to substrate ratio of 4%.

It has been pointed out the necessity of washing with water the pretreated wheat straw, in order to remove the biomass degradation products, which have shown an inhibition effect on the yeast. At the best process conditions, a fermentation yield of 95% has been achieved.

In the Simultaneous Saccharification and Fermentation process, a global conversion of 92% has been obtained, which corresponds to the production of about 170 grams of ethanol per kilogram of exploded straw.

Key words: bioethanol, *steam explosion*, hydrolysis, fermentation.

INDICE

1. **IL BIOETANOLO COME ALTERNATIVA AI COMBUSTIBILI CONVENZIONALI**
 - 1.2 CARATTERISTICHE E VANTAGGI DELL'ETANOLO
 - 1.3 CENNO AL QUADRO INTERNAZIONALE
 - 1.4 BIOMASSE ED ETANOLO

 2. **IL PROCESSO DI PRODUZIONE DI ETANOLO DA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA: IDROLISI E FERMENTAZIONE**
 - 2.1 PRETRATTAMENTO DELLA BIOMASSA
 - 2.1.1. *Pretrattamenti di tipo chimico*
 - 2.1.2. *Pretrattamenti di tipo biologico*
 - 2.1.3. *Pretrattamenti di tipo meccanico e termo-meccanico*
 - 2.1.4. *Steam explosion*

 3. **IDROLISI E FERMENTAZIONE SIMULTANEA**
 - 3.1 GLI ENZIMI
 - 3.2 LA FERMENTAZIONE
 - 3.3 SCELTA DELLE CONDIZIONI OPERATIVE PER LA BIOCONVERSIONE
 - 3.3.1 *Temperatura ottimale di processo*
 - 3.3.2 *Detossificazione*
 - 3.3.3 *Carico enzimatico e severità del pretrattamento*
 - 3.3.3 *Effetto della scala sulla SSF*

 4. **CONCLUSIONI**

 5. **APPENDICE SPERIMENTALE**
 - 5.1 METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE
 - 5.3 METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE SOTTOPOSTE A SE
 - 5.4 METODI PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI E DELL'ETANOLO
 - 5.5 METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI PREPARATI ENZIMATICI
 - 5.6 IDROLISI E FERMENTAZIONE

 6. **RIFERIMENTI**
 7. **RINGRAZIAMENTI**
-

1. IL BIOETANOLO COME ALTERNATIVA AI COMBUSTIBILI CONVENZIONALI

L'etanolo è oggetto di un interesse, che potremmo definire 'ciclico', per la possibilità di essere impiegato come combustibile e come materia prima nell'industria chimica, in sostituzione di vari derivati petroliferi.

In specifici contesti socio-economici questa possibilità è stata ampiamente dimostrata sia sul piano tecnico sia su quello economico mentre, più in generale, l'etanolo sta conquistando nuove importanti nicchie di mercato sostituendo composti chimici soggetti a restrizioni di tipo legislativo quali il piombo tetraetile ed il MTBE (*Metil-Ter. Butil-Etere*) entrambi impiegati come additivi nelle benzine.

La ciclicità di tale interesse, economico e tecnico-scientifico, è da correlare alle fluttuazioni del prezzo delle materie prime sui mercati internazionali.

Alte quotazioni del petrolio possono rendere conveniente la produzione di etanolo dalle biomasse, mentre un abbassamento del prezzo dello zucchero e dei cereali possono indurre a dirottare parte dell'eccedenza verso la produzione di etanolo.

Oltre a questi fattori squisitamente economici, ci sono considerazioni di natura politica sulla dipendenza di molti Paesi industrializzati dai Paesi produttori di petrolio, e che spingono i primi a tener alta l'attenzione verso fonti energetiche alternative.

Più recentemente, la consapevolezza dei danni ambientali causati dallo sfruttamento intensivo dei combustibili fossili ha spinto la Comunità Internazionale e i singoli Paesi a riconsiderare la propria politica energetica ponendo dei limiti alle immissioni dei 'gas serra'. Tali limiti possono essere rispettati sia aumentando l'efficienza delle tecnologie che incrementando la quota di energia derivante da fonti energetiche.

I singoli Stati hanno via via recepito le direttive internazionali.

In Italia sono stati predisposti dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, il Programma Nazionale 'Biocombustibili' (PROBIO) e il Programma Nazionale Energia Rinnovabile da Biomasse (PNERB), al fine di promuovere la coltivazione di biomasse agro-zootecniche-forestali dedicate specificamente alla produzione di energia rinnovabile.

In più, la Legge n.448 del 23 Dicembre 1998 ha introdotto, dal 1 Gennaio 1999, una "*Tassazione sulle emissioni di anidride carbonica e misure compensative*" meglio conosciuta come *carbon tax*, imposta sui prezzi al consumo dei combustibili fossili. A partire dal 1 Gennaio 2000 parte dei proventi di tale tassa saranno utilizzati per finanziare progetti e investimenti tesi a ridurre le emissioni di CO₂, incentivare l'utilizzo di fonti energetiche rinnovabili, incluse le biomasse, e migliorare l'efficienza degli impianti convenzionali di produzione energetica.

Ci sono anche importanti novità riguardo i biocombustibili. La finanziaria prevede che possano essere commercializzate 300.000 tonnellate di biodiesel (contro le precedenti 125.000) in totale esenzione di accisa. Bioetanolo ed ETBE hanno un'accisa ridotta a 560 lire al litro contro le 1.078 della benzina.

In tale contesto le biomasse e l'etanolo possono rivestire un ruolo importante.

Lo sfruttamento delle biomasse non incide sul bilancio complessivo di gas serra poiché sono una fonte rinnovabile, inoltre, sono disponibili in pratica dappertutto.

Le biomasse possono essere trasformate in energia o prodotti energetici utilizzando tecnologie consolidate come nel caso della combustione, della fermentazione alcolica, o dell'esterificazione degli oli vegetali per ottenere biodiesel; in altri casi le tecnologie non sono disponibili su scala commerciale ma sono in avanzato livello di sperimentazione, è questo il caso della gassificazione, della pirolisi e della fermentazione di biomasse lignocellulosiche.

Non sarebbe però realistico pensare di sostituire completamente i combustibili fossili ricorrendo a fonti energetiche alternative, almeno nel breve e medio termine. Per esempio, se in Italia si volesse soddisfare il fabbisogno di benzina con etanolo prodotto da colture zuccherine o amidacee (barbabietola o mais) si dovrebbe destinare circa il 13% dell'intero territorio nazionale a questo scopo [1]. Anche solo ipotizzando di utilizzare etanolo come additivo, o come materia base per la sintesi di additivi (ETBE, *Etil-Ter.Butil-Etere*), la domanda di etanolo crescerebbe oltre la capacità produttiva nazionale.

Risulta evidente che l'ipotesi d'utilizzo di biocarburanti in alternativa ai derivati del petrolio sarà praticabile solo se sarà aumentata la produzione agricola dedicata e sarà migliorata la tecnologia di produzione, anche con l'introduzione di processi totalmente nuovi.

Riguardo a quest'ultimo punto, una delle possibilità più concrete è l'utilizzo delle parti lignocellulosiche delle piante (fusto, foglie, ecc.). Queste, spesso costituiscono solo un residuo delle coltivazioni o dei processi industriali e nel nostro Paese ammontano a circa 40 milioni di tonnellate [2]. Considerando che da 1 tonnellata di biomassa lignocellulosica possono essere prodotti 300-400 litri di etanolo, si stima che dalla messa a punto di un valido processo di trasformazione potrebbero essere resi disponibili annualmente 12-16 milioni di litri di etanolo.

Mediante lo stesso processo potrebbe essere ottenuto etanolo dai RSU, che contengono carta e diversi materiali lignocellulosici in misura del 50%, insieme ad altri carboidrati. Si stima che da una tonnellata di RSU potrebbero essere prodotti circa 250 litri di etanolo, mentre la disponibilità di RSU in Italia è di circa 26 milioni di tonnellate (dato del 1997, [3])

Da alcuni anni l'ENEA ha avviato un progetto per la valorizzazione energetica delle biomasse lignocellulosiche che comprende, tra l'altro, la messa a punto di un processo di produzione di bioetanolo su scala pilota. Il progetto è iniziato con la costruzione di una stazione sperimentale comprendente due impianti per il pretrattamento delle biomasse mediante *Steam Explosion* (uno continuo da 300 kg/h e un batch da 1 kg/ciclo), nonché laboratori analitici dedicati. Più recentemente, è stata sviluppata la sezione biotecnologia con l'acquisizione di bioreattori da banco (da 2 e 10 litri) e un impianto pilota (da 50 litri).

In questo rapporto tecnico si riportano i primi risultati ottenuti.

1.2 CARATTERISTICHE E VANTAGGI DELL'ETANOLO

Attualmente, l'etanolo è prevalentemente prodotto attraverso la fermentazione naturale di zuccheri di origine vegetale, mentre solo il 7% della produzione complessiva avviene per via sintetica da carbonio e petrolio. L'etanolo prodotto da fonti vegetali, chiamato anche bioetanolo, si propone come un buon candidato in alternativa ai combustibili convenzionali: le emissioni di CO₂ generate dalla sua combustione verrebbero, infatti, riassorbite da coltivazioni impiantate allo scopo di produrlo, contribuendo così al controllo delle emissioni

di CO₂ nell'atmosfera. Le Tabella 1 presenta alcune proprietà chimico fisiche dell'etanolo confrontate con quelle di altri tipi di carburanti.

Tabella 1 - Proprietà chimico-fisiche dell'etanolo e di alcuni carburanti

	BENZINA	MTBE	ETANOLO	BENZENE	TOLUENE
Peso molecolare, g/mole	~100	88.15	46	78.11	92.13
Gravità specifica	0.72-0.74	0.74	0.79	0.88	0.87
Temp. di ebollizione, °C	22.5-27	53.6-55.2	78.5	80.1	110.6
Solubilità in acqua, mg/L	100-200	43,000-54,300	completa	1,780	534.8

Come carburante l'etanolo può essere usato puro (E100) o miscelato con benzina in diversi rapporti: in questo caso si parla di E85, E95 o E10 quando la percentuale di etanolo nella miscela è rispettivamente 85, 95 e 10.

Come sopra accennato, l'etanolo viene impiegato anche per la produzione di ETBE che oltre ad aumentare il numero di ottano nei carburanti, apporta alla miscela combustibile una percentuale di ossigeno che rende il processo di combustione più efficiente. Il minor contenuto di idrocarburi incombusti, o parzialmente ossidati (per esempio aldeidi) comporta un minore impatto ambientale.

I principali benefici ambientali che possono essere acquisiti utilizzando etanolo, o ETBE, sono:

Riduzione del livello di ozono negli strati bassi dell'atmosfera

Molti prodotti secondari della combustione degli idrocarburi formano ozono attraverso reazioni fotochimiche; tra questi, il monossido di carbonio, gli idrocarburi incombusti, il benzene e gli ossidi di azoto. L'ozono della stratosfera ci protegge dalle radiazioni ultraviolette, ma se presente negli strati bassi (troposfera) causa problemi respiratori e danneggia le piante. L'uso di combustibili ossigenati, come l'etanolo, riduce la formazione dell'ozono in quanto i gas prodotti dalla combustione sono meno reattivi.

Riduzione dei gas serra

Anche nel caso di una perfetta combustione degli idrocarburi, i gas prodotti (CO₂, H₂O) sarebbero responsabili di un aumento dell'effetto serra dell'atmosfera.

Nelle condizioni ordinarie, l'uso di miscele bioetanolo-benzina come E85 o E10 potrebbero ridurre l'emissione di gas serra rispettivamente del 37.1% e del 3.9%.

Riduzione delle emissioni da parte di miscele di etanolo

Si è accertato che miscele di combustibili contenenti il 10% di etanolo riducono del 25-30% le emissioni di monossido di carbonio e del 6-10% di anidride carbonica.

Per quanto riguarda i composti organici volatili (VOC), si riscontra una significativa diminuzione di essi in miscele a medio-alto contenuto di etanolo.

Poiché l'etanolo non contiene zolfo anche le emissioni di anidride solforosa sono ridotte.

Benefici connessi con le coltivazioni associate alla produzione di etanolo

Il bioetanolo è prodotto da risorse rinnovabili quali colture amidacee o zuccherine.

Dal punto di vista energetico l'etanolo contiene circa 23.6 Mj/l (PCS), ma grazie all'alta efficienza di combustione e al suo credito in ottani esso può rimpiazzare 28 Mj/l di benzina. A questo bisogna aggiungere 3.9 Mj/l di energia fornita dai co-prodotti per un totale di 31.9 Mj/litro. La coltivazione del mais necessario per produrre un litro di etanolo richiede 4.9 Mj, mentre con le correnti tecnologie 14 Mj/l sono richiesti dai processi di conversione del mais in etanolo. Il favorevole rapporto energetico di circa 1,7 potrebbe aumentare significativamente col progredire delle tecnologie [4].

1.3 CENNO AL QUADRO INTERNAZIONALE

Negli anni 70' il **Brasile** intraprese a un'intensa campagna di ricerca finalizzata all'individuazione di una fonte di energia alternativa al petrolio, per rimediare al saldo negativo del bilancio nazionale causato dalle importazioni energetiche

Un sostituto ideale fu individuato nell'etanolo prodotto dalla canna da zucchero.

