



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

***ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI LIEVITI DOTATI DI NUOVE PROPRIETÀ PER LA
PRODUZIONE DI BIOETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE***

Relatore:

Prof.ssa Marina Basaglia

Correlatore:

Dott. Lorenzo Favaro

Laureando:

Mariano Wilmer Luján Corro

Matricola n. 1037281

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

SOMMARIO

SOMMARIO	I
Elenco delle tabelle	II
Elenco delle figure	III
Lista delle abbreviazioni	IV
RIASSUNTO	V
ABSTRACT	VI
1.INTRODUZIONE	1
1.1.I biocarburanti	1
1.2.Il bioetanolo	4
1.2.1.Bioetanolo: caratteristiche e impieghi	7
1.2.2.Le materie prime per la produzione di bioetanolo	9
1.2.3.Le tecnologie e i processi di produzione	11
1.2.4.Lo scenario di produzione del bioetanolo	20
1.3.Bioetanolo di seconda generazione come semplificazione della filiera	24
1.4.Pre-trattamenti del materiale di partenza ed inibitori	30
1.5.Termotolleranza, uno dei caratteri più interessanti per un ceppo industriale di <i>S. cerevisiae</i>	34
1.6.Produzione di bioetanolo mediante processi CBP ed SSF ad alta temperatura	35
1.7.Scopi della tesi	38
2.MATERIALI E METODI	39
2.1.Ceppi microbici	39
2.2.Mezzi colturali	39
2.3.Isolamento di ceppi di lievito resistenti agli inibitori della fermentazione da vinaccia	40
2.3.1Identificazione dei ceppi di lievito	41
2.4.Valutazione del vigore fermentativo	42
2.5.Valutazione della tolleranza agli inibitori	43
3.RISULTATI E DISCUSSIONE	45
3.1.Valutazione del vigore fermentativo	45
3.2.Valutazione della tolleranza agli inibitori presenti negli idrolizzati lignocellulosici	50
4.CONCLUSIONI	57
5.BIBLIOGRAFIA	58

Elenco delle tabelle

Tabella 1.1. Bilancio energetico di biocarburanti secondo la materia prima di partenza (Cencic <i>et al.</i> , 2007)-----	3
Tabella 1. 2. Bilancio energetico del bioetanolo ottenuto da mais (Shapouri <i>et al.</i> , 2003)-----	3
Tabella 1. 3. Programmi di adozione dell'etanolo in alcune nazioni (Sánchez e Cardona, 2008)-----	5
Tabella 1. 4. Produzione mondiale, in migliaia di litri, di etanolo per autotrazione (<i>Renewable Fuels Association</i> , 2009)-----	7
Tabella 1. 5. Principali caratteristiche produttive delle colture alcoligene saccarifere e amidacee in Italia (Cencic <i>et al.</i> , 2007)-----	10
Tabella 1. 6. Principali caratteristiche produttive delle colture alcoligene lignocellulosiche in Italia (Cencic <i>et al.</i> , 2007)-----	11
Tabella 1. 7. Produzione media di residui colturali in Italia -----	11
Tabella 1. 8. Dati di produzione (in tonnellate) del bioetanolo nell'U.E.; i dati sono soggetti a un errore del +/-5% ¹ (Cencic <i>et al.</i> , 2007)-----	23
Tabella 1. 9. Materie prime e produzione in tonnellate di bioetanolo anidro in Italia nel 2005 (Cencic <i>et al.</i> , 2007)-----	24
Tabella 1. 10. Caratteristiche richieste/desiderabili per un ceppo di <i>S. cerevisiae</i> utilizzabile in un processo CBP (Lynd , 1996; Zaldivar <i>et al.</i> , 2001)-----	30
Tabella 1. 11 Concentrazione di alcuni inibitori presenti negli idrolizzati lignocellulosici ottenuti a partire da abete rosso, salice, grano, canna da zucchero, stocchi di mais (Almeida <i>et al.</i> , 2007)-----	34
Tabella 1. 12. Dati recenti sulla produzione di etanolo da materiali cellulosici ed emicellulosici con ceppi di lievito termotolleranti in sistema SSF o CBP ad elevata temperatura (Hasunuma e Kondo, 2012)-----	37
Tabella 2. 1. Ceppi microbici impiegati-----	39
Tabella 2. 2.Terreni colturali impiegati in laboratorio -----	39
Tabella 2. 3. Composizione mezzo MNS (Delfini, 1995)-----	40
Tabella 2. 4. Inibitori saggiati-----	43
Tabella 2. 5. Composizione dei <i>cocktail</i> utilizzati come inibitori-----	44
Tabella 3. 1. Vigore fermentativo, espresso in grammi di zucchero consumati per litro di mezzo colturale (glucosio 200g/l), di ceppi <i>S. cerevisiae</i> incubati a 25°C e 40 °C in MNS-----	46
Tabella 3. 2. Vigore fermentativo, espresso in grammi di zucchero consumati per 100 ml di mezzo colturale (glucosio 100g/l e xilosio 50g/l), di ceppi <i>S. cerevisiae</i> incubati a 25°C e 40 °C in MNS-----	49
Tabella 3. 3. Tolleranza di ceppi di lievito <i>S. cerevisiae</i> nei confronti di concentrazioni (g/l) crescenti di acidi deboli, idrossimetilfurfurale e furfurale aggiunti nel mezzo YNB in singolo o formulati nei <i>cocktail</i> A, B, C, D -----	52

Elenco delle figure

Figura 1. 1. Saab 9-5 alimentabile indifferentemente a benzina o con miscela a bioetanolo 85%. Fonte Saab Italia.	8
Figura 1. 2. Effetto del pre-trattamento sulla struttura della parete cellulare; a sinistra: biomassa tale, a destra: biomassa pretrattata.	15
Figura 1. 3. Materiale lignocellulosico sottoposto al pre-trattamento <i>steam explosion</i>	16
Figura 1. 4. Degradazione della cellulosa ad opera delle cellulasi. Fonte: Favaro L.	18
Figura 1. 5. Schema della disidratazione per pervaporazione (Pin e Vecchiet, 2008).	20
Figura 1. 6. Andamento della produzione mondiale di bioetanolo nel periodo 1975-2005 (Cencic <i>et al.</i> , 2007).	22
Figura 1. 7. Schema del modello SHF (<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>).	25
Figura 1. 8. Schema del modello SSF (<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>).	26
Figura 1. 9. Schema del modello SSCF (<i>Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation</i>).	27
Figura 1. 10. Schema del modello CBP (<i>Consolidated BioProcessing</i>).	28
Figura 1. 11. Schema delle semplificazioni di processo ottenute con il sistema CBP (<i>Consolidated BioProcessing</i>).	29
Figura 1. 12. Composizione media della biomassa lignocellulosica e principali prodotti derivati dalla sua idrolisi.	31
Figura 3. 1. Cinetica di fermentazione di ceppi <i>S. cerevisiae</i> incubati a 25°C (a) e 40 °C (b) in terreno colturale MNS contenente una miscela di glucosio (200 g/l). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.	47
Figura 3. 2. Cinetica di fermentazione di ceppi <i>S. cerevisiae</i> incubati a 25°C (a) e 40 °C (b) in terreno colturale MNS contenente una miscela di glucosio 100g/l e xilosio 50g/l. I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valore `inferiore al 5%.	50
Figura 3. 3. Tolleranza all'acido acetico (a) e acido formico (b) di ceppi <i>S. cerevisiae</i> cresciuti per 40 h in YNB, contenente concentrazioni crescenti di inibitore (1,80; 3,60; 5,40; 7,20 g/l e 0,61; 1,22; 1,83; 2,44 g/l rispettivamente). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.	54
Figura 3. 4. Tolleranza all'HMF (a) e al furfurale (b) di ceppi <i>S. cerevisiae</i> cresciuti per 40 h in YNB contenente concentrazioni crescenti di inibitore (0,94; 1,88; 2,81; 3.75 g/l e 0,69; 1,38; 2,08; 2,77 g/l rispettivamente). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.	55
Figura 3. 5. Tolleranza <i>cocktail</i> di ceppi <i>S. cerevisiae</i> cresciuti per 40 h in YNB contenente concentrazioni crescenti di inibitore (1,8; 3,6; 5,4; 7,2 g/l). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.	56