Nel 1975 fu lanciato un programma denominato *Programma Nazionale dell'Alcol*, o PROALCOOL, il cui obiettivo era sostituire la benzina con l'etanolo come combustibile e per tutti gli scopi industriali in genere, incentivandone la produzione.

Nel 1985, a dieci anni dall'inizio del programma, erano già stati investiti 6,5 miliardi di dollari nella produzione di circa 50 miliardi di litri di etanolo, ed erano stati creati 500.000 nuovi posti di lavoro.

A quella data, 2,5 milioni di veicoli erano alimentati a etanolo puro, mentre tutta la benzina distribuita nelle stazioni di servizio brasiliane conteneva il 20% di etanolo.

Già nel 1988, il 94% di tutte le autovetture prodotte in Brasile erano alimentate ad etanolo ottenuto dalla canna da zucchero.

Attualmente, in Brasile il 40% degli autoveicoli circola ad etanolo puro mentre la restante parte utilizza etanolo al 20% in miscela con carburanti convenzionali. Il Paese detiene ormai una tecnologia matura e le *facilities* necessarie per produrre 16 miliardi di litri di etanolo all'anno, di cui 10 costituiti da etanolo idrato (al 95% di concentrazione) che viene impiegato come combustibile tal quale, mentre i rimanenti 6 sono etanolo anidro (puro) utilizzato come additivo ossigenato e antidetonante per benzine.

Un aspetto molto positivo in un Paese ancora con gravi problemi economici sono le ricadute occupazionali: l'agro-industria dell'alcol impiega oltre un milione di addetti.

Tra l'altro, il programma PROALCOOL ha consentito di ridurre le emissioni di CO e CO₂ legate al traffico veicolare, collocando il Brasile tra gli Stati più attivi nella protezione dell'ambiente.

Anche **Canada** e **Stati Uniti** sono grandi produttori di bioetanolo.

La materia prima proviene da colture amidacee quali il mais e il grano. Negli Stati Uniti l'alcol è utilizzato nella benzina in sostituzione del piombo tetraetile (miscele fino al 10% di etanolo). Negli USA la produzione di etanolo si aggira intorno ai 6 miliardi di litri ed impiega circa 200.000 persone.

Tuttavia, l'industria dell'alcol dipende da incentivi fiscali e sussidi governativi che consentono agli imprenditori di 'rientrare' sul costo di produzione; su questo incide molto il

prezzo di mercato della materia prima, che può essere in parte recuperato (fino al 50%) dalla vendita dei sottoprodotti (olio, proteine, ecc.).

In **Europa** il bioetanolo sta riscuotendo un discreto interesse.

Il caso della **Svezia** è probabilmente il più indicativo.

In questo Paese sono devoluti investimenti notevoli alla ricerca finalizzata alla produzione di etanolo a partire da biomasse lignocellulosiche. Entro il 2002 dovrebbe entrare in attività un impianto da 30.000-50.000 m³/anno di etanolo (corrispondenti a circa 25.000-40.000 tonn/anno) e la contemporanea produzione di circa 30.000-50.000 tonn/anno di lignina come *by-product*, che può trovare impiego in impianti di potenza e teleriscaldamento urbano. Intanto, circa 350 autobus ad alcool etilico prodotto dai cereali sono già circolanti, principalmente in Stoccolma.

Fatta eccezione per la Svezia, che utilizza etanolo tal quale in miscela con la benzina o il gasolio, nel resto d'Europa il bioetanolo è utilizzato essenzialmente nella sintesi dell'ETBE in grado di sostituire i composti aromatici ed il piombo tetraetile come antidetonante.

In **Francia**, l'etanolo destinato alla produzione di ETBE è ottenuto per il 70% da barbabietola da zucchero e per il 30% da grano.

L'area agricola dedicata a queste due colture è di 30.000 ettari (dato 1999), di cui 12.000 riservati alla barbabietola; 120 milioni di litri di etanolo sono trasformati in ETBE.

In **Spagna**, il bioetanolo è ottenuto fondamentalmente da cereali quali grano e orzo; 100 milioni di litri di etanolo sono trasformati in ETBE.

In **Olanda e Italia**, sono state lanciate delle iniziative che dovrebbero portare la produzione di etanolo nel breve periodo a 30 milioni di litri/anno; anche in questo caso la sintesi dell'ETBE dovrebbe assorbire l'intera produzione.

1.4 BIOMASSE ED ETANOLO

Composizione delle Biomasse.

La natura della biomassa di partenza è importante per ipotizzare un processo di produzione di etanolo, sia in termini di costo che di complessità delle apparecchiature.

La cosa più semplice è partire da biomassa contenente già una buona quantità di zuccheri in forma monomerica che possono essere fermentati direttamente in etanolo: è il caso della canna e della barbabietola da zucchero.

Più frequentemente però gli zuccheri sono contenuti nelle biomasse sotto forma di biopolimeri.

Tra i polimeri del glucosio troviamo l'amido e la cellulosa.

-L'*amido* è contenuto nei semi dei cereali ed è costituito da catene di glucosio legato attraverso legami glucosidici di tipo α -1,4 e α -1,6. La casualità della sequenza di questi due tipi di legami rende il polimero amorfo, senza cioè struttura cristallina e di conseguenza facilmente accessibile all'attacco di enzimi capaci di demolirlo nei componenti monomerici.

-La *cellulosa* è il maggiore costituente della biomassa ligno-cellulosica (30-60% in peso) ed è costituita da catene lineari di glucosio legato attraverso legami β -1,4. L'instaurazione di

legami ad idrogeno tra le catene contribuisce alla formazione di domini cristallini che impartiscono resistenza e elasticità alle fibre vegetali.

-L'*emicellulosa* è un polimero misto corto e ramificato costituito da zuccheri a 5 atomi di carbonio (xiloso e arabinosio) e da zuccheri a 6 atomi di carbonio (glucosio, mannosio, galattosio). La natura amorfa rende il polimero facilmente idrolizzabile. L'*emicellulosa* degli *hardwood* è costituita essenzialmente da xiloso, mentre nei *softwood* prevalgono gli zuccheri a 6 atomi di carbonio [5].

. L'*emicellulosa* è presente nelle biomasse in quantità che vanno dal 10% al 40%

-La *lignina* è un polimero complesso di natura aromatica, tridimensionale e di alto PM e conferisce rigidità alla pianta 'cementando' le diverse componenti. La sua incidenza sulla massa varia dal 10% al 25%.

In Tabella 2 è riportata la composizione di alcune paglie, e la quantità di etanolo teoricamente ottenibile da esse.

Tabella 2 - Composizione di alcune paglie e quantità di etanolo derivabile.

(Fonte: Phyllis, database for biomass and waste [6])

	CENERI (%)	EMICELLULOSA (%)	CELLULOSA (%)	LIGNINA (%)	ETANOLO* kg/kg _{biomassa}
Gambi di mais	3	26	38	11	0.36
Paglia di grano	1.3	27.6	34	18	0.35
Paglia di riso	18.9	22.7	37	13.6	0.34
Paglia di avena	2.6	24.9	37.1	15.4	0.35
Paglia di segala	1.2	25.7	37.1	17.6	0.35
Paglia di orzo	7.1	44	37	11	0.46

*valore teorico ottenibile mediante i processi:

1) cellulosa → glucosio → etanolo; 2) emicellulosa → xilano → xiloso → etanolo

La Tabella 3 riporta la produzione di cereali in Italia e le relative aree coltivate.

Tabella 3 – Produzione di cereali e paglie in Italia (Fonte: FAO [7])

	PRODUZIONE (MT)	AREA COLTIVATA (HA)
grano	7,742,708	2,382,566
orzo	1,329,107	349,029
avena	346,013	143,296
segala	12,161	3,974
riso	1,362,452	220,795
mais	9,996,219	1,030,603

A fronte della produzione dei prodotti agricoli principali destinati al consumo alimentare, c'è da considerare l'enorme quantità delle paglie che costituiscono dei sottoprodotti. È proprio da queste biomasse residuali che può derivare materia prima aggiuntiva per la produzione di combustibili liquidi come l'etanolo.

Per avere un'idea della disponibilità e della quantità relativa dei sottoprodotti agricoli, De Castro et co. [8] hanno ricavato un coefficiente o indice di conversione indicante il rapporto sottoprodotto/prodotto e nel caso dei cereali ha un valore medio di circa 0.7.

Per ogni tonnellata di grano abbiamo dunque circa 700 kg di paglia (circa 600 Kg di materiale secco) corrispondenti a circa 250 litri di etanolo teorico.

2. IL PROCESSO DI PRODUZIONE DI ETANOLO DA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA: IDROLISI E FERMENTAZIONE

Nella biomassa le macrocostituenti, cellulosa, emicellulosa e lignina sono 'cementate' fra loro.

Le singole macrocostituenti hanno proprietà differenti e possono essere valorizzate solo separandole.

Per quanto riguarda lo scopo del nostro lavoro, i carboidrati, e la cellulosa in particolare, possono essere utilizzati per ottenere etanolo.

Il processo necessita che i carboidrati presenti naturalmente nella biomassa siano ridotti a zuccheri semplici. Nel caso della cellulosa, si ottiene il glucosio, mentre dall'emicellulosa si ottiene una miscela di zuccheri, tra cui lo xylosio costituisce il componente più abbondante.

La depolimerizzazione, o meglio *l'idrolisi* si può realizzare con processi di tipo chimico oppure biotecnologico.

L'idrolisi chimica si basa sull'uso di acidi forti (acido solforico e acido cloridrico), ad alta o bassa concentrazione, secondo la tipologia d'impianto. Pur essendo concettualmente semplice presenta alcuni, gravi, svantaggi dato che gli impianti devono essere costruiti in materiali speciali e, almeno in generale, l'impatto ambientale è elevato. Per esempio, nei reflui di processo basati sull'uso di acido cloridrico si ritrovano sostanze aromatiche clorurate.

L'idrolisi per via biologica si basa invece sull'azione di enzimi cellulolitici ed emicellulolitici prodotti da funghi, ed ha quindi un impatto ambientale molto basso. Per contro, questo metodo è in pratica alquanto più complesso rispetto al precedente dato che è necessario un *pretrattamento* della biomassa affinché gli enzimi possano agire efficacemente.

Una volta ottenuta la soluzione di zuccheri (*l'idrolizzato*) si procede alla fermentazione.

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (il comune lievito di birra) si è specializzato nel convertire il glucosio in etanolo con rese altissime. Anche due tipi di batteri del tipo *Zymomomas* e alcuni funghi (questi con rese e velocità molto più basse) sono in grado di operare lo stesso processo. La fermentazione degli zuccheri a cinque atomi di carbonio non è così semplice in quanto è praticabile solo utilizzando microrganismi e tecniche di fermentazione particolari; in ogni caso le rese in etanolo sono più basse (70-80% del teorico) così come le velocità di reazione e la concentrazione di etanolo raggiungibile nei brodi. In laboratorio, alcuni microrganismi ottenuti con tecniche di manipolazione genetica si sono

dimostrati in grado di fermentare sia zuccheri a sei atomi di carbonio sia a cinque (processo di *cofermentazione*); resta ancora da verificare la loro efficienza in impianti produttivi.

In Figura 1, è schematizzato il processo globale di trasformazione della cellulosa in etanolo.

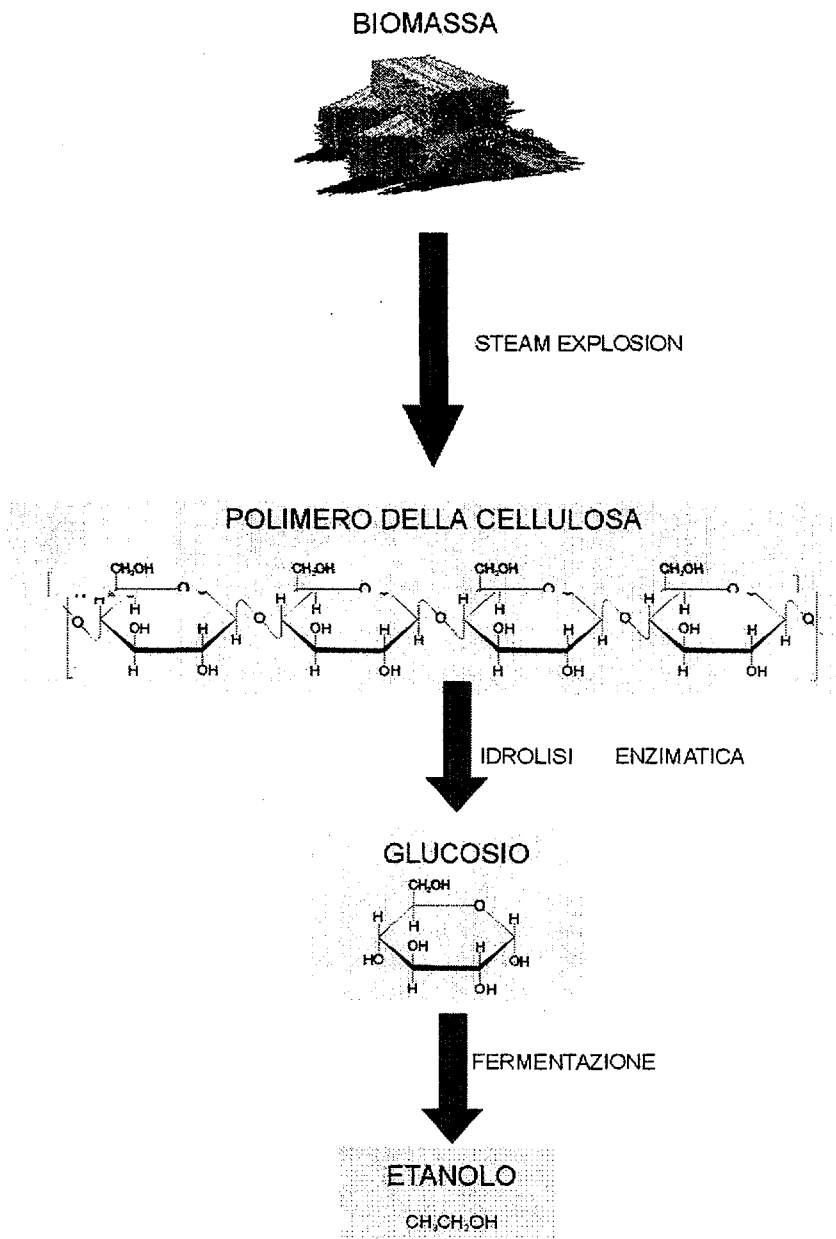


Figura 1 - Schema del processo di produzione dell'etanolo dalla cellulosa contenuta nelle biomasse: la paglia di grano è sottoposta al pretrattamento di *steam explosion* per renderla accessibile all'azione dagli enzimi cellulolitici; questi trasformano la cellulosa in glucosio, che a sua volta è metabolizzato dai microrganismi e convertito in etanolo.