Lista delle abbreviazioni

AFEX	<i>Ammonia Fiber Explosion</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
Bio-ETBE	<i>bio-ethyl-ter-butyl ether</i>
Bio-MTBE	<i>bio-methyl-ter-butyl ether</i>
CBP	<i>Consolidated BioProcessing</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
DDGS	<i>Distillers Dried Grains with Soluble</i>
CMC	<i>Carbossimetilcellulosa</i>
DDGS	<i>Distillers Dried Grains with Soluble</i>
DO ₆₀₀	<i>Densità ottica a 600 nm</i>
ETP	<i>Energy Technology Perspectives</i>
FFV	<i>Fuel Flexible Vehicles</i>
FORSU	<i>Frazione organica dei rifiuti solidi urbani</i>
GBEP	<i>Global Bioenergy Partnership</i>
GHG	<i>Green House Gases</i>
HMF	<i>5-HydroxyMethyl-2-Furaldehyde</i>
IEA	<i>International Energy Agency</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MNS	<i>Must Nutrient Synthetic</i>
OD ₆₀₀	<i>Optical Desnsity to 600nm</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RPM	<i>Rivoluzioni per minuto</i>
SHF	<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>
SSCF	<i>Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation</i>
SSF	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>
YM	<i>Yeast Mould</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

RIASSUNTO

Il bioetanolo è considerato uno dei biocarburanti più promettenti nella prospettiva della riduzione della dipendenza dai combustibili fossili tradizionali e nel ridimensionamento dell'impatto ambientale. In particolare, il bioetanolo di seconda generazione si propone come una interessante opportunità ai fini ecologici, etici ed economici in cui biomasse eterogenee a basso valore commerciale che non competono con le principali colture alimentari vengono convertite in biocombustibile.

Dal punto di vista biotecnologico, la principale sfida è la definizione di un processo economicamente sostenibile per la conversione della biomassa lignocellulosica in etanolo. Lo sviluppo di un microrganismo CBP (*Consolidated BioProcessing*) capace di idrolizzare i polimeri complessi della biomassa e di convertirli efficacemente in etanolo è una delle strategie più interessanti del panorama scientifico internazionale. Un ceppo microbico CBP dovrebbe inoltre tollerare le sostanze inibenti che potrebbero essere presenti nei substrati lignocellulosici di partenza (acido organici, furani, aldeidi). La termotolleranza è un altro carattere molto importante per un lievito industriale.

In questo lavoro di tesi si è eseguito un programma di arricchimento di lieviti altamente fermentanti e fortemente tolleranti a partire da vinaccia d'uva addizionata di un cocktail di inibitori e di un elevato tenore zuccherino. La strategia si è rivelata ottimale consentendo di isolare ceppi di *S. cerevisiae* con elevato vigore fermentativo e notevole tolleranza nei confronti di differenti inibitori.

Questo studio pone le basi per lo sviluppo di un lievito per la conversione di residui lignocellulosici in etanolo. Le promettenti attività fermentative, le incoraggianti capacità di tollerare elevate concentrazioni di inibitori e la termotolleranza riscontrate in alcuni lieviti isolati in questo lavoro di tesi consentono di ipotizzare a buon diritto un loro impiego in un impianto industriale per la produzione di bioetanolo di seconda generazione.

ABSTRACT

Bioethanol is considered one of the most promising biofuels in order to reduce dependence on traditional fossil fuels and their negative environmental impact. In particular, the second-generation bioethanol is proposed as an exciting opportunity for ecological, ethical and economic systems in which heterogeneous biomass, characterized by low commercial value that do not compete with the major food crops are converted into biofuel.

From the point of view of biotechnology, the main challenge is the definition of an economically viable process for the conversion of lignocellulosic biomass into ethanol. The development of a micro-organism CBP (Consolidated Bioprocessing) capable of hydrolyzing the complex polymers of biomass and convert it efficiently into ethanol is one of the most interesting strategies of the international scientific community. A microbial strain CBP should also tolerate the inhibitory substances which may be present in lignocellulosic substrates of departure (organic acid, furans, aldehydes). The thermotolerance is an other important character and it is very important for an industrial yeast.

In this work it was possible to run a program of enrichment of highly fermenting and highly tolerant yeast from grape marc supplemented with a cocktail of inhibitors and high sugar concentrations. The strategy proved to be optimal allowing to isolates trains of *S. cerevisiae* with high fermenting abilities and inhibitors tolerance.

The preliminary results of this study could pave the way for the development of a yeast for the conversion of industrial residues into ethanol. The promising fermentative abilities and the tolerance to high concentrations of inhibitors showed by few yeasts may be of great interest towards their application in industrial plants for bioethanol production

1. INTRODUZIONE

1.1. I biocarburanti

L'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) definisce i biocarburanti come “carburanti solidi, liquidi o gassosi prodotti per conversione di biomasse” (OECD, 2002). Tradizionalmente il loro impiego è legato al settore dei trasporti in sostituzione dei combustibili fossili. Rispetto all'accezione classica, tuttavia, nel corso degli ultimi anni si è assistito a una rapida espansione del campo di applicazione dei biocarburanti in direzione della generazione elettrica e termica con particolare attenzione verso la co-generazione.

Nella definizione attuale di biocarburante, pertanto, si è superato il legame con il settore dei trasporti e si dà una maggiore enfasi all'eterogeneità delle applicazioni, consentite dall'impiego dei motori endotermici. In base allo stato di maturità delle tecnologie di produzione e utilizzo, i biocarburanti si distinguono in due categorie (Eisentraut, 2010):

- *I biocarburanti di prima generazione:* sono quelli prodotti principalmente di colture alimentari come semi, canna di zucchero e oli vegetali. Comprendono il biodiesel, gli oli vegetali puri, il bioetanolo prodotto dai cereali e dalle materie prime zuccherine, il bio-ETBE (*bio-ethyl-ter-butylether*) prodotto dal bioetanolo e il biogas. La loro produzione e le loro applicazioni, già avviate su scala industriale, presentano margini di miglioramento riguardo la riduzione dei costi di produzione, l'ottimizzazione del bilancio energetico, l'incremento dei rendimenti energetici dei motori e l'aumento delle percentuali di utilizzo in miscela con i combustibili fossili;
- *I biocarburanti di seconda generazione:* in base alla scelta delle materie prime e la tecnica di coltivazione, i carburanti di seconda generazione hanno il potenziale di fornire ulteriori vantaggi quali l'impiego di biomasse residuali come substrato di partenza e la possibilità di utilizzare, in alternativa, terreni marginali per la produzione di *energy crop*, specie vegetali capaci di produrre un elevato quantitativo di biomassa vegetale anche con input colturali ridotti e/o assenti. Comprendono il bioetanolo prodotto da materie prime lignocellulosiche, il bioidrogeno, il *syngas*, il biometanolo, il biodimetilene, il bio-MTBE (*Biomethyl-ter-butylether*), il bio-butanolo e il diesel sintetico, ottenuto attraverso la reazione Fischer-Tropsch. La loro produzione non è

applicabile su scala industriale, ma è ancora oggetto di studio in impianti sperimentali e di laboratorio.

I biocarburanti di seconda generazione sono accomunati dalla possibilità di essere prodotti a partire dalle biomasse lignocellulosiche a costo di reperimento nullo o ridotto. Sebbene le tecnologie produttive non siano ancora ottimizzate, i biocombustibili di seconda generazione sono considerati molto promettenti, poiché costituiscono uno strumento concreto per la riduzione del costo di produzione dei biocarburanti, che attualmente sono penalizzati rispetto ai concorrenti fossili e non possono essere svincolati dalle misure di aiuto previste dalle politiche di agevolazione economica e fiscale.

I biocarburanti di seconda generazione non sono ancora prodotti in forma commerciale, ma un numero considerevole di progetti pilota e impianti dimostrativi sono stati annunciati negli ultimi anni, con attività di ricerca che si svolgono principalmente in Nord America, Europa e alcuni paesi emergenti come esempio Brasile, Cina, India e Thailandia (Eisentraut, 2010). Le attuali proiezioni della IEA (*International Energy Agency*) vedono un rapido aumento della domanda di biocarburanti, in particolare quelli di seconda generazione, in un settore energetico che mira a stabilizzare la concentrazione di CO₂ atmosferico pari a 450 parti per milione (ppm) (IEA, 2008).

In Tabella 1.1 sono riportati i bilanci energetici dei più comuni combustibili di prima e seconda generazione: per bilancio energetico si intende il rapporto tra l'energia fornita dal biocarburante e l'energia utilizzata nel suo processo produttivo. In linea di principio, più elevato è questo rapporto, maggiore è il beneficio energetico che il biocarburante permette di conseguire. A titolo semplificativo, in Tabella 1.2 è riportato il bilancio energetico dell'etanolo ottenuto a partite dal mais.

Tabella 1.1. Bilancio energetico di biocarburanti secondo la materia prima di partenza (Cencic *et al.*, 2007)

Biocarburante	Bilancio energetico	
	senza sottoprodotti*	con sottoprodotti*
Biodiesel dal girasole	2,0	3,1
Biodiesel dal colza	1,7	3,0
Oli vegetali puri dal girasole	2,8	4,3
Oli vegetali puri dal colza	1,8	3,4
Bioetanolo dalla barbabietola	1,1	2,2
Bioetanolo dal sorgo zuccherino	1,2-1,4	2,4
Bioetanolo dal mais	1,0-1,1	2,2-2,5
Bioetanolo dalle biomasse lignocellulosiche	1,8	5,6
Bio-ETBE dalla barbabietola	0,8	1,2
Bio-ETBE dal sorgo zuccherino	1,0	1,7
Bio-ETBE dal mais	0,8	1,2
Bio-ETBE dalle biomasse lignocellulosiche	1,1	1,5
Biogas	2,5-6,7	-

* come sottoprodotti si intendono sia le biomasse residuali della produzione agraria, sia i residui organici ottenuti dalla preparazione industriale del biocarburante.

Tabella 1. 2. Bilancio energetico del bioetanolo ottenuto da mais (Shapouri *et al.*, 2003)

Studio (anni)	Mais resa (t/ha)	Concime Azotato: tassodi applic. (kg/ha)	Produzione di concime azotato (MJ/kg)	Tasso di conversione mais etanolo (l/kg)	Processo conversione etanolo (MJ/l)	Uso di energia totale (MJ/l) ^(a)	Crediti energia coprodotti (MJ/l)	Valore energia netta (MJ/l)
Pimentel (1991)	6,90	152	17,97	0,373	20,54	36,52 (LHV)	5,99	-9,34
Pimentel (2001)	7,97	145	16,05	0,373	20,94	36,53 (LHV)	5,99	-9,35
Keeneye								
DeLuca (1992)	7,47	151	18,16	0,381	13,51	25,42 (LHV)	2,25	-2,35
Marlande								
Turhollow (1990)	7,47	142	14,90	0,373	13,97	20,61 (HHV)	2,27	5,06
Lorenz e								
Morris (1995)	7,53	138	13,21	0,38	15,04	22,60 (HHV)	7,69	8,53
Ho (1989)	5,65	NR	NR	NR	15,89	25,09 (LHV)	2,93	-1,11
Wang <i>et al.</i> (1999)	7,84	147	10,09	0,38	11,39	19,08 (LHV)	4,17	6,27
AAFC (1999)	7,28	140	NR	0,401	14,05	19,01 (HHV)	3,92	8,31
Shapouri <i>et al.</i> (1995)	7,65	125	10,06	0,377	14,85	23,09 (HHV)	4,20	4,31
Shapouri <i>et al.</i> (2003)	7,84	145	8,80	0,396	14,43	21,53 (HHV)	4,01	5,88

^(a) Il punto medio o media è usato quando gli studi riportano un rango di valori.

LHV Low heat value = basso valore di calore = 21,18 MJ/l di etanolo. Keeney e DeLuca (1992) usarono 20,82 MJ/l di etanolo.

HHV High heat value = alto valore di calore = di etanolo. Lorenz e Morris (1995) usarono 23,44 MJ/l di etanolo.

NR Non reported = non riportato.

I biocarburanti di prima generazione più promettenti sono il biodiesel dal girasole e gli oli vegetali puri, mentre, tra quelli di seconda generazione, il bioetanolo dalle biomasse lignocellulosiche (ad es. tutoli di mais, paglia di frumento) si dimostra come il migliore (Cencic *et al.*, 2007).

1.2. Il bioetanolo

All'apertura dei lavori della *Energy Technology Perspectives* (ETP) a Tokyo nel giugno 2008, il Direttore esecutivo della IEA, Nobuo Tanaka ha pronunciato queste parole "Il mondo fronteggia la scoraggiante combinazione di un aumento della domanda energetica, aumento delle emissioni di gas serra e riduzione di risorse. Una rivoluzione globale delle tecnologie energetiche è necessaria e realizzabile, ma rappresenta un'ardua sfida" (IEA, 2008).