2.1 PRETRATTAMENTO DELLA BIOMASSA

Se si sottoponesse un materiale lignocellulosico tal quale a idrolisi enzimatica, le rese sarebbero bassissime, intorno al 5-10%, anche ricorrendo ad un elevato rapporto Enzima/Substrato e a lunghi tempi di reazione. La ragione di questa bassa efficienza è da ricercare nelle dimensioni degli enzimi (tipicamente di 30.000-60.000 AMU) che gli impediscono di penetrare nella matrice lignocellulosica, in particolare nelle zone cristalline formate dalla cellulosa. Per migliorare l'accessibilità della biomassa è necessario uno stadio preliminare all'azione degli enzimi, che sfibri a livello microscopico il materiale.

I pretrattamenti che si sono dimostrati efficienti nel corso degli anni sono stati molti e di diversa tipologia.

Fondamentalmente possono essere suddivisi in tre gruppi:

2.1.1 *Pretrattamenti di tipo chimico*

Tra questi vi sono quelli effettuati con soluzioni diluite di acido solforico, soda, o solventi (etanolo, metanolo) in grado di rimuovere parzialmente la lignina. Si tratta di processi che comportano un elevato consumo di *chemicals*, e sono caratterizzati da un impatto ambientale elevato.

2.1.2 *Pretrattamenti di tipo biologico*

In questi tipo di pretrattamento vengono impiegati microrganismi in grado di delignificare la biomassa, in modo da "scoprire" la fibra cellulosica. Pur essendo molto efficaci, questi metodi sono poco pratici, perché richiedono lunghi tempi di permanenza della biomassa in appositi bioreattori.

2.1.3 *Pretrattamenti di tipo meccanico e termo-meccanico*

La macinatura è un esempio di trattamento meccanico, efficace ma costoso dal punto di vista energetico. Se allo sfibramento fisico (macroscopico) del materiale si accoppia l'idrolisi dei legami chimici (effetto microscopico) ne risulta un'azione sinergica molto efficace.

L'idrolisi può essere ottenuta per semplice riscaldamento alla presenza di acqua, realizzando un trattamento di tipo termo-meccanico. Purtroppo il processo non è selettivo ed insieme alla scissione dei legami chimici che porterebbero alla semplice idrolisi avvengono reazioni indesiderate, quali la pirolisi, che abbassano le rese di processo e da cui si generano sostanze inibitorie per i successivi stadi di bioconversione.

2.1.4 *Steam explosion*

Nella categoria dei trattamenti termo-meccanici può essere annoverata la *Steam Explosion*, (SE), un processo particolarmente interessante per il consumo energetico relativamente basso e per non richiedere l'uso di prodotti chimici, perché basato sull'impiego di vapor d'acqua saturo.

Dal punto di vista storico la SE deriva dai processi cartari; mentre in questi la biomassa è trattata per tempi relativamente lunghi a temperature relativamente basse, nella SE si ricorre a temperature più alte per abbreviare il tempo di lavorazione. Per esempio, nel processo *alla soda* la biomassa è tenuta per 2-4 ore a 160-180°C, mentre le condizioni di trattamento tipiche della SE variano, tipicamente, tra 1-10 minuti e 180-230° C. Un importante vantaggio derivante della maggior rapidità della SE rispetto ai processi classici, è la possibilità di operare con un reattore continuo invece che con autoclavi.

Nel caso della SE (Figura 2), alla destrutturazione della matrice lignocellulosica concorrono due azioni meccaniche, e cioè la *compressione della biomassa* (almeno nel caso del processo

continuo) e l'*istantanea decompressione*, realizzata nel passaggio dall'atmosfera di vapore saturo del reattore alle normali condizioni ambientali. Oltre a queste, opera anche un processo di *idrolisi* dei legami chimici per opera del vapor d'acqua ad alta temperatura.

Il risultato finale è quello di rendere maggiormente accessibili e reattivi i polimeri della cellulosa e della lignina e di solubilizzare la gran parte dell'emicellulosa, sotto forma di pentosani (xilosio, arabinosio ecc.). Le modificazioni morfologiche e strutturali apportate rendono il materiale lignocellulosico trattato molto interessante non solo ai fini cartari e di materiali compositi, ma anche come substrato nei processi biotecnologici.

La '*severità*' del trattamento, e quindi il grado di destrutturazione della matrice lignocellulosica, dipende dal tempo di permanenza della biomassa all'interno del reattore e dalla temperatura del vapore saturo, e viene espressa dal parametro di severità R_0 , definito dalla relazione semiempirica [9]:

$$R_0 = \frac{t}{T} \cdot 10^{\frac{T}{10}}$$

in cui t è il tempo di trattamento espresso in minuti e T è la temperatura espressa in gradi centigradi.

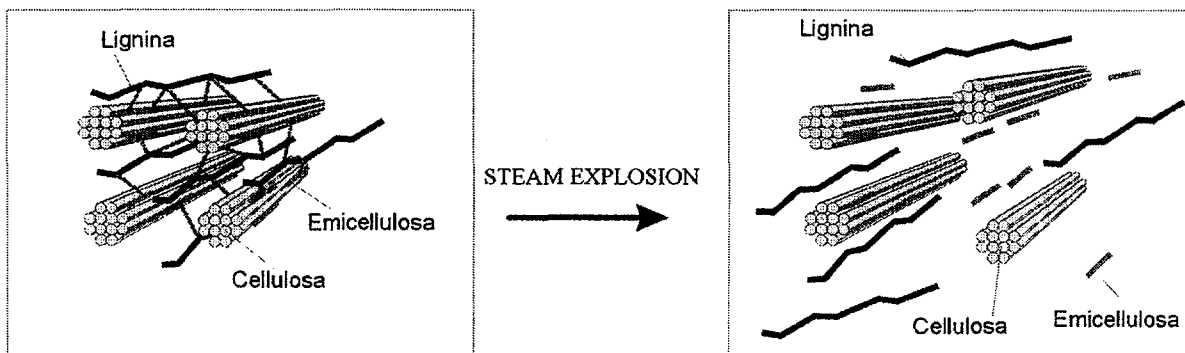


Figura 2 - Effetti del processo di steam explosion sulle fibre vegetali: la struttura lignocellulosica subisce una parziale disgregazione chimica e fisica e le macrocostituenti possono essere separate l'una dall'altra.

In Figura 3 è riportato lo schema dell'impianto continuo *STELE* (STeam Explosion LEgno), operante presso il CR ENEA della Trisaia (MT), in grado di trattare circa 300 kg/ora di biomassa. Oltre alla sezione di trattamento di SE, l'impianto è provvisto di una sezione per il trattamento del materiale *steam* esploso che è sottoposto a lavaggio con acqua o con soluzioni acquose alcaline per frazionarlo in emicellulosa, lignina e cellulosa.

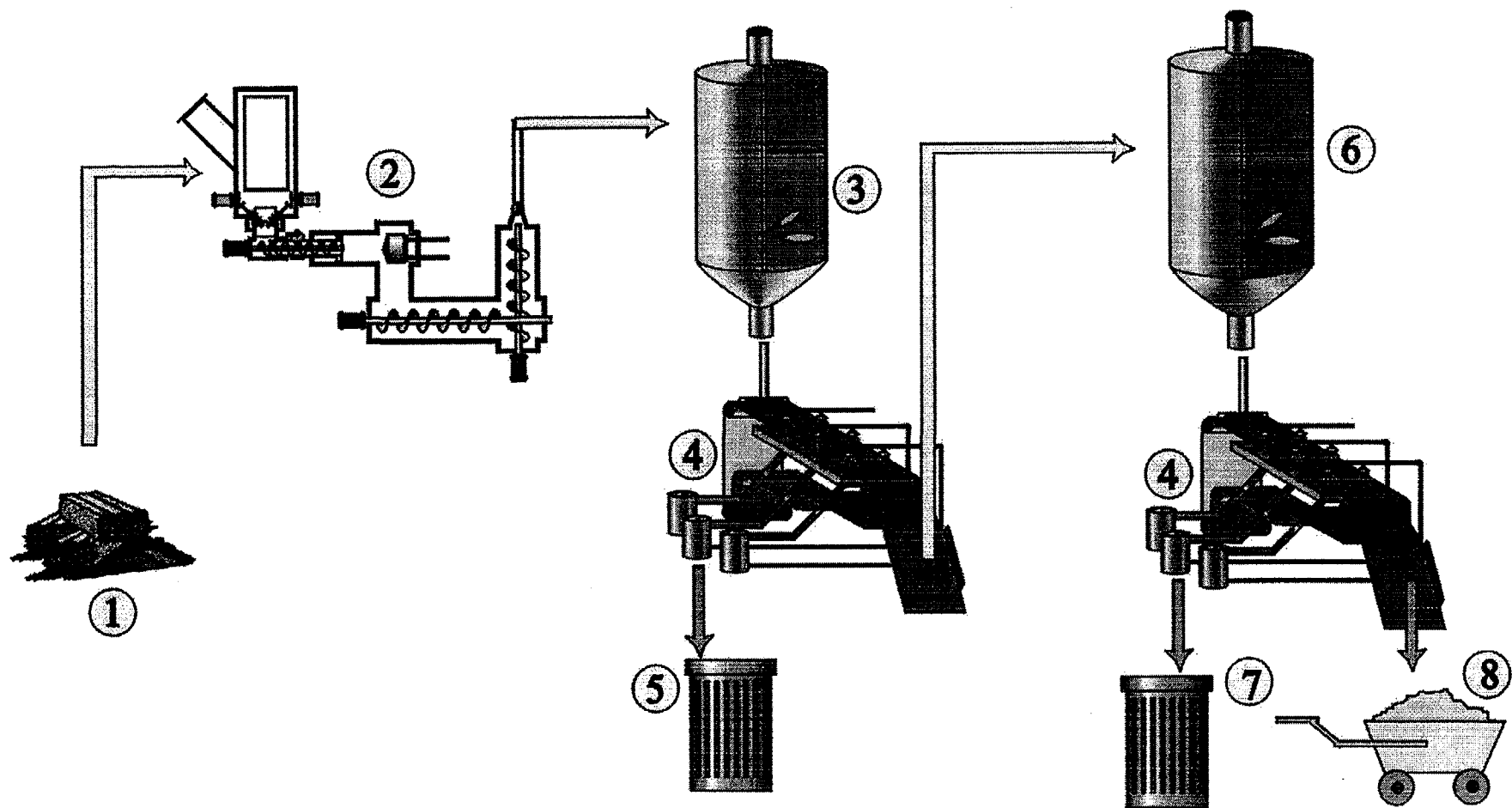


Figura 3 - Schema dell'impianto continuo STELE. La biomassa (1) umidificata al 50% è convogliata nel reattore dove entra in contatto con vapore saturo ad alta temperatura (2), quindi inviata in un estrattore (3) in cui è immessa acqua calda a 65°C, in misura tale da mantenere una sospensione al 6% di solido. Tramite un filtro a nastro (4), è effettuata la separazione dell'emicellulosa che è raccolta nella soluzione liquida (5). Il residuo solido è convogliato in una seconda sezione di estrazione (6), ove il materiale è lavato con una soluzione alcalina allo 0.5% a 90°C, ad un rapporto solido/liquido del 7%. Un secondo filtro a nastro permette di separare la lignina disciolta nella fase liquida (7) dal residuo solido, costituito prevalentemente di cellulosa (8).

La biomassa esplosa, e le diverse correnti di prodotto, sono campionate in impianto e caratterizzate per determinarne la composizione chimica.

Anche le procedure analitiche si basano sulla solubilità in soluzione acquosa di emicellulosa e lignina. L'estrazione con acqua calda del materiale esplosa consente la rimozione della frazione di emicellulosa e delle altre sostanze solubili in acqua. Il successivo trattamento del residuo solido con soda consente la separazione della cellulosa dalla lignina per solubilizzazione di quest'ultima in fase alcalina. Il recupero della lignina avviene per precipitazione in ambiente acido.

I dettagli delle metodiche sono riportati in appendice.