Recentemente, la produzione di molti biocarburanti di prima generazione hanno attirato dure critiche in relazione alla sua sostenibilità. Da una parte, l'aumento dei prezzi dei prodotti agricoli hanno innescato grandi dibattiti su come produrlo senza inficiare le produzioni alimentari. D'altra parte, il rilascio di gas a effetto serra (*green house gases*, GHG) associato a cambiamenti nell'utilizzo del territorio hanno portato a discussioni controverse sull'efficacia di questi carburanti per ridurre l'emissione globale di anidride carbonica (Eisentraut, 2010). D'altra parte il consumo di energia è aumentato rapidamente nell'ultimo secolo, la popolazione mondiale è cresciuta e un numero sempre maggiore di nazioni si sono industrializzate. Il petrolio grezzo è diventato la principale risorsa per soddisfare l'aumento della domanda di energia.

Campbell e Laherrere (1998), utilizzando differenti tecniche per stimare la dimensione delle riserve di petrolio conosciute e ancora da scoprire, hanno concluso che il declino della produzione mondiale di petrolio grezzo avrà inizio prima del 2015. Hanno previsto inoltre che la produzione annuale di petrolio passerà dagli attuali 25 miliardi di barili a circa 5 miliardi di barili entro il 2050. Dato che l'economia mondiale dipende pesantemente dal petrolio è inevitabile che questa prossima riduzione avrà gravi conseguenze. Per questo motivo la ricerca di nuove fonti alternative di energia suscita un grande interesse.

Durante gli ultimi 150 anni, le attività umane hanno causato un drammatico aumento della quantità di emissione di molti gas serra che hanno profondamente modificato gli equilibri nell'atmosfera e conseguentemente anche quelli climatici. In questo periodo il contenuto di CO₂ nell'aria è aumentato da 280 ppm a 365 ppm. Le nazioni aderenti all'OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) contribuiscono per più della metà sul totale delle

emissioni mondiali di CO₂. Gli Stati Uniti sono una delle nazioni con il più alto livello di emissioni, con oltre 20000 kg annui di CO₂ pro capite (Palmarola *et al.*, 2005). Il settore dei trasporti è responsabile della maggior parte di queste emissioni il cui valore aumenta di anno in anno.

Un modo per ridurre gli effetti ambientali e la dipendenza dai combustibili fossili è di usare combustibili rinnovabili quali i biocarburanti. L'utilizzo dei biocarburanti comporterebbe importanti effetti economici e sociali. Ad esempio, Sheehan e Himmel (1999) hanno dimostrato che la diversificazione del portafoglio dei carburanti farebbe rientrare nell'economia degli Stati Uniti capitali e lavoro. Inoltre, lo sviluppo di coltivazioni specifiche per la produzione di biocarburanti garantirebbe anche una crescita del lavoro nel settore agricolo. Quest'analisi è valida per tutte le nazioni in via di sviluppo, soprattutto considerando la prospettiva di una drastica riduzione di disponibilità di petrolio nel medio termine.

Il bioetanolo prodotto da materie prime alimentari di diverso tipo è considerato uno dei più promettenti biocarburanti dal punto di vista energetico ed ambientale. Molti paesi hanno peraltro implementato dei programmi d'integrazione di benzina con etanolo (Tabella 1.3).

Tabella 1.3. Programmi di adozione dell'etanolo in alcune nazioni(Sánchez e Cardona, 2008)

Nazione	Derrate	Etanolo/benzina (% v/v)	Annotazioni
Brasile	Canna da zucchero	24	Programma <i>Pro Alcool</i> ; etanolo non-anidro sostituisce la benzina
Stati Uniti	Mais	10	Incentivi fiscali; sono inoltre disponibili miscele all'85%
Canada	Mais, grano, orzo	7,5-10	Incentivi fiscali; programmi regionali mirano al rispetto del Protocollo di Kyoto
Spagna	Grano, orzo	-	Produzione di ETBE da etanolo; possibile la miscelazione diretta con benzina
Francia	Barbabietola, grano	-	Produzione di ETBE da etanolo; possibile la miscelazione diretta con benzina
Svezia	Grano	5	Disponibili miscele all'85%; non produce ETBE
Cina	Mais, grano	-	Uso sperimentale di etanolo come carburante nelle regioni del nord-est e centrali
India	Canna da zucchero	5	Miscela di etanolo sono obbligatorie in 9 stati
Tailandia	Cassava, riso	10	Miscela di etanolo sono obbligatorie
Sud Africa	Canna da zucchero, mais	-	Obiettivo di produzione 1.1 miliardi di litri/anno entro il 2016.

Oltre che ad una ridotta emissione nell'atmosfera di CO₂, la combustione del bioetanolo presenta anche una minore emissione d'idrocarburi incombusti, di monossido di carbonio (CO), di ossidi di azoto (NO_x) e di vari altri composti organici volatili (Bailey, 1996). Ciò nonostante, le maggiori emissioni di aldeidi reattive, come l'acetaldeide e la formaldeide, destano preoccupazioni a livello ambientale; a questo riguardo, il fattore chiave sarà la durata e l'efficienza dei sistemi catalitici per l'abbattimento delle aldeidi.

Ad oggi, tutte le auto con catalizzatore possono utilizzare una miscela di benzina al 90% e 10% di etanolo (E10) senza modifiche al motore. I modelli di auto più recenti possono utilizzare miscele contenenti fino al 20% di etanolo. Ci sono anche dei nuovi motori che possono usare etanolo puro, come anche i così detti *flexible fuel vehicles* in grado di funzionare con miscele variabili dallo 0% all'85% di etanolo in benzina (E85). Inoltre l'etanolo può rimpiazzare il gasolio nei motori a "ciclo Diesel", utilizzando un emulsionante adatto.

L'etanolo viene utilizzato in diversi modi anche se ad oggi la sua principale applicazione è quella di additivo ossigenato per carburanti (Wheals *et al.*, 1999). Mescolando etanolo con benzina si ottengono diversi vantaggi, l'alto numero di ottani dell'etanolo (96-113) aumenta il numero di ottani della miscela, riducendo la necessità di additivi antidetonanti tossici usati per aumentare gli ottani. Inoltre l'etanolo fornisce ossigeno alla combustione, questo si traduce in ridotte emissioni di CO e d'idrocarburi incombusti. Bailey (1996) ha dimostrato che l'etanolo ha la stessa efficienza complessiva nei motori "ciclo Diesel", ma circa il 15% in più di efficienza rispetto alla benzina nei motori "ciclo Otto" ottimizzati per l'etanolo.

Negli ultimi anni la produzione di bioetanolo è aumentata perché molte nazioni sono interessate a ridurre le importazioni del petrolio e nello stesso tempo promuovere l'economia rurale e migliorare la qualità dell'aria. Nel 2008, la produzione mondiale ha raggiunto i 69,1 miliardi di litri (Tabella 1.4), di cui i produttori principali sono gli Stati Uniti ed il Brasile, in questo anno gli Stati Uniti ha prodotto 34,1 miliardi di litri, nel 2009 la produzione è stata di 40,1 miliardi di litri, arrivati a 50,1 nel 2010. Come secondo produttore, il Brasile ha prodotto, nel 2008, 24,5 miliardi di litri di bioetanolo da canna da zucchero e nel 2009 circa 24,9 miliardi di litri. Considerati insieme, Stati Uniti e Brasile producono più del 90% della bioetanolo mondiale, mentre i paesi asiatici, nello stesso anno 2008, hanno registrato una produzione di circa 6,5 miliardi di litri, con Cina ed India *leader* del settore (*Renewable Fuels Assosiation*, 2009).