Per inciso, la comparazione tra l'estrazione effettuata in condizioni ottimali in laboratorio e quella effettuata con le apparecchiature dell'impianto STELE consente di ricavare l'efficienza di separazione dell'impianto:

$$efficienza_{imp} = 100 \times \frac{E_{lab} - E_{imp}}{E_{lab}}$$

(E_{lab} e E_{imp} sono il peso secco a 105°C della fase acquosa che estrae l'unità di peso di biomassa rispettivamente nella metodica di laboratorio e in condizioni di esercizio dell'impianto.)

Mediamente, l'efficienza d'estrazione realizzata in impianto è di circa l'80% rispetto a quella di laboratorio.

La paglia di grano e quella trattata mediante *steam explosion* alla severità scelta per le prove di idrolisi e fermentazione sono state analizzate determinando la percentuale di cellulosa, emicellulosa, lignina e ceneri. In Tabella 4 sono riportate le condizioni sperimentali di SE, mentre in Tabella 5 sono riportati i risultati delle analisi chimiche.

Tabella 4 – Condizioni di trattamento di SE della paglia di grano e relativo parametro di severità.

Temperatura, °C	Pressione, Mpa	Tempo, min.	log Ro
210	19	3	3.75
220	23	3	4.03
220	23	6	4.33

Per quanto riguarda la determinazione degli estrattivi nei campioni esplosi, non si è ritenuto opportuno estendere la metodica valida per la biomassa non trattata: tale procedura provocherebbe, infatti, negli esplosi l'estrazione degli zuccheri in forma oligo-monomerica rilasciati in seguito al pretrattamento, inficiando l'attendibilità delle analisi successive e della composizione percentuale.

Tabella 5 - Composizione percentuale della paglia di grano e dei campioni di paglia trattata mediante SE.

(Il contenuto di polisaccaridi è stato ottenuto considerando la stechiometria di polimerizzazione degli zuccheri monomeri ed è riportato in grassetto).

	Paglia di grano	Esploso logRo 3.75		Esploso logRo 4.03	Esploso logRo 4.33
		<i>Non lavato</i>	<i>Lavato</i>	<i>Lavato</i>	<i>Lavato</i>
Estrattivi	10.4	-	-	-	-
Esosani	31.0	31.6	39.1	32.4	33.3
Glucosio	30.2	30.6	42.0	33.2	35.4
Galattosio	0.8	0.6	0.2	-	-
Cellobiosio	3.3	3.7	1.2	2.6	1.5
Pentosani	28.9	12.3	3.8	1.0	0.6
Xilosio	30.4	13.5	4.2	1.1	0.7
Arabinosio	2.4	0.4	0.1	-	-
Lignina	22.0	33.7	42.4	49.7	53.6
Solubile	2.5	4.5	2.1	2.7	3.5
Insolubile	19.5	29.2	40.3	47.0	50.1
Ceneri	8.1	9.7	9.4	8.0	7.7

Dai dati riportati in Tabella 5 si possono trarre alcune considerazioni:

1. la perdita di emicellulosa nel materiale esploso è dovuta alla degradazione dei pentosani provocata dal pretrattamento. Inoltre, negli esplosi lavati l'efficienza del lavaggio cresce all'aumentare del parametro di severità;
2. il contenuto percentuale di lignina nei campioni di esploso aumenta con il parametro di severità. Questo potrebbe dipendere dalla maggiore resistenza della lignina alla degradazione rispetto alle altre componenti;
3. il contenuto di cenere è più elevato nella paglia trattata che in quella iniziale ed inoltre, nei campioni lavati, la percentuale in ceneri diminuisce con la severità. Il primo dato può essere spiegato considerando che le componenti organiche diminuiscono in seguito a fenomeni di pirolisi che generano sostanze volatili tra cui CO₂ e H₂O, mentre il contenuto di inorganici rimane invariato. L'aumento delle ceneri è quindi percentuale, non assoluto. Il secondo risultato sperimentale potrebbe indicare che la solubilità dei componenti inorganici aumenta con la severità del processo, poiché questi ultimi sono allontanati dalle acque di lavaggio.

3. IDROLISI E FERMENTAZIONE SIMULTANEA

3.1 GLI ENZIMI

La trasformazione della cellulosa in glucosio avviene per mezzo di una miscela di enzimi, denominata cellulasi.

Le attività enzimatiche che la compongono sono solitamente distinte nelle classi C1 e Cx. Le cellulasi C1 agiscono sulla cellulosa cristallina liberando le singole catene di polimero; queste

ultime sono a loro volta idrolizzate dalle cellulasi di classe Cx costituite da β -1,4 *endo* ed *eso*-glucosidasi; le prime intervengono sulla catena con un meccanismo di tipo *endo* (centrale, interno) e random, mentre le seconde attaccano esclusivamente le parti esterne (*eso*) del polimero. Infine, le β -glucosidasi trasformano il cellobiosio in glucosio.

Lo schema globale del processo di idrolisi enzimatica della cellulosa è riportato in Figura 4.

I preparati cellulastici disponibili commercialmente sono prodotti a partire dalla fermentazione di alcuni microrganismi, tra cui il batterio *Clostridium* e alcuni funghi come il *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*.

I prodotti di reazione possono inibire l'attività cellulastica: per esempio, il glucosio influisce sulla β -glucosidasi, rallentando la velocità di trasformazione del cellobiosio. Questa è una complicazione di cui tener conto, poiché l'inibizione da prodotto è uno dei fenomeni che possono ridurre la resa dello stadio di idrolisi, laddove idrolisi e fermentazione siano effettuate in stadi separati. Tale modalità è detta '*Separate Hydrolysis and Fermentation*' (SHF).

Effettuando simultaneamente l'idrolisi e la fermentazione ('*Simultaneous Saccharification and Fermentation*', SSF), il glucosio viene continuamente consumato dal microrganismo che lo converte in etanolo. Tra i vantaggi di questo processo vi è la riduzione dei costi dato che è necessario un solo reattore e che la produttività del processo aumenta.

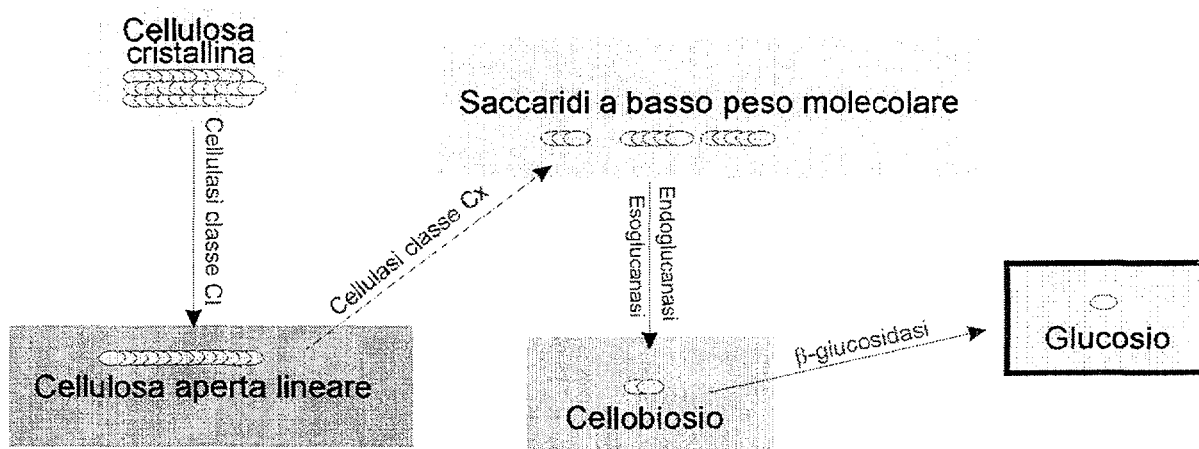


Figura 4 - Schema del meccanismo di idrolisi enzimatica della cellulosa: la cellulosa nativa è attaccata dalle cellulasi di classe C1, che aggrediscono la struttura cristallina; a questo punto, le catene lineari del polimero sono rese accessibili all'azione delle cellulasi di classe Cx (eso ed endoglucanasi), che producono cellobiosio. Quest'ultimo è convertito in glucosio dalle β -glucosidasi.

Per le prove di idrolisi enzimatica presentate nel seguito sono stati impiegati dei preparati commerciali della Novo Nordisk (Danimarca) denominati *Celluclast 1.5 L*, dotato di un'azione idrolitica generale nei confronti della cellulosa, ed il *Novozym 188*, ad azione prevalentemente β -glucosidasi; in Tabella 6 ne è riportata la caratterizzazione; si rimanda all'Appendice per i dettagli sperimentali.

Tabella 6 - Caratterizzazione dei preparati enzimatici utilizzati nelle prove di idrolisi.

Preparato	Proteina mg/mL _{preparato}	β -glucosidasi ^{a)} UE/mg _{proteina}	FP-ase ^{b)} FPU [*] /mg _{proteina}
Novozym 188	171	9.93	0.12
Celluclast 1.5 L	136	0.16	0.79

a) è la velocità di trasformazione del cellobiosio a glucosio. Le UE sono espresse in $\mu\text{mol}_{\text{prodotto}}/(\text{min}\cdot\text{mL}_{\text{preparato}})$

b) la Filter Paperase fornisce la *misura globale dell'efficienza* del mix di enzimi al substrato, essendo il risultato complessivo delle attività di *endo-glucanasi*, *eso-glucanasi* e β -glucosidasi. Le FPU sono espresse in $\mu\text{mol}_{\text{rid}}/(\text{min}\cdot\text{mL}_{\text{preparato}})$.

3.2 LA FERMENTAZIONE

L'etanolo prodotto nel corso del processo di fermentazione proviene da alcuni microrganismi che metabolizzano il glucosio.

Da ogni molecola di glucosio, sono prodotte due molecole di etanolo e due di anidride carbonica. Dai corrispondenti pesi molecolari si calcola che il peso dell'etanolo prodotto, in condizioni di resa quantitativa, equivale al 51% del peso del glucosio impiegato.

Lo schema riportato in Figura 5 è relativo alla sola stechiometria complessiva di reazione, in quanto la fermentazione alcolica rappresenta solo una frazione del complesso insieme di reazioni biochimiche coinvolte.

Come nel caso degli enzimi, sono noti anche effetti di inibizione da prodotto, e cioè da etanolo sul lievito. Il *Saccharomyces* è però ben tollerante all'etanolo, e alcuni ceppi riescono a produrre etanolo da glucosio fino a concentrazioni di 300 g/L [10].

Nella sperimentazione di seguito riportata, è stato impiegato un ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae*.

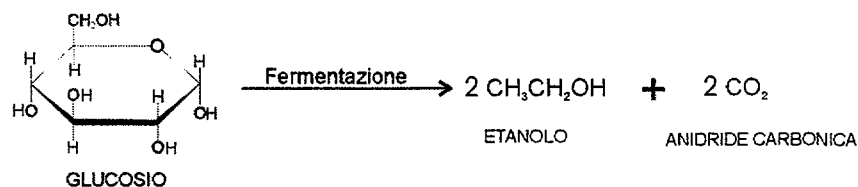


Figura 6 - Schema di bioproduzione dell'etanolo da glucosio.

3.3 SCELTA DELLE CONDIZIONI OPERATIVE PER LA BIOCONVERSIONE

L'attività di seguito descritta è relativa all'ottimizzazione dei processi di idrolisi enzimatica e fermentazione limitatamente ad alcuni parametri, importanti ai fini di un miglioramento della resa in etanolo quali il rapporto enzima/substrato e la temperatura nel processo di saccarificazione e fermentazione simultanea.

Dato che nell'intero processo di biotrasformazione della paglia ad etanolo, lo stadio più lento è costituito dall'idrolisi enzimatica, particolare attenzione è stata riservata allo studio di questa fase.

Il processo fermentativo è stato riferito a prove condotte in sistemi modello in cui vi erano 60 g/L di glucosio e lo stesso terreno di coltura utilizzato per le prove, ma senza biomassa né enzimi. In questo caso, la conversione del glucosio in etanolo è stata del 95% rispetto a quella teorica, mentre la concentrazione finale di etanolo ha raggiunto i 29 g/L (Figura 6).

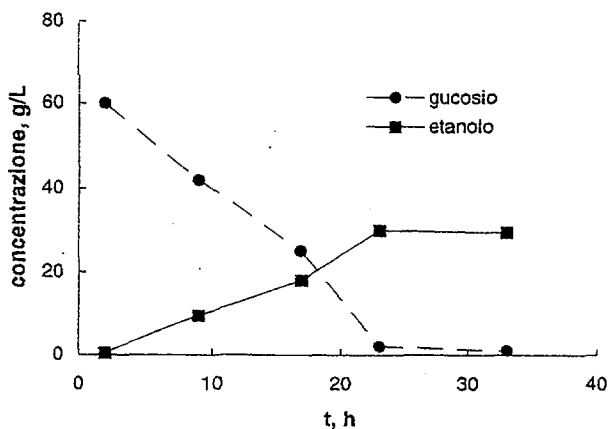


Figura 6 - Prova di riferimento per la fermentazione del glucosio in etanolo con *Saccharomyces c.* in terreno minimo di crescita.

Sono state effettuate prove preliminari di SHF ed SSF per definire la temperatura di processo e la necessità o meno della detossificazione. In questa fase è stato utilizzando come substrato il campione di paglia trattata a severità minore ($\log R_o$ 3.75) che dovrebbe corrispondere ad una minore produzione di inibitori e ad un maggiore recupero dei carboidrati a valle della SE.