Nel 2008 fra i paesi dell'Unione Europea, la Francia ha prodotto quasi 1 miliardo di litri, seguita dalla Germania con 568 milioni. In Italia l'industria del bioetanolo non è ancora

sviluppata ed il poco etanolo prodotto è derivato utilizzando derrate alimentari nazionali in eccedenza (vino, melassa, barbabietola da zucchero, cereali).

Mediamente nel mondo il 73% dell'etanolo viene prodotto a scopo energetico, il 17% alimentare e il 10% per usi industriali.

Tabella 1. 4. Produzione mondiale, in migliaia di litri, di etanolo per autotrazione (*Renewable Fuels Association, 2009*)

Nazione	2008	2007
1. USA	34 068	24 600
2. Brasile	24 500	19 000
3. Cina	3 800	3 777
4. Unione Europea	2 777	2 159
di cui:		
Francia	1 000	539
Germania	568	394
Spagna	317	348
Svezia	78	120
Italia	60	60
5. India	1 900	1 640
6. Canada	900	800
7. Sud Africa	386	330
8. Thailandia	340	300
9. Colombia	300	284
10. Australia	100	100
11. Altri	100	82
Totale	69 171	53 072

1.2.1. Bioetanolo: caratteristiche e impieghi

Il bioetanolo è alcool etilico (C_2H_5OH), prodotto dalla fermentazione degli zuccheri presenti nelle biomasse, ed è caratterizzato da un elevato contenuto energetico (27 MJ/kg). Ha un comportamento simile alla benzina e può sostituirla nell'alimentazione dei motori a "ciclo Otto". Uno dei parametri di maggiore importanza agli effetti di questo utilizzo è il potere antidetonante, espresso dal numero di ottani: è superiore a quello della benzina e consente un risparmio nel ricorso agli antidetonanti. L'utilizzo nei motori a "ciclo Diesel" in sostituzione

del gasolio è un'opportunità, che si sta delineando concretamente e potrà essere realizzata nel medio termine.

Nell'Unione Europea allo stato attuale il bioetanolo è utilizzato in miscela al 5% in volume con la benzina, mentre negli Stati Uniti e in Canada la percentuale è estesa al 20%. La tecnologia FFV (*Fuel Flexible Vehicles*) ha consentito la diffusione in alcuni Paesi europei (Francia, Svezia, Germania) di veicoli a doppio sistema di alimentazione, a benzina e a bioetanolo all'85% in volume con la benzina (Figura 1.1). In Brasile il bioetanolo azeotropo è utilizzato puro nei veicoli predisposti.



Figura 1. 1. Saab 9-5 alimentabile indifferentemente a benzina o con miscela a bioetanolo 85%. Fonte Saab Italia.

L'impatto ambientale dell'impiego del bioetanolo è più contenuto rispetto a quello esercitato dai combustibili fossili, in termini di emissione in atmosfera di composti inquinanti (particolato, monossido di carbonio, anidride solforosa) e di gas serra, soprattutto perché questo biocarburante è molto ossigenato. In particolare il risparmio nelle emissioni di CO₂, considerando anche la fase produttiva, è del 15-60%, a seconda della materia prima usata; il bioetanolo, infatti, può essere prodotto a partire da molteplici biomasse vegetali, residuali e/o provenienti da colture dedicate. Le materie prime possono essere suddivise, a seconda del tipo di carboidrato che contengono, in saccarifere (contengono prevalentemente zuccheri semplici), amidacee (prevalentemente amido) e lignocellulosiche (contengono prevalentemente cellulosa ed emicellulosa). Le colture saccarifere tradizionalmente utilizzate, sono la barbabietola in Europa e la canna in Brasile. In Italia il sorgo zuccherino appare promettente, in virtù della sua plasticità e del modesto fabbisogno idrico. Tra le colture amidacee, la più diffusa, soprattutto negli Stati Uniti, è il mais. L'impiego delle biomasse lignocellulosiche è una prospettiva che si ritiene potrà essere concretizzata in un arco temporale di 7-10 anni.

La filiera produttiva del bioetanolo dipende dalla materia prima utilizzata. Nel caso si ricorra alle biomasse saccarifere, si procede prima con l'estrazione degli zuccheri dai tessuti vegetali preposti all'accumulo, con la fermentazione dell'estratto zuccherino, e alla fine con la distillazione e la disidratazione del bioetanolo. Nell'ipotesi che si impieghino materie prime amidacee, a monte della fermentazione la fase di estrazione è sostituita dalla macinazione della granella e dall'idrolisi dell'amido. La valorizzazione delle materie prime lignocellulosiche complica la filiera, poiché prima della fermentazione si rendono necessarie le fasi di pre-trattamento della biomassa, quali la separazione della lignina e l'idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa. Maggiori dettagli sono riportati nei capitoli successivi.

1.2.2. Le materie prime per la produzione di bioetanolo

Il bioetanolo di prima generazione è prodotto dalle materie prime di natura zuccherina e amidacea, derivanti sia dalle colture dedicate, sia dai residui agricoli e dell'industria agroalimentare. Sono comunemente denominate alcoligene le colture destinate a fornire prodotti agricoli, il cui impiego si colloca nella filiera del bioetanolo, in virtù del loro elevato contenuto in carboidrati. Quelle ritenute più indicate alle condizioni pedo-climatiche italiane sono la barbabietola da zucchero e il sorgo zuccherino, per quanto riguarda le saccarifere, e il mais, per quanto concerne le amidacee. In Tabella 1.5 sono riportate le caratteristiche produttive di maggiore interesse delle colture alcoligene saccarifere e amidacee in Italia. Nell'ottica di inserimento di queste colture nelle filiere agro energetiche.

I residui agroalimentari, attualmente convertiti in bioetanolo, derivano dalla fermentazione del melasso, sottoprodotto della filiera per la produzione dello zucchero, dalla distillazione delle eccedenze del vino e delle materie vinose e dalla fermentazione delle eccedenze di frutta (distillazioni obbligatorie ai sensi dell'art. 27 e di crisi ai sensi dell'art. 30 del Regolamento della Comunità Europea n. 1493/1999).

Tabella 1. 5. Principali caratteristiche produttive delle colture alcoligene saccarifere e amidacee in Italia (Cencic *et al.*, 2007)

Coltura Alcoligena	Produzione* [t/ha]	Superfici coltivate [ha]	Contenuto carboidrati* [% in peso]	Resa media etanolo [t/ha]	Produzione potenziale etanolo[t]
Barbabietola da zucchero	47 (radici)	84 181	18	4,5	378 817
Sorgo zuccherino	25 (steli)	32 931	15	3,9	128 432
Mais	11 (granella)	996 524	70	3,4	3 388 181

*Valore medio.

La produzione del bioetanolo di seconda generazione, ossia quello ottenuto dalle materie prime lignocellulosiche, attualmente ha luogo soltanto su scala pilota, poiché sono in corso di ottimizzazione le principali fasi della filiera. La complessità dell'impiego di queste materie prime è dovuta soprattutto all'elevata recalcitranza dei polisaccaridi in esse contenuti (cellulosa ed emicellulosa) ad essere idrolizzati in zuccheri fermentescibili.

Le materie prime lignocellulosiche per la produzione del bioetanolo possono provenire da colture dedicate o da biomasse residuali; le colture alcoligene lignocellulosiche ritenute più idonee alle condizioni pedo-climatiche italiane sono il sorgo da fibra, che garantisce anche la produzione di granella ricca in amido, la canna comune e il panico (Tabella 1.6). Le biomasse residuali, che possono essere utilizzate per la produzione del bioetanolo, sono tra le altre i residui agroforestali e la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU).

In questo scenario, la produzione di bioetanolo di “seconda generazione”, ottenuto in modo sostenibile sia dal punto di vista economico che ambientale, rappresenta un metodo di produzione di biocarburanti dalle elevate potenzialità; tale strategia consentirebbe infatti di ridurre la forte competizione verso le produzioni alimentari e zootecniche e di valorizzare le biomasse disponibili a basso costo (Tabella 1.7).

Tabella 1. 6. Principali caratteristiche produttive delle colture alcoligene lignocellulosiche in Italia (Cencic *et al.*, 2007)

Coltura alcoligena	Produzione* [t/ha]	Contenuto in carboidrati* [% in peso]
Sorgo da fibra	25	11 (cellulosa) 18 (emicellulosa)
Canna comune	6 (granella)	30 (amido) 31 (cellulosa) 22 (emicellulosa)
Panico	25 17	31 (cellulosa) 20 (emicellulosa)

*Valore medio.

Tabella 1. 7. Produzione media di residui colturali in Italia

Residuo colturale	Produzione media [t/ha]
Paglia di frumento tenero	3-6
Paglia di frumento duro	3-5
Paglia di altri cereali autunno-vernini	3-5,5
Paglia di riso	3-5
Stocchi di mais	4,5-6
Tutoli e brattee di mais	1,5-2,5
Sarmenti di vite	3-4
Frasche di ulivo	1-2,5
Residui di fruttiferi	2-3

1.2.3. Le tecnologie e i processi di produzione

Poiché il bioetanolo è ottenuto nel corso della fermentazione alcolica dei carboidrati, per la sua produzione possono essere impiegate materie prime molto eterogenee, sia di natura residuale, sia ricavate dalle colture dedicate (Pin e Vecchiet, 2008).

Tra esse meritano di essere ricordate:

- *materie prime ricche in zucchero semplici (i.e. glucosio, saccarosio, fruttosio, fruttani):* il melasso, i sottoprodotti della produzione orto-frutticola e vinicola, la barbabietola da zucchero, il sorgo zuccherino, la canna da zucchero, il topinambur;
- *materie prime ricche in amido:* i residui della lavorazione della patata, i cereali, la cassava;
- *materie prime ricche in cellulosa ed emicellulosa:* i residui agro-forestali, la frazione organica dei FORSU, la canna comune, il miscanto, il sorgo da fibra, il pioppo.

L'eterogeneità delle materie prime di partenza si traduce in una notevole differenziazione dei processi produttivi. Per questa ragione, la loro trattazione è affrontata, articolando la filiera produttiva in tre sezioni:

- *saccarifera*, per la trasformazione delle materie prime ricche in zuccheri semplici;
- *amidacea (o amilacea)*, per il trasformazione delle materie prime ricche in amido;
- *ligno-cellulosica (bioetanolo di seconda generazione)*, per la conversione delle materie prime ricche in cellulosa ed emicellulosa.

Le tre sezioni della filiera differiscono in misura significativa, sia per i contenuti tecnologici (modesti per la sezione saccarifera, molto elevati per la sezione ligno-cellulosica), sia per la maturità del processo (ottima per la sezione saccarifera ed amidacea, scarsa per la sezione ligno-cellulosica). La divergenza tra i processi si attenua fortemente nella fase di post-fermentazione (distillazione e disidratazione).

Sezione saccarifera

La sezione saccarifera per la produzione del bioetanolo consta di processi produttivi più semplici rispetto a quella delle altre sezioni della filiera, poiché le materie prime contengono i carboidrati già in forma fermentescibile (glucosio, fruttosio, saccarosio).

In primo luogo, gli zuccheri devono essere estratti dal substrato. Questa fase è necessaria nell'ipotesi di utilizzare le colture saccarifere dedicate, mentre non è richiesta nel caso della

valorizzazione delle biomasse residuali. L'estrazione è condotta con modalità diverse a seconda della coltura impiegata, dopo l'estrazione, il succo zuccherino è avviato alla fermentazione.

Nella barbabietola, ad esempio, gli zuccheri sono accumulati nella radice a fittone nella percentuale media del 18% in peso come sostanza secca e sono estratti alla temperatura di 70-80 °C per diffusione in soluzione acquosa o nel succo zuccherino diluito, previa riduzione a fette dei fittoni. Il sottoprodotto dell'estrazione è la polpa che, una volta essiccata, può essere utilizzata nell'alimentazione zootecnica.

Il sorgo zuccherino invece è raccolto allo stadio in cui gli zuccheri risultano accumulati nei tessuti dello stelo e raggiungono la percentuale del 11% in peso come sostanza secca. In considerazione dell'elevata fermentescibilità della biomassa raccolta, sono state sviluppate diverse strategie per migliorarne la conservabilità. Una soluzione adottata prevede l'estrazione immediata degli zuccheri e la concentrazione dell'estratto dai 16 °Brix iniziali ai 60 °Brix, livello in cui l'attività microbica risulta inibita. Una strategia alternativa prevede l'insilamento di tutta la biomassa raccolta, per favorire la parziale degradazione delle componenti polisaccaridiche (amido della granella eventualmente presente, cellulosa ed emicellulosa degli steli e delle foglie) presenti insieme agli zuccheri semplici. Al termine dell'insilamento, la biomassa è sottoposta all'estrazione. L'estrazione può essere condotta ricorrendo a molteplici soluzioni tecniche, accomunate, tuttavia, da un elevato consumo idrico, indicativamente 0,4 Kg di acqua per chilogrammo di sorgo. Il sottoprodotto dell'estrazione del sorgo è la bagassa, che può essere valorizzato come fertilizzante o recuperato per la produzione di energia termica, previa essiccazione.

Sezione amidacea

Questa sezione della filiera è caratterizzata dall'esigenza di trasformare l'amido, contenuto nella granella, in zuccheri fermentescibili mediante la reazione di idrolisi. In primo luogo, è prevista la macinazione della granella, finalizzata a ridurre la granulometria del materiale per massimizzare la resa della successiva fase di idrolisi enzimatica. La macinazione può essere condotta secondo due modalità:

- Macinazione per via secca: la granella è sottoposta a triturazione meccanica e, solo successivamente, è miscelata ad acqua;

- Macinazione per via umida: la granella è pretrattata con una soluzione di anidride solforosa allo 0,1-0,2% in peso per 24-48 ore e alla temperatura di 50 °C. Al termine del pre-trattamento, l'amido è separato dalle altre componenti mediante macinazione. Questa soluzione tecnica è più costosa e richiede più energia della precedente, ma è preferita per l'elevata purezza dell'amido ottenuto.