3.3.1 Temperatura di processo

Nel processo di SSF si devono conciliare condizioni operative differenti riguardanti lo stadio di idrolisi e lo stadio di fermentazione nei quali può essere idealmente suddiviso.

Per quanto riguarda l'acidità del mezzo, sia gli enzimi che il lievito hanno un campo di attività che si sovrappone tra pH 4 e 5, e quindi, per quanto riguarda questo parametro non ci sono problemi. La bassa concentrazione di glucosio incide anche positivamente sulla produttività degli enzimi e dei lieviti. Il problema maggiore riguarda la temperatura di processo: infatti, l'attività specifica degli enzimi aumenta con la temperatura fino ai 50-60°C, quando cominciano a denaturarsi, il lievito però non può sopravvivere a queste temperature.

Bisogna quindi ricercare la *massima* temperatura cui il lievito si mantiene produttivo per non deprimere eccessivamente l'attività dell'enzima.

Almeno da alcune ricerche riportate in letteratura, la temperatura di 37 °C sembrava adatta alla fermentazione [11]. Diversamente, altri autori riportavano come valore di soglia 35°C, poiché anche piccole variazioni di temperatura determinano una forte inibizione sul lievito *Saccharomyces cerevisiae* [12].

Per determinare quale fosse la temperatura massima di sopravvivenza del nostro ceppo di *Saccharomices c.*, è stato prodotto un idrolizzato di paglia esplosa, precedentemente lavata, in cui il contenuto finale di glucosio era di 41 g/L.

L'idrolisi è stata condotta alle seguenti condizioni:

Tabella 7 – Condizioni di idrolisi enzimatica della paglia SE.

tempo di reazione	72 ore
rapporto biomassa/fase liquida	10%
volume della fase liquida	1.5 L
rapporto enzima/substrato	4%,
rapporto Celluclast/Novozym	5.75 (proteina)
temperatura	40°C
pH	4.8

La soluzione ottenuta dall'idrolisi è stata filtrata ed utilizzata per la fermentazione in beute da 300 mL, in cui sono stati introdotti 100 mL di idrolizzato, arricchito dei nutrienti e di 3g/L di lievito.

È stato verificato che, operando a 37°C, vi è bassissima produzione di etanolo (2-3%); ciò dimostra che mentre l'idrolisi avviene con successo il lievito non riesce a metabolizzarlo. A 35°C, il processo di fermentazione presenta un decorso regolare e in 48 ore tutto il glucosio disponibile è stato convertito in etanolo con resa del 94%, praticamente uguale a quella del sistema modello (Figura 7).

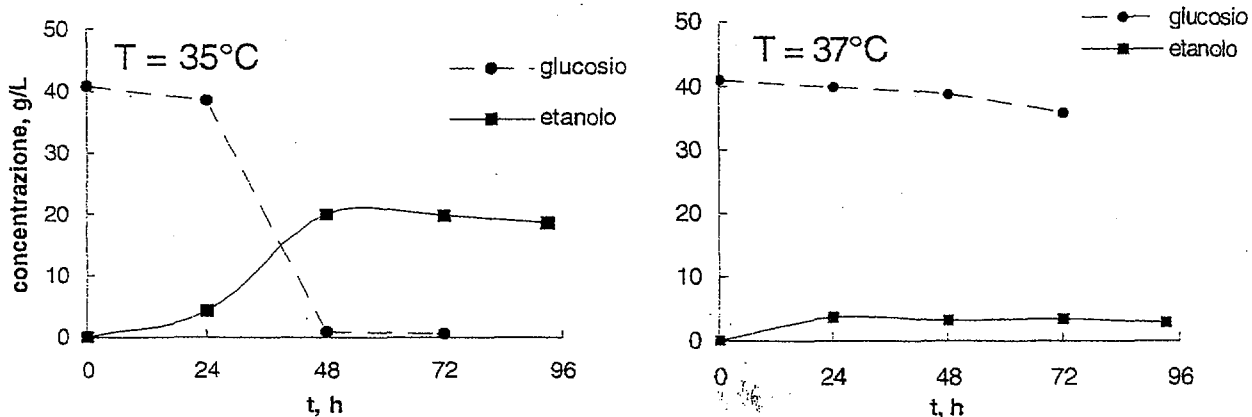


Figura 7 - Effetto della temperatura di fermentazione sulla resa in etanolo. Quando la temperatura è di 35°C la conversione è del 94%, mentre la temperatura di 37°C inibisce il lievito e la resa è molto bassa.

3.3.2 Detossificazione

Per detossificazione si intende l'eliminazione di sostanze inibitrici del *Saccharomyces*. Fra gli inibitori sono noti furfurale, acidi carbossilici e fenoli, prodotti nel corso del pretrattamento di *steam explosion* dalla degradazione dei polisaccaridi (in particolare dell'emicellulosa) e della lignina [13].

Il metodo più semplice per detossificare il materiale pretrattato è il lavaggio con acqua, poiché la maggior parte degli inibenti è idrosolubile.

Sono state condotte delle prove preliminari di SSF per verificare che la detossificazione fosse indispensabile, e in quale fase del processo.

La detossificazione mediante lavaggio acquoso del campione utilizzato per la sperimentazione (trattato a logRo 3.75) è stata effettuata in impianto, secondo la procedura di estrazione dell'emicellulosa riportata nella sezione descrittiva dello STELE.

Il residuo solido, raccolto a valle del primo filtro a nastro dell'impianto, è stato essiccato in stufa a 60°C e utilizzato in test di SSF alle condizioni di processo precedentemente riportate e alla temperatura di 35°C. I risultati sono stati comparati con quelli ottenuti utilizzando un campione non lavato e sono rappresentati in Figura 8.

Nel caso del campione *detossificato* (lavato), la produzione di etanolo procede regolarmente, e quindi si deduce che, in queste condizioni, né l'azione degli enzimi né quella del lievito è ostacolata.

Nel caso del campione *non detossificato* (non lavato) non si ha produzione di etanolo anche se l'idrolisi avviene regolarmente e si accumula glucosio nella soluzione. L'effetto inibente dei prodotti rilasciati nel corso del pretrattamento sembra, quindi limitato al solo stadio di fermentazione. Dato che l'efficienza di lavaggio effettuato in impianto è di circa 80%, si evince come l'effetto inibente di tali sostanze sia legato anche alla loro relativa concentrazione. Presso i nostri laboratori è in corso una ricerca sistematica riguardante questo specifico aspetto.

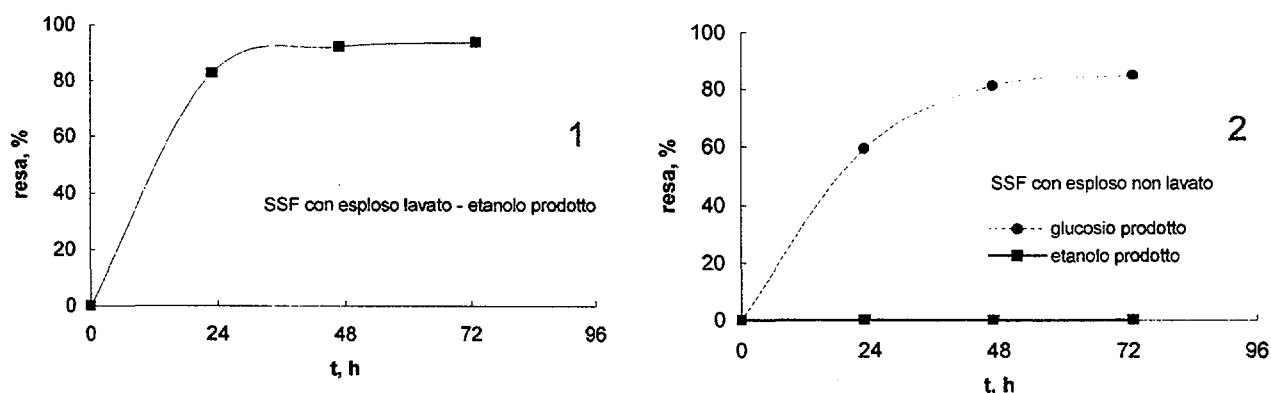


Figura 8 – Effetto della detossificazione (lavaggio) sull'idrolisi e fermentazione simultanea (SSF) di campioni di paglia esplosa. Nel grafico 1 è riportata la resa di etanolo, avendo utilizzato come substrato esploso lavato, il glucosio non è stato rilevato dato che veniva immediatamente consumato dal lievito. Nel grafico 2 sono riportate le conversioni in glucosio ed etanolo prodotto da esploso non lavato, in questo caso, l'etanolo non viene prodotto.

3.3.3 Carico enzimatico e severità del pretrattamento.

Sono state effettuate prove di idrolisi enzimatica per ciascuno dei tre campioni di esploso di paglia lavata, utilizzando carichi enzimatici (E/S) del 1, 2 e 4%. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 9.

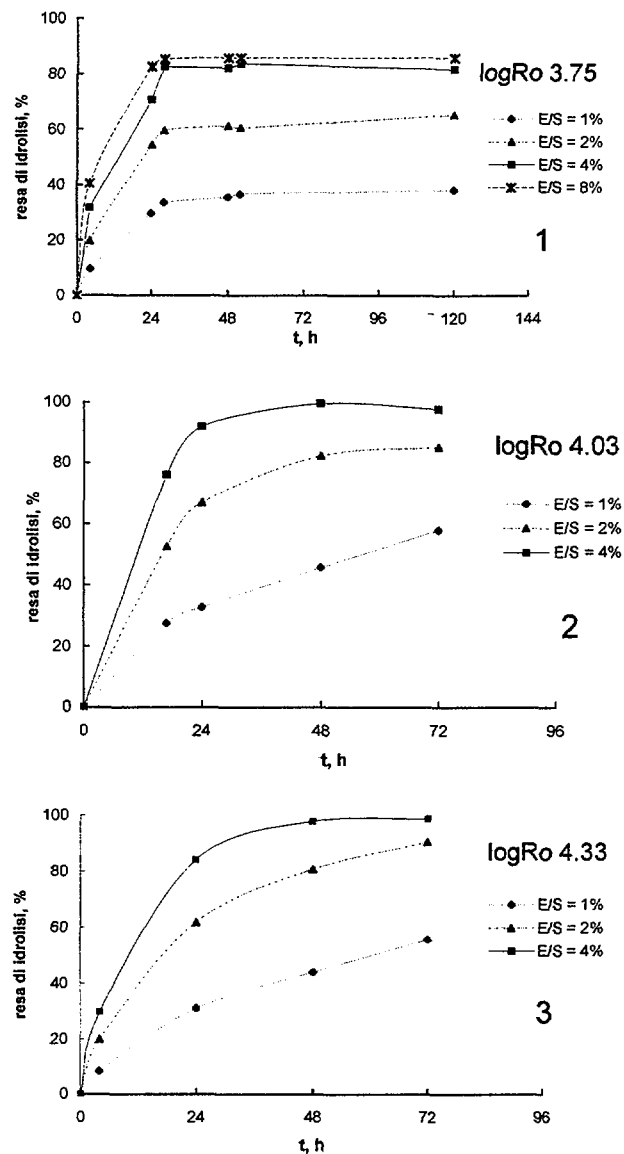


Figura 9 - Rese di idrolisi enzimatica della cellulosa contenuta nella paglia SE a diversi rapporti enzima/substrato e diversa severità di pretrattamento. Altre condizioni di idrolisi erano: S/L 10%; L 100 ml; pH 4.8; T 35°C; (campioni lavati),

L'analisi della cinetica di idrolisi e delle rese ottenute forniscono indicazioni sulle condizioni di pretrattamento migliori cui sottoporre la biomassa per ottenere alte rese di etanolo ed il minor consumo di enzima.

Per quel che riguarda il campione ottenuto a parametro di severità più basso, **logRo 3.75**, la resa di idrolisi si arresta all'85%, anche utilizzando un rapporto E/S dell'8%.

Solo in tal caso si è impiegato questo valore d'E/S, poiché nelle altre prove la resa in glucosio è stata in pratica quantitativa già utilizzando un rapporto del 4%.

Al diminuire del rapporto E/S la resa diminuisce sensibilmente, indipendentemente dal tempo di reazione, tanto che le curve mostrano che già a 24 ore inizia il *plateau*, caratteristico del raggiungimento della massima resa ottenibile.

Sensibilmente più soddisfacenti sono le rese di idrolisi nel caso dei due campioni ottenuti a severità maggiori, **logRo 4.03** e **logRo 4.33**.

In entrambi i campioni è possibile ottenere la completa idrolisi utilizzando un rapporto E/S del 4%. Nel caso del campione ottenuto a logRo 4.33 si può riscontrare che già ricorrendo ad un rapporto E/S del 2% si raggiunge una resa del 90% a 48 ore. Questo è un risultato significativo, poiché indica che la destrutturazione della fibra è tanto spinta da consentire l'impiego di una quantità di catalizzatore relativamente bassa.

Il più basso carico di enzima, E/S del 1%, non sembra proponibile per fini pratici dato che in 72 ore solo il 50% circa della cellulosa disponibile risulta saccarificato.

In Figura 10 è riportata nei diversi casi la produttività delle idrolisi, vale a dire il glucosio prodotto per unità enzimatica. Da questa rielaborazione risulta più chiaro che il trattamento della paglia a maggior severità non aumenta sensibilmente la produttività in alcun caso. È da considerare che la severità minore comporta una minor degradazione della biomassa e, di conseguenza, minore formazione di inibitori e maggior recupero dei polisaccaridi da idrolizzare e fermentare. La produttività non è proporzionale al carico enzimatico: infatti, quadruplicando il rapporto E/S la produttività specifica si dimezza.

In definitiva, il pretrattamento della paglia a severità corrispondente a logRo 4.03 fornisce il substrato migliore per il successivo processo di idrolisi, mentre il rapporto E/S del 2% è il miglior compromesso tra velocità di idrolisi, resa e produttività.

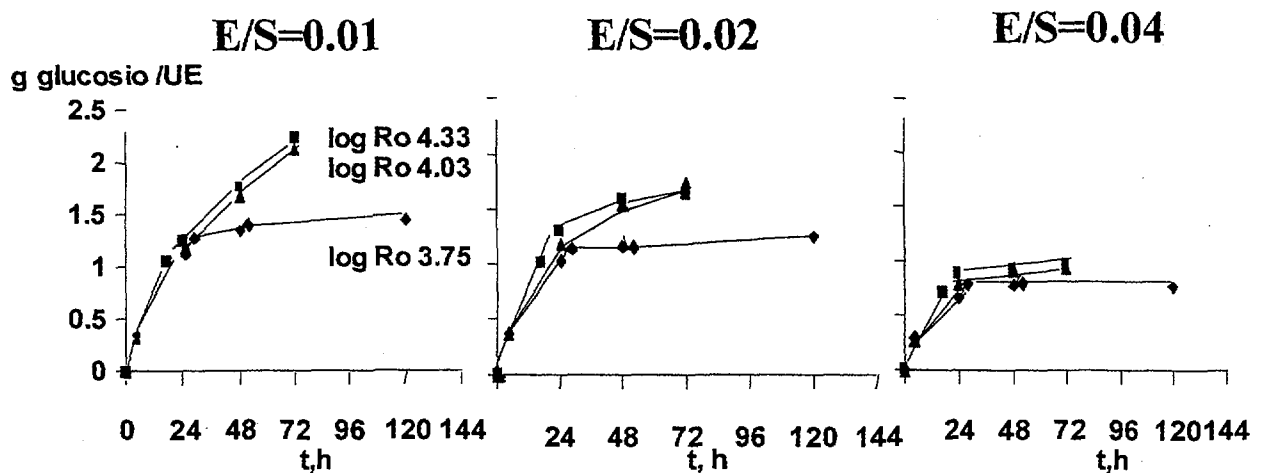


Figura 10 - Resa specifica di glucosio della reazione di idrolisi enzimatica (rielaborazione dei dati di Figura 9).

L'inibizione da glucosio nel processo di idrolisi della paglia SE è stata evidenziata in una serie di specifici esperimenti. La cinetica di idrolisi enzimatica e le rese di conversione sono state misurate alla presenza di diverse quantità di glucosio aggiunto all'inizio della reazione. I risultati riportati in Figura 11 evidenziano che aumentando il contenuto di glucosio nella soluzione la velocità di idrolisi diminuisce sensibilmente: ad una concentrazione di 30 g/L il tempo necessario all'idrolisi completa della cellulosa diventa di 5 giorni contro i 2 necessari nel caso che non vi sia glucosio iniziale.

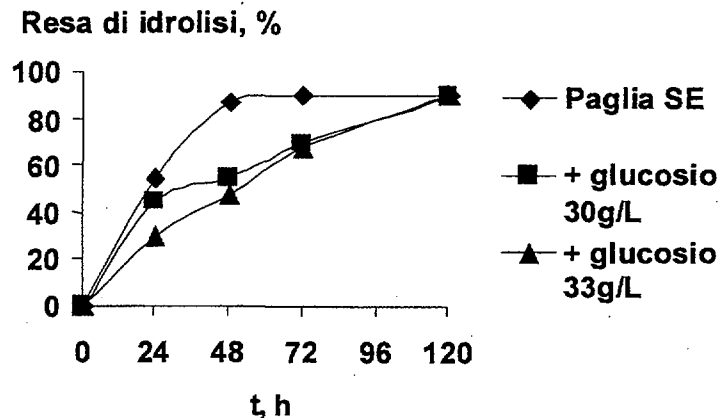


Figura 11 - Effetto inibente del glucosio sulla cinetica di idrolisi enzimatica effettuata sul campione di paglia SE a logRo 4,03 lavato (rapporto E/S 4%, T 35°C, pH 5, S/L 10%, L 100 ml)

3.3.4 Effetto della scala sulla SSF

I processi biologici sono sensibili a moltissimi fattori che rendono particolarmente difficili da gestire la produzione su scala industriale. Gli addetti ai lavori parlano spesso di 'arte'.

La sperimentazione preliminare è effettuata in beuta o in piccoli reattori da banco dove vigono peculiari condizioni di stress meccanico, sterilità, aerazione, gradienti termici e nutrizionali, ecc. Questi parametri di processo possono variare fortemente con la scala di bioreazione fino a rendere vana la sperimentazione effettuata su scala banco. Un esempio, già citato in precedenza, è costituito dagli organismi geneticamente modificati che, in beuta, riescono a metabolizzare contemporaneamente i zuccheri a 5 e a 6 atomi di carbonio producendo etanolo, ma che non resistono alle condizioni di normale esercizio degli impianti produttivi.

È quindi importante verificare che i risultati ottenuti dalla sperimentazione 'in beuta' possano essere riprodotti su scala maggiore.

In questo contesto, è stata effettuata una prova per verificare se la produzione di etanolo in un reattore da 10 litri risulti lo stesso rispetto a quanto ottenibile in beuta da 300 ml, il tutto alle condizioni ottimizzate riportate sopra.

In Figura 12 sono riportati i risultati di queste prove.

La resa finale d'etanolo è in sostanza uguale nei due casi, ma nel reattore da 10 l non si è evidenziato accumulo di glucosio, contrariamente a quanto avviene in beuta. Una spiegazione di questo diverso andamento potrebbe essere la diversa modalità di agitazione. In beuta, il mescolamento è ottenuto ponendo il recipiente in un agitatore oscillante e potrebbe non essere sufficiente ad assicurare una concentrazione uniforme del lievito, almeno nelle prime fasi (*bulk mixing*), mentre l'enzima riesce a diffondersi uniformemente ed ad idrolizzare la

cellulosa. Il reattore da 10 l era invece provvisto di agitatore elicoidale che assicura il *micromixing*.

L'agitazione del *medium* è uno dei parametri più importanti nella conduzione dei processi biotecnologici, poiché da questo dipende lo stress meccanico cui i microrganismi e gli enzimi sono sottoposti e l'instaurarsi o meno di gradienti.

Esistono diversi tipi di agitatori che sono utilizzati secondo la reologia del sistema per migliorare l'andamento delle bioreazioni.

Il bireattore da 50 l (40 l di volume di lavoro) è stato utilizzato per verificare se il tipo di agitatore avesse influenza sul processo di SSF; anche in questo caso sono state condotte prove alle condizioni ottimizzate ritrovate su scala beuta, utilizzando un agitatore di tipo elicoidale e una turbina Rushton (a pale).

I risultati riportati in Figura 13 mostrano che, a 24 ore, la SSF realizzata con agitatore elicoidale ha raggiunto un'efficienza relativa maggiore del 5% rispetto a quello realizzato con la turbina Rushton.

La spiegazione di questo diverso andamento può ritrovarsi nella particolare reologia della sospensione e nella diversa geometria degli agitatori. La densità del solido è più alta del liquido e tende a sedimentare: l'agitatore elicoidale si oppone a questa tendenza generando dei flussi assiali e mantenendo omogenea la sospensione. La turbina Rushton è meno efficiente in ciò perché genera meno flussi assiali che radiali [14].

Per inciso, la reologia del sistema varia moltissimo nel corso del processo. Inizialmente la sospensione ha la consistenza di una pasta cartaria, tanto che è molto difficile operare al di sopra del rapporto S/L 15%; col procedere dell'idrolisi le fibre di cellulosa letteralmente si sciolgono; rimane una sospensione finissima di lignina. La più comune turbina Rushton si adatta meglio a questa fase finale, ma l'agitatore ad elica consente di raggiungere rese maggiori in 24 ore, tempo ritenuto ottimale per applicazioni pratiche.

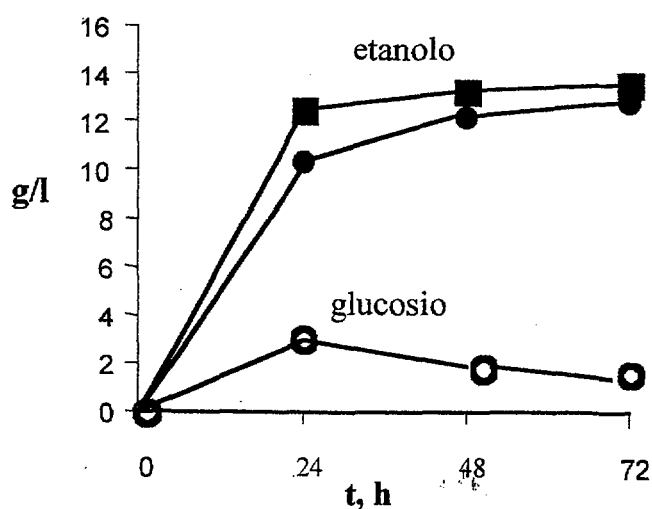


Figura 12 - Produzione di glucosio ed etanolo in beuta agitata (su shaker termostato) e in bireattore da 10l con agitatore elicoidale (150 rpm). Le altre condizioni di reazione sono E/S 4%; S/L 10%; T 35°C; pH 4.8; lievito 3 g/L.

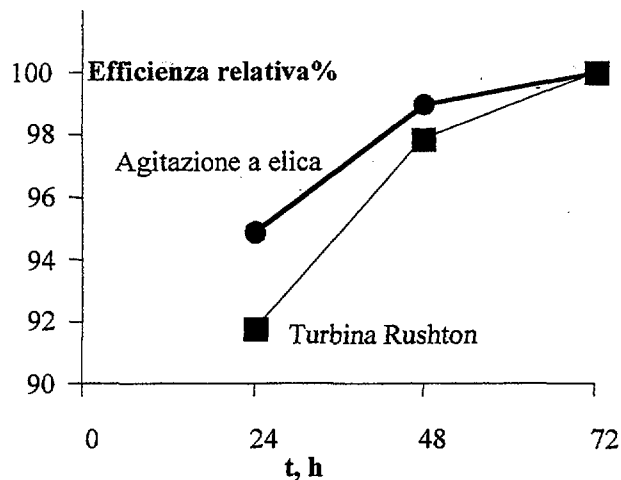


Figura 13 - Efficienza relativa di SSF in un reattore da 50 l nel caso di agitazione con turbina Rushton (a pale) o elicoidale (per le altre condizioni di reazione vedi Figura 12).

4. CONCLUSIONI

Il pretrattamento di Steam explosion effettuato esponendo la paglia di grano a 220°C per 3 minuti, corrispondente a severità $\log Ro$ 4.03, produce un materiale che può essere idrolizzato quantitativamente per mezzo di enzimi cellulolitici.

Nel corso dell'idrolisi e fermentazione simultanea (SSF) non si verifica l'effetto inibitorio del glucosio sull'idrolisi riscontrato nel processo di idrolisi e fermentazione separata (SHF).

Nel caso della SSF, non è possibile operare a temperature superiori di 35°C, in quanto queste non sono tollerate dal *Saccharomyces c.*, e si deve utilizzare un carico enzimatico minimo del 2% per raggiungere l'idrolisi completa in 48 ore.

In ogni caso, nel processo SSF è stata raggiunta una conversione della cellulosa in etanolo del 92%, che corrisponde alla produzione di circa 170 g di etanolo per chilo di paglia pretrattata. Sia la scala dei reattori che il tipo di agitazione influisce sulla cinetica di idrolisi. Il migliore decorso cinetico è stato riscontrato nel caso del reattore provvisto di agitatore ad elica.

5. APPENDICE SPERIMENTALE

5.1 METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE

Determinazione del peso secco

Questo metodo si basa su procedure standard per la determinazione del contenuto di umidità in materiali lignocellulosici. L'operazione è condotta in stufa elettrica a circolazione forzata alla temperatura di 105°C, fino ad ottenere un peso del campione costante.

Per preservare l'integrità della cellulosa e degli zuccheri, è preferibile che i campioni da sottoporre ad ulteriori analisi siano essiccati *overnight* a 60° C. Il valore ottenuto può essere poi corretto in funzione del peso secco determinato a 105° C.

Determinazione delle ceneri

Il metodo consente la determinazione delle ceneri, espresse come percentuale rispetto al campione secco di partenza, del residuo che si ottiene in seguito a combustione della biomassa a 600° C. La percentuale di ceneri è indicativa del contenuto di materiale inorganico presente in un campione. Esse sono composte da una varietà di elementi, presenti nel residuo di combustione sotto forma di ossidi. Il campione impiegato per la determinazione delle ceneri è macinato a *50 mesh*, dopo essere stato preventivamente essiccato a 105° C. [15]

Determinazione degli estrattivi

L'operazione è effettuata con una miscela etanolo/toluene, in grado di estrarre oli, resine, cere, grassi e alcune gomme solubili anche in acqua.

Il campione sul quale si esegue l'estrazione è preventivamente essiccato, macinato a *50 mesh* e nuovamente introdotto in stufa a 105°C, fino a peso costante.