Il sottoprodotto della macinazione è caratterizzato da un elevato potere nutrizionale, in virtù dell'alto contenuto in proteine, fibre e grassi. Il trattamento esclusivamente meccanico della macinazione per via secca garantisce un sottoprodotto qualitativamente superiore. Nella sezione amidacea il residuo della macinazione è generalmente unito a quello della distillazione, contenente lievito e zuccheri, per formare un sottoprodotto unico, denominato DDGS (*Distillers Dried Grains with Soluble*) e destinato all'alimentazione animale. Alla macinazione fa seguito la fase di idrolisi dell'amido. La scissione delle catene di amido in glucosio è ottenuta mediante l'impiego di enzimi idrolitici e avviene in due fasi. La prima fase, detta *liquefazione*, è finalizzata a ridurre la lunghezza delle catene dell'amido e si avvale dell'utilizzo di α -amilasi commerciali. La seconda fase, denominata *saccarificazione*, consente la liberazione degli zuccheri fermentescibili (principalmente glucosio) e avviene ad opera della glucoamilasi. Al termine dell'idrolisi si procede con la fermentazione alcolica.

Sezione ligno-cellulosica

La biomassa ligno-cellulosica è composta principalmente da cellulosa (40-50% in peso), emicellulosa (20-25% in peso) e lignina (15-30 in peso); sono presenti, inoltre le ceneri (1-5% in peso) secondo come è mostrato in Figura 1.2 (Pin e Vecchiet, 2008).

La sezione lignocellulosica per la produzione del bioetanolo è gravata da una complessità che, ad oggi, la penalizza rispetto alle altre sezioni della filiera, e che ne giustifica l'attuale stato di immaturità tecnologica. Nella parete cellulare, infatti, l'emicellulosa e la cellulosa, convertibili in bioetanolo, sono saldamente strutturate con la lignina, non trasformabile per via microbica in alcool etilico. Alcuni zuccheri semplici, liberati nel corso della degradazione dell'emicellulosa (xilosio, arabinosio, mannosio), inoltre, risultano difficilmente fermentescibili per la maggior parte dei ceppi di lievito normalmente utilizzati per la produzione di bioetanolo. La ricerca scientifica sta mettendo in atto importanti investimenti in questo settore per il superamento di numerosi ostacoli (Lynd *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2006).

Il pre-trattamento della biomassa è di fondamentale importanza per disgregare la struttura della parete cellulare e separare la cellulosa e l'emicellulosa dalla lignina (Figura 1.2).

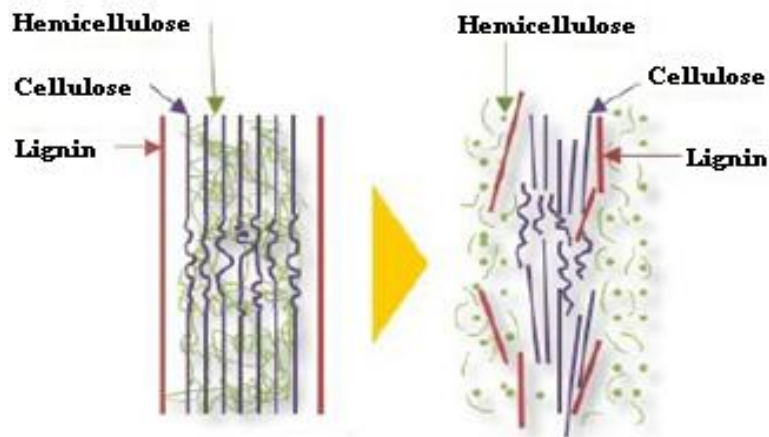


Figura 1. 2. Effetto del pre-trattamento sulla struttura della parete cellulare; a sinistra: biomassa tal quale, a destra: biomassa pretrattata.

Il pre-trattamento può essere condotto secondo diverse modalità:

- Con NaOH: la soda è impiegata in soluzione acquosa al 8-12% in peso; il pre-trattamento è condotto alla temperatura di 80-120 °C e ha una durata di 30-60 minuti. Questa soluzione tecnica è gravata dagli elevati costi, legati all'impiego di reagenti chimici e alle misure di sicurezza nelle fasi di stoccaggio e manipolazione;
- Tramite *steam explosion*: la biomassa è saturata con acqua, per azione del vapore acqueo a pressione (1,5-4,0 MPa) e temperature elevate (180-230 °C) per un tempo variabile (1-10 minuti). La biomassa è successivamente estrusa in un reattore a pressione atmosferica, dove subisce una rapida espansione. Le condizioni imposte hanno anche l'effetto di innescare una parziale idrolisi delle catene di cellulosa ed emicellulosa (Figura 1.3). Questo pre-trattamento è caratterizzato da un elevato assorbimento energetico.

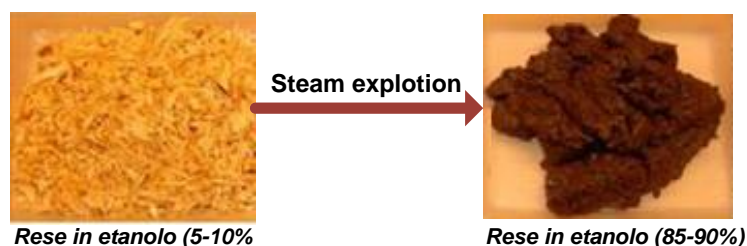


Figura 1. 3. Materiale lignocellulosico sottoposto al pre-trattamento *steam explosion*.

- Tramite *steam explosion* con anidride solforosa: l’anidride solforosa, utilizzata in forma gassosa, ha l’effetto di acidificare la biomassa prima di sottoporla al pre-trattamento di *steam explosion* di favorire l’innesco dell’idrolisi della cellulosa e dell’emicellulosa. L’utilizzo di reagenti e l’assorbimento energetico rendono i costi di pre-trattamento molto elevati;
- Tramite il processo di “*Ammonia Fiber Explosion*” (AFEX): la biomassa è sottoposta all’azione dell’ammoniaca alla temperatura di 27 °C e alla pressione di 1,24 MPa. La successiva brusca riduzione della pressione determina la rapida espansione della biomassa pretrattata. I costi sono molto elevati e possono essere ridotti sostituendo l’ammoniaca con anidride carbonica, come fluido supercritico, operando a valori di pressione di 7,6-20,7 MPa;
- Pre-trattamento biologico: si avvale dell’impiego di microrganismi che disgregano la parete cellulare degradando la lignina. In particolare sono in corso di studio alcuni funghi basidiomiceti ligninolitici, tra cui *Phanerochaete chrysosporium*.