Quindi, una quantità nota di campione viene sottoposta ad estrazione in *soxhlet* per 8 ore. Al termine delle operazioni, si recupera il materiale estratto disciolto nel solvente che è allontanato per evaporazione. Dopo un ulteriore essiccamento effettuato in stufa a 60°C, il residuo viene pesato determinando il suo contenuto percentuale in peso rispetto al materiale di partenza. [16]

Determinazione della lignina

Le biomasse hanno un contenuto di lignina che può variare dal 10 al 30 %. La determinazione del contenuto di lignina fornisce informazioni utili per le operazioni di sbianca nelle applicazioni cartarie o circa le possibili emissioni di composti fenolici nei processi di conversione diretta per usi energetici.

Il trattamento con acidi forti di campioni lignocellulosici determina l'idrolisi della frazione dei carboidrati e la separazione di un residuo insolubile che può essere determinato come lignina. Poiché alcuni estrattivi (oli, resine, grassi, cere, tannini, gomme) possono rimanere insolubili con la lignina, è necessario rimuoverli preventivamente.

L'idrolisi primaria dei carboidrati è eseguita trattando un campione di biomassa secca con acido solforico al 72%. Circa un grammo di campione è pesato in un becker ed addizionato di acido solforico, quindi sottoposto ad agitazione per due ore in un bagno termostato a 20°C. L'idrolisi acida è completata diluendo il campione con acqua fino a portare concentrazione di acido solforico al 3% w/w e facendo bollire il tutto per altre quattro ore. La sospensione risultante contiene una parte insolubile che è recuperata mediante filtrazione, quindi pesata: essa costituisce la lignina insolubile. La soluzione è portata ad 1 L, e su essa vengono effettuate le determinazioni di lignina solubile, leggendo l'assorbanza a 205 nm mediante spettrofotometria di assorbimento UV [17].

Il contenuto di lignina in soluzione è calcolato mediante la formula:

$$\text{lignina (g/l)} = A/B \times C$$

dove:

A = assorbanza a 205 nm della soluzione

B = coefficiente di estinzione 110 L/(g x cm)

C = fattore di diluizione.

Gli zuccheri presenti nella soluzione sono determinati mediante cromatografia ionica HIPC .

5.3 METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE SOTTOPOSTE A STEAM EXPLOSION

Estrazione acquosa

L'estrazione di materiale esploso con acqua calda rimuove la frazione di emicellulosa, sotto forma di oligomeri e monomeri a cinque o sei atomi di carbonio, nonché di furfurolo, acidi uronici, gruppi acetilici che vengono prodotti dalla parziale degradazione della biomassa, durante il processo di *steam explosion*.

Un campione di ca 100 g è sottoposto a due lavaggi consecutivi con 400-500 ml di acqua calda (65°C) e filtrato su filtro WHATMAN 4.

Estrazione alcalina

L'estrazione alcalina rimuove la frazione di lignina che è resa parzialmente solubile in seguito al trattamento di *steam explosion*. Tale operazione è normalmente eseguita sul residuo solido dell'estrazione acquosa del materiale *steam* esploso. L'estrazione può essere effettuata anche direttamente sul materiale esploso tal quale.

Il solido lignina/cellulosa ottenuto come residuo dell'estrazione acquosa viene sospeso in una soluzione di NaOH 1.5 % a 90° C agitando frequentemente per 15 minuti.

Nella corrispondente operazione dell'impianto STELE la concentrazione della soluzione alcalina è dello 0.5%.

Si filtra la sospensione a caldo su filtro WHATMAN 4, e si trasferisce quantitativamente il residuo solido in un *becker*, ripetendo l'estrazione; si lava il residuo sul filtro con acqua calda. Infine, si sospende il solido in acqua e si neutralizza con H₂SO₄ al 20 %. Si filtra e si pesa il residuo essiccato.

La soluzione alcalina recuperata contiene la lignina, che può essere precipitata con aggiunta, di H₂SO₄ al 20 % fino a pH 2; si scalda a 95° C per 10 minuti per completare la precipitazione. La lignina è recuperata per filtrazione su filtro di vetro ed essiccata a 105° C. Nelle acque madri è determinata la lignina solubile mediante spettrofotometria UV, misurando l'assorbimento a 205 nm.

5.4 METODI PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI E DELL'ETANOLO

Saggio colorimetrico NELSON per la determinazione dei gruppi riducenti

La determinazione di gruppi riducenti nelle miscele di prodotto della saccarificazione permette di valutare l'attività cellulolitica dei preparati enzimatici, dato che i principali zuccheri derivanti dalla degradazione della struttura cellulosa ed emicellulosica dei campioni di biomasse (glucosio, xilosio, cellobiosio) sono riducenti.

La tecnica analitica adottata si basa sull'utilizzo dei seguenti reattivi:

Reattivo A

- Na₂CO₃ anidro: 25 g;
 - Tartrato di Na e K: 25 g;
 - NaHCO₃ : 20 g;
 - Na₂SO₄ : 200 g.
-
- Sciogliere in circa 800 mL di H₂O bidistillata ed infine portare ad 1 L;
 - conservare la soluzione a temperatura non inferiore a 20°C.

Reattivo B

CuSO₄ · 5H₂O: 15 g x 100 mL di H₂O;

- H₂SO₄ 96 % : 1 o 2 gocce.

Reattivo C

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O: 25 g

H₂O bidistillata: 450 mL;

H₂SO₄ 96 %: 21 mL

- Sciogliere 3 g di Na₂HAsO₄ · 7H₂O in 25 mL di H₂O bidistillata e mescolare;
- conservare la soluzione in bottiglia scura ed incubare la stessa in bagno termostato a 37°C per 24-48 h prima dell'utilizzo.

Metodica:

- 1) In una provetta da 10 mL mescolare 1 mL di campione con 1 mL di una miscela A+B, preparata al momento e costituita da 25 mL di reattivo A e 1 mL di reattivo B;
- 2) introdurre la provetta in un bagno a 100°C e lasciare per 20 minuti;
- 3) lasciare raffreddare la soluzione;

- 4) aggiungere 1 mL di reattivo C: comincerà a svilupparsi CO₂ che deve essere eliminata agitando bene il contenuto della provetta. Attendere 5-10 minuti e ripetere l'operazione fino a che non si notino ulteriormente bolle di gas;
- 5) portare a 10 mL con H₂O distillata;
- 6) leggere l'assorbanza a 520 nm. La metodica necessita di una retta di taratura, effettuata con una soluzione di glucosio 0.2 mg/mL, diluita opportunamente per mantenersi nel *range* di concentrazione 0.02 - 0.2 mg/mL, che ben si colloca nell'intervallo di sensibilità della tecnica analitica (5÷300 µg/mL).

Dalla curva di taratura, si determina la corrispondenza tra assorbanza del campione a 520 nm e mg di glucosio in esso contenuti. Il fattore di proporzionalità (fattore Nelson, F_N) è espresso in µg(glucosio)/(mL · ΔA520), in cui ΔA520 è la differenza tra l'assorbanza del campione e quella del bianco Nelson (B_N), cioè di una soluzione ottenuta aggiungendo ad 1 mL di H₂O distillata i soli reattivi della metodica. La molarità di gruppi riducenti di un campione è quindi determinabile in base alla relazione:

X



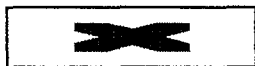
in cui: [R] : concentrazione di gruppi riducenti in µmoli/mL;
 A_C: assorbanza del campione, adimensionale;
 A_{BN}: assorbanza del bianco Nelson, adimensionale;
 D_C: diluizione del campione, adimensionale;
 F_N: fattore Nelson, µg(glucosio)/(mL ΔA520);
 180.2 peso molecolare del glucosio

5.4.2 Saggio enzimatico GOD-PERID per la determinazione del glucosio

La metodica si basa sull'impiego di un unico reattivo, costituito da una soluzione preparata a partire da un composto enzimatico, disponibile in kit e fornito dalla BOEHRINGER-MANNHEIM. La soluzione va conservata in bottiglia scura, a 4°C. La determinazione della concentrazione di glucosio nei prodotti di idrolisi richiede che si aggiunga nella soluzione δ-gluconolattone 10 mM, in modo da inibire la β-glucosidasi in essa presente in tracce. L'operazione va effettuata al momento del saggio.

Metodica:

- 1) In una provetta, aggiungere a 200 µL del campione da analizzare 5 mL della soluzione GOD, con δ-gluconolattone 10 mM;
- 2) lasciare la provetta in un bagno termostato a 30°C per 30 min;
- 3) effettuare immediatamente la lettura del campione a 436 nm. Analogamente a quanto visto per la metodica NELSON, anche in questo caso occorre una retta di taratura del glucosio, che permetterà di ottenere il *fattore GOD* espresso in µg(glucosio)/(200 µL · ΔA436), essendo il campione di 200 µL. La sensibilità del saggio è compresa entro i 20 µg/mL di glucosio. La concentrazione di glucosio nel campione da analizzare è ricavabile dall'espressione:



in cui:
 [G] : concentrazione di glucosio in µmol/mL;
 A_C: assorbanza del campione, adimensionale;
 A_{BG}: assorbanza del bianco GOD, adimensionale;
 D_C: diluizione del campione, adimensionale;
 F_G: fattore GOD espresso in µg(glucosio)/(200 µL · ΔA436);
 180.2 peso molecolare del glucosio

Determinazione dei pentosani ed esosani tramite HPIC (High Performance Ionic Chromatography)

L'analisi è condotta mediante DIONEX, modello DX 300.

Come eluente è impiegata una soluzione di NaOH a gradiente di concentrazione (2-200 mM). Il rivelatore è di tipo elettrochimico ad amperometria pulsata.

Il campo di validità delle determinazioni è abbastanza ampio, però si opera normalmente in un intervallo di concentrazione di 0-150 ppm, in cui è stata accertata la linearità di risposta del rivelatore. Tale accorgimento è adottato per ridurre al minimo il carico organico introdotto in colonna.

La colonna cromatografica è costituita da una fase stazionaria non porosa in polistirene-divinilbenzene, attivata con gruppi solfonici per lo scambio ionico.

Determinazione dell'etanolo mediante HPIC

L'analisi dell'etanolo è effettuata mediante cromatografia ionica, con HPIC DIONEX.

Una soluzione di acido solforico 10 mM è l'eluente utilizzato per questa determinazione. Il rivelatore è di tipo elettrochimico ad amperometria pulsata.

La colonna cromatografica è una Nucleogel 300 OA.

Si opera normalmente in un *range* di concentrazioni di etanolo compreso tra 100-1000 ppm, in cui è stata accertata la linearità della risposta del rivelatore. Il metodo impiegato consente di rilevare anche la presenza di glucosio e di xilosio, i cui segnali mostrano però che la sensibilità dello strumento è di circa 15 volte inferiore rispetto a quella rilevata nel caso dell'etanolo. Non conviene, quindi, operare con concentrazioni di analita inferiori a 100 ppm.

Il brodo di fermentazione è diluito fino ad ottenere una concentrazione di etanolo compresa nell'intervallo di concentrazioni sopra riportato. Nella diluizione è compresa l'aggiunta del 10% di una soluzione di acido perclorico (0.1M), necessaria alla deproteinizzazione della soluzione. Ciò è indispensabile al fine di preservare la fase stazionaria dal rischio di intasamento da materiale proteico.

5.5 METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI PREPARATI ENZIMATICI

Per le prove di idrolisi enzimatica sono stati impiegati dei preparati commerciali, forniti dalla NOVO Nordisk (Danimarca) e denominati **Novozym 188** e **Celluclast 1.5 L**. Entrambe i prodotti sono stati caratterizzati dal punto di vista della *concentrazione proteica e delle attività di β -glucosidasi e FilterPaperase*. La determinazione di queste grandezze è necessaria per il dosaggio delle due soluzioni, in modo che nelle prove di idrolisi si utilizzi un rapporto corretto delle attività enzimatiche. Questo rapporto influisce difatti sulla resa di trasformazione della cellulosa in glucosio.

Come evidenziato in figura 15, la retta rappresenta la velocità di trasformazione del cellobiosio (prodotto intermedio della saccarificazione) a glucosio (prodotto finale della saccarificazione). È importante conoscere questo valore, in quanto, per una efficiente conversione dei substrati cellulosici, una opportuna percentuale di attività cellulolitica deve essere costituita da β -glucosidasi.

D'altra parte, la presenza più o meno marcata di FP-ase in un preparato enzimatico fornisce la *misura globale dell'efficienza di attacco* del mix di enzimi al substrato, essendo il risultato complessivo delle attività di *endo-glucanasi, eso-glucanasi e β -glucosidasi*.

Nelle prove sperimentali, si è adottato un rapporto tra Celluclast e Novozym di 5.75.

Saggio Lowry-Hartree per la determinazione del contenuto proteico

La concentrazione proteica (espressa in mg/mL) dei preparati enzimatici **Celluclast 1.5** e **Novozym 188** è stata valutata ricorrendo a questa metodica che fa uso delle soluzioni A B e C, preparate come di seguito riportato:

Reattivo A

- Na_2CO_3 anidro: 100 g in 500 mL di NaOH 1 N;
- Tartrato di Na e K: 2 g.

Portare ad 1 L con H_2O distillata.

Reattivo B

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1 g in 90 mL di H_2O e 10 mL di NaOH 1 N;
- Tartrato di Na e K: 2 g.

Reattivo C

- Reattivo di FOLIN-CIOCALTEUS, diluito 1:16 con H_2O al momento del saggio.

Metodica:

- 1) Aggiungere ad 1 mL di campione 0.9 mL di soluzione A;
- 2) lasciare i campioni in un bagno a 50°C per 10 minuti;
- 3) raffreddare a temperatura ambiente;
- 4) aggiungere 100 μL di B e lasciare per 10 minuti a temperatura ambiente;
- 5) aggiungere 3 mL di C, agitare rapidamente;
- 6) lasciare i campioni a 50°C per 10 minuti;
- 7) leggere l'assorbanza a 650 nm.

La metodica necessita di una retta di taratura, effettuata con una soluzione 1 mg/mL di BSA (*Bovine Serum Albumine*), fino ad una concentrazione massima di proteina nel campione da analizzare di 200 $\mu\text{g/mL}$.

Della soluzione proteica in esame (ad es. del preparato enzimatico), si effettua del pari una retta di taratura. Si otterranno i coefficienti angolari delle due rette, espressi in $\Delta A_{650}/\text{mL}$. Poiché della soluzione di albumina è

nota la concentrazione proteica, dal rapporto delle due pendenze è possibile determinare anche quella della soluzione a concentrazione proteica ignota.

Dal rapporto delle pendenze delle rette Celluclast/Albumina e Novozym/Albumina si è calcolato che la concentrazione di proteina è 136 g/L per il Celluclast 1.5L e 171 g/L per il Novozym 188 (Figura 14).

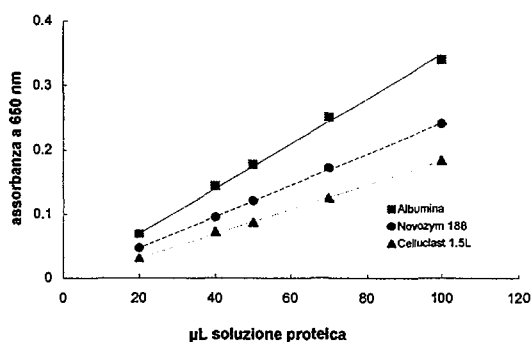


Figura 14 - Determinazione della concentrazione proteica nei preparati enzimatici Celluclast 1.5L e Novozym 188 mediante la metodica Lowry-Hartree, in cui viene utilizzata una proteina standard (BSA). Il contenuto proteico delle soluzioni viene determinato dal rapporto delle assorbanze.

Saggio per la determinazione delle Unità Enzimatiche di β -glucosidasi

L'Unità Enzimatica β -glucosidasi è definita come la quantità di enzima che provoca il rilascio di una μmol di glucosio al minuto (utilizzando cellobiosio come substrato), nelle seguenti condizioni di reazione:

- ✓ Concentrazione di cellobiosio: 10 mM
- ✓ Volume di reazione (V_R): 8 mL
- ✓ Temperatura (T): 45°C
- ✓ Tempo di reazione (Δt): 15 min
- ✓ pH: 4.8 (tampone sodio-acetato/acido acetico 50 mM)

I preparati enzimatici sono stati diluiti 1:250 e sono state preparate diverse provette a concentrazione di preparato enzimatico variabile. Sono stati effettuati dei prelievi dopo 15 minuti e la reazione è stata arrestata, ponendo i campioni in bagno termostato a 95°C per 20 minuti, per disattivare l'enzima.

E' stata quindi determinata la curva di attività prodotto/concentrazione enzimatica, misurando con reattivo GOD il contenuto di glucosio nei campioni.

Dai valori ottenuti, si può tracciare la curva di attività *grammi di prodotto/mL di enzima*, che consente di risalire alle UE, tenendo conto del fattore di diluizione del preparato e del peso molecolare del glucosio (Figura 15).

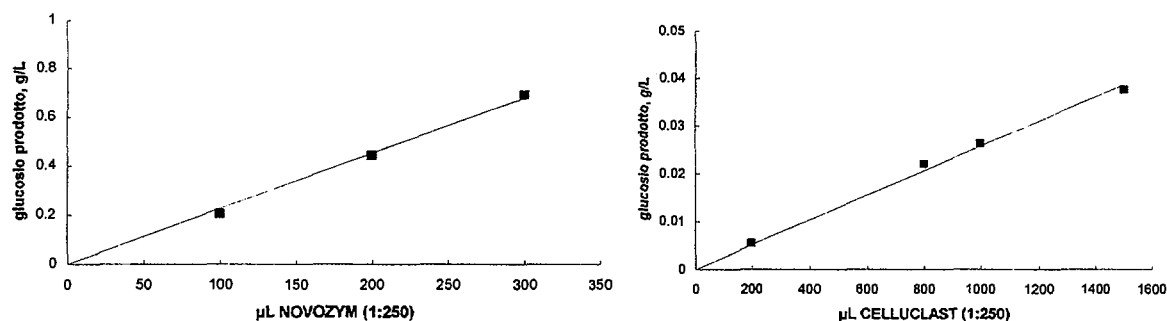


Figura 15 - Determinazione dell'attività di β -glucosidasi nei preparati enzimatici Celluclast 1.5L e Novozym 188. Concentrazione iniziale di substrato (cellobiosio): 10 mM; volume di reazione: 8 mL; temperatura: 45°C; tempo di reazione: 15 min; pH: 4.8 (tampone sodio-acetato/acido acetico 50 mM).

Le Unità Enzimatiche (UE) si esprimono come micromoli di glucosio prodotto nell'unità di tempo e per unità di volume di preparato: $\mu\text{mol}_{\text{prodotto}}/(\text{min}\cdot\text{mL}_{\text{preparato}})$.

Un altro modo di riportare l'attività, forse più preciso perché indipendente dalla diluizione del preparato enzimatico è quello di riferire l'attività rispetto all'unità di peso della proteina piuttosto che ai mL di preparato.

Dalle pendenze delle rette, si ottiene l'attività di β -glucosidasi nei due preparati che risultano:

UE β -glucosidasi **Novozym 188**: $1702 \mu\text{mol}_{\text{prodotto}}/(\text{min} \cdot \text{mL}_{\text{preparato}}) = 9.93 \text{ UE}/\text{mg}_{\text{proteina}}$
UE β -glucosidasi **Celluclast 1.5L**: $22.20 \mu\text{mol}_{\text{prodotto}}/(\text{min} \cdot \text{mL}_{\text{preparato}}) = 0.16 \text{ UE}/\text{mg}_{\text{proteina}}$

Saggio per la determinazione delle Unità Enzimatiche di Filter-Paperase

Il numero di Unità di FP-ase dà indicazione dell'attività cellulastica (cellulasi di classe CI) globale di un preparato enzimatico. L'Unità di FP-ase è stata definita come la quantità di enzima che rilascia una μmol di gruppi riducenti al minuto, impiegando carta da filtro (Whatman 1) come substrato. Le condizioni di saggio sono le seguenti:

- ✓ Substrato carta da filtro Whatman 1, tagliata in striscioline $1 \times 6 \text{ cm}$, dal peso di circa 50 mg (cellulosa pura)
- ✓ V_R : 1.5 mL
- ✓ T: 50°C
- ✓ Δt : 60 min
- ✓ pH: 4.8 (tampone sodio-acetato/acido acetico 50 mM)

La metodica si attiene alla procedura standardizzata IUPAC [18, 19]. Il preparato enzimatico è diluito opportunamente e un'aliquota è messa a reagire con carta da filtro. Alla fine del saggio si preleva un campione della soluzione che è disattivato a 95°C . L'ammontare di gruppi riducenti *come glucosio* è determinato con metodica NELSON. Tenendo conto della diluizione del preparato enzimatico e del peso molecolare del glucosio si determinano le FPU/mL.

I preparati enzimatici sono stati diluiti $1:100$ con tampone a pH 4.8 . Sono state allestite provette a diverso contenuto enzimatico, fino ad una concentrazione massima di $1:15$ della soluzione secondaria. Dopo 60 minuti sono stati effettuati dei prelievi, immediatamente disattivati. E' stato quindi determinato l'ammontare di gruppi riducenti con metodica Nelson misurati come glucosio.

Sono stati ottenuti i seguenti valori di unità enzimatiche:

Fp-ase Celluclast 1.5L: $108 \mu\text{mol}_{\text{rid}}/(\text{mL}_{\text{preparato}} \cdot \text{min}) = 108 \text{ FPU}/\text{mL} = 0.79 \text{ FPU}/\text{mg}_{\text{proteina}}$

Fp-ase Novozym 188: $20 \mu\text{mol}_{\text{rid}}/(\text{mL}_{\text{preparato}} \cdot \text{min}) = 20 \text{ FPU}/\text{mL} = 0.12 \text{ FPU}/\text{mg}_{\text{proteina}}$

5.6 IDROLISI E FERMENTAZIONE

Nelle prove di idrolisi enzimatica e fermentazione con paglia *steam-esplosa*, sono stati impiegati dei reattori batch di taglia diversa. La maggior parte dei test è stata condotta in beute di Pyrex da 300 mL , sigillate per impedire l'evaporazione della fase liquida nel corso della reazione. Il controllo di temperatura e agitazione (150 rpm) è stato assicurato ricorrendo ad un incubatore munito di piastra oscillante.

Si è operato con un volume di fase liquida di 100 mL , mentre la percentuale di biomassa nel liquido è stata del 10% .

Il pH di reazione è stato 4.8 per le prove di idrolisi e 5.0 per quelle di fermentazione, allo scopo di operare nelle condizioni ottimali di funzionamento della miscela enzimatica (per la quale il *range* migliore di pH è di $4.5-5.0$) nonché di buona efficienza del lievito impiegato (*Saccharomyces cerevisiae*).

In tutti i casi, si è fatto uso di tampone acido acetico/acetato di sodio 50 mM .

Per le prove di fermentazione, è stato impiegato un terreno minimo di crescita del lievito, aggiunto in forma liofilizzata (SIGMA-Aldrich).

Il terreno è stato preparato aggiungendo alla fase liquida alcuni nutrienti, per l'apporto di azoto e fosforo necessario alla riproduzione del lievito: a 100 mL di soluzione si sono aggiunti 2.5 g/L di estratto di lievito, 0.25 g/L di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.025 g/L di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Relativamente all'ammontare di lievito, si è ricorso a un rapporto *microrganismo/biomassa secca* pari al 3% , quantitativo piuttosto elevato ma tale da ridurre al minimo la *lag-phase* (cioè la fase di adattamento del microrganismo al terreno) e da evitare un consumo eccessivo di glucosio nello stadio di accrescimento [11].

6. RIFERIMENTI

- 1) ITABIA; 1995, *Liquid biofuels production and use*; Final report from the Italian National team, ALTENER Programme.
- 2) ISES Italia; <http://www.isesitalia.it>
- 3) EEA; 1999, *Statistical Compendium for Europe's Environment: The Second Assessment and Istat 1998*, reported by ANPA.
- 4) Canadian renewable fuel association; <http://www.greenfuels.org>
- 5) Kuhad, R.C.; Sing, A.; Ericksson, K.-E.; 1997, *Microorganisms and Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls*, In *Advances in Biochemical Engineering: Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* Erksson, K.-E., ed. Springer-Verlag, New York, pp 45-125
- 6) Phyllis, database for biomass and waste, <http://www.ecn.nl/Phyllis>
- 7) FAO; <http://apps.fao.org>
- 8) P.De Castro, G. Pulina, G. Giardini; 1991; *Production and utilization of lignocellulosics*; edited by G.C. Galletti, Elsevier Applied Science, Pag 401-426,
- 9) N.Abatzoglou, E.Chornet, K.Belkacemi; 1992, Phenomenological kinetics of complex systems: The development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation; *Chem. Eng. Science*, **47**, 1109-1122
- 10) *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*; 1994, ACS Symposium Series, 566, M. E. Himmel, J.O. Baker, R. P. Overend editors.
- 11) R. Eklund, G. Zacchi; 1995, *Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam Exploded Willow*, *Enzyme and Microb. Technol.* **17**: 255-259.
- 12) K. L. Kadam, S. L. Schmidt; 1997, *Evaluation of Candida acidothermophilum in ethanol production from lignocellulosic biomass*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 709-713.
- 13) R. Navarro; 1994, *Effects of Furfural on Ethanol Fermentation by Saccharomyces cerevisiae: Mathematical Models*, *Curr. Microbiol.* **29**: 87-90.
- 14) M. Charles and J. Wilson, 1994 *Fermentor design*, in *Bioprocess Engineering*, John Wiley & Sons, Inc.
- 15) Mod. AOAC 7.009, Ash; ASTM D1102
- 16) Mod. CPPA G.13; TAPPI 13 m – 54; ASTM D 1106, D1107, D 1108
- 17) ASTM D 1107 Lignina Klason; Mod. TAPPI 250 per la determinazione della lignina acido solubile in legni e paste.
- 18) T. K. Ghose; 1987, *Measurement of Cellulase Activities*, *Pure & Appl. Chem.* **59**: 257-268.
- 19) M. Mandels, R. Andreotti, C. Roche; 1976, *Measurement of Saccharifying Cellulase*. *Biotech. Bioeng Symp.* **6**: 21-33.

7. RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato portato a termine grazie alla collaborazione continua e professionale dei Sigg.:

Cardinale Giovanni
Cardinale Mariangela
Nanna Francesco

Edito dall' **ENEA**
Unità Comunicazione e Informazione
Lungotevere Grande Ammiraglio Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma
Sito Web <http://www.enea.it>
Stampa Laboratorio Tecnografico - C.R. Frascati
Finito di stampare nel mese di settembre 2001