I risultati finora conseguiti, tuttavia, mettono in evidenza come i pre-trattamenti di natura chimica e chimico-fisica siano più promettenti, soprattutto per il rendimento della successiva idrolisi enzimatica (Chandel *et al.*, 2007). I principali margini di miglioramento a carico del pre-trattamento interessano l’efficienza e l’incidenza del pre-trattamento chimico-fisico-enzimatico sul costo finale di produzione. Un effetto indesiderato del pre-trattamento è la formazione di sottoprodotti (quali composti ottenuti dalla degradazione del furano, acidi organici a basso peso molecolare, composti fenolici), che inibiscono l’attività fermentativa dei microrganismi. Questi inibitori possono essere rimossi mediante differenti processi di detossificazione quali precipitazione e successiva filtrazione con filtri a 0,2 µm (Nguyen, 1998;

Kim *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2006; Mohagheghi *et al.*, 2006). La biomassa pretrattata e detossificata è avviata quindi all'idrolisi enzimatica.

Sebbene l'idrolisi di cellulosa ed emicellulosa possa essere condotta con agenti chimici (generalmente H₂SO₄), questa opzione è sfavorita dagli elevati costi per l'acquisto e la gestione dei reagenti. La prospettiva più interessante è costituita dall'idrolisi enzimatica (Choi e Matherws, 1996).

Per scindere le catene di cellulosa ed emicellulosa si ricorre a tre famiglie di enzimi, isolati principalmente dal fungo ascomicete *Trichoderma reesei* (Figura 1.4).

- Le endocellulasi (1,4-β-D-4-gluconidrolasi) scindono le catene al loro interno, rompendole in frammenti più corti;
- Le esocellulasi (1,4-β-D-glucon-gluconoidrolasi o cellodestrinasi) attaccano le estremità delle catene, liberando zuccheri semplici (monomeri e dimeri);
- La β-glicosidasi scinde i dimeri in monomeri, liberando soprattutto glucosio.

Le attività di ricerca in questo settore produttivo sono tese a semplificare il processo, integrando l'idrolisi enzimatica con le successive fasi della trasformazione. La biomassa idrolizzata è avviata quindi alla fermentazione alcolica (Pin e Vecchiet, 2008).

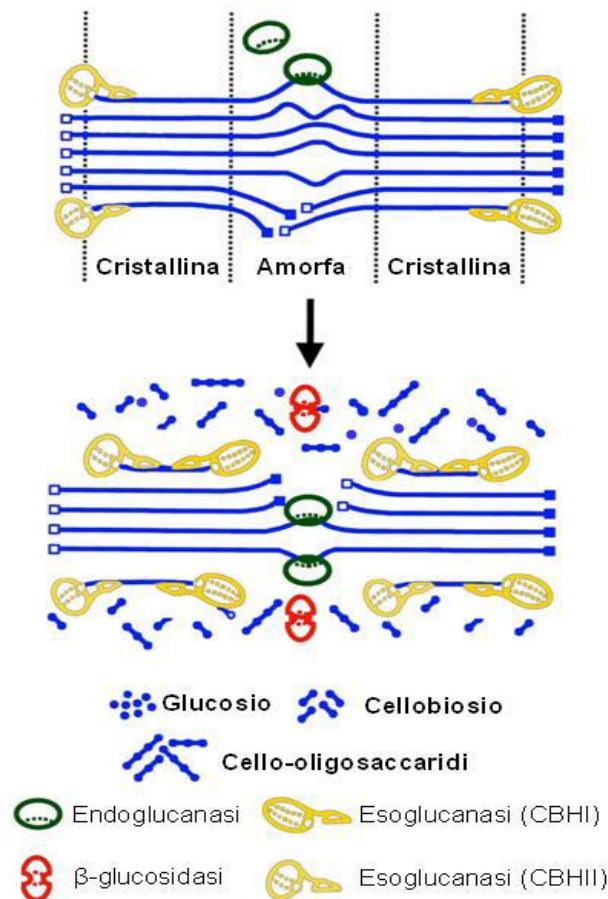


Figura 1. 4. Degradazione della cellulosa ad opera delle cellulasi. Fonte: Favaro L.

La fermentazione alcolica

La fermentazione è il processo attraverso il quale gli zuccheri semplici (monosaccaridi e disaccaridi, già presenti nella materia prima o ottenuti per idrolisi dai polisaccaridi) sono convertiti in bioetanolo (Pin e Vecchiet, 2008), attraverso l'impiego di microrganismi, generalmente lieviti come *Saccharomyces cerevisiae*, che consentono la produzione di una soluzione acquosa di alcool all' 8-10% in volume dopo circa 48-72 ore. Fattori limitanti la produzione di etanolo durante la fase della fermentazione sono il tenore di glucosio e di alcool, che può inibire la crescita dei microrganismi. Per tale ragione, la fermentazione in reattori discontinui (*batch*) ha dei limiti abbastanza stringenti. La soluzione zuccherina che fa da substrato (melassa) ha tenori di zucchero che non superano il 20% in peso. L'efficienza rispetto al substrato non va oltre l'85-90% (in quanto una parte del glucosio è utilizzata per la crescita dei microrganismi). Pertanto, tenendo conto della stechiometria della reazione, la resa in etanolo si aggira intorno a 0,4-0,5 grammi di etanolo per grammo di glucosio. Risultati migliori

si possono ottenere se si utilizza un reattore continuo che si avvale di diverse soluzioni tecniche dirette a mantenere la concentrazione di etanolo entro dei valori di tolleranza del microrganismo stesso.

La distillazione

La distillazione è finalizzata alla separazione del bioetanolo al termine della fermentazione e sfrutta le diverse temperature di ebollizione delle componenti della miscela. La miscela fermentata è evaporata e ricondensata tante volte, quanti sono i piatti all'interno delle torri di distillazione. L'etanolo, con una temperatura di ebollizione (78,4 °C) inferiore a quella degli altri composti presenti, è più volatile e, dunque, nei vapori ricondensati risulta progressivamente più concentrato (Pin e Vecchiet, 2008).

La distillazione consente di ottenere bioetanolo a una concentrazione del 95% in volume (bioetanolo azeotropo). Il restante 5%, costituito da acqua e sostanze volatili con temperature di ebollizione molto vicine a quella dell'etanolo, viene separato nella fase di disidratazione con diverse soluzioni tecniche. I consumi energetici in queste due fasi costituiscono uno dei principali fattori limitanti dell'intero processo.

Per l'impiego in miscela con la benzina, invece, deve essere disidratato fino a valori di concentrazione del 99% v/v (Pin e Vecchiet, 2008).

La disidratazione

La disidratazione del bioetanolo azeotropo, funzionale al suo utilizzo in miscela con i combustibili fossili può essere condotta con diverse soluzioni tecniche (Pin e Vecchiet, 2008):

- *Distillazione azeotropica.*- è articolata in due operazioni, la distillazione chimica propriamente detta, che consente l'estrazione del bioetanolo, delle altre sostanze volatili e di una certa quantità di acqua, e la rettifica, che permette l'eliminazione delle sostanze volatili e dell'acqua. La rettifica si avvale dell'impiego di un solvente, generalmente benzene, che permette di separare le diverse fasi liquide all'interno di un sedimentatore;

- *Disidratazione per pervaporazione.*- si avvale di membrane selettive (in silicone, zeolite, poli-dimetil-silossano), che consentono di sottrarre al bioetanolo l'acqua e le altre sostanze volatili presenti in forma di vapore nel corso della distillazione (Figura 1.5).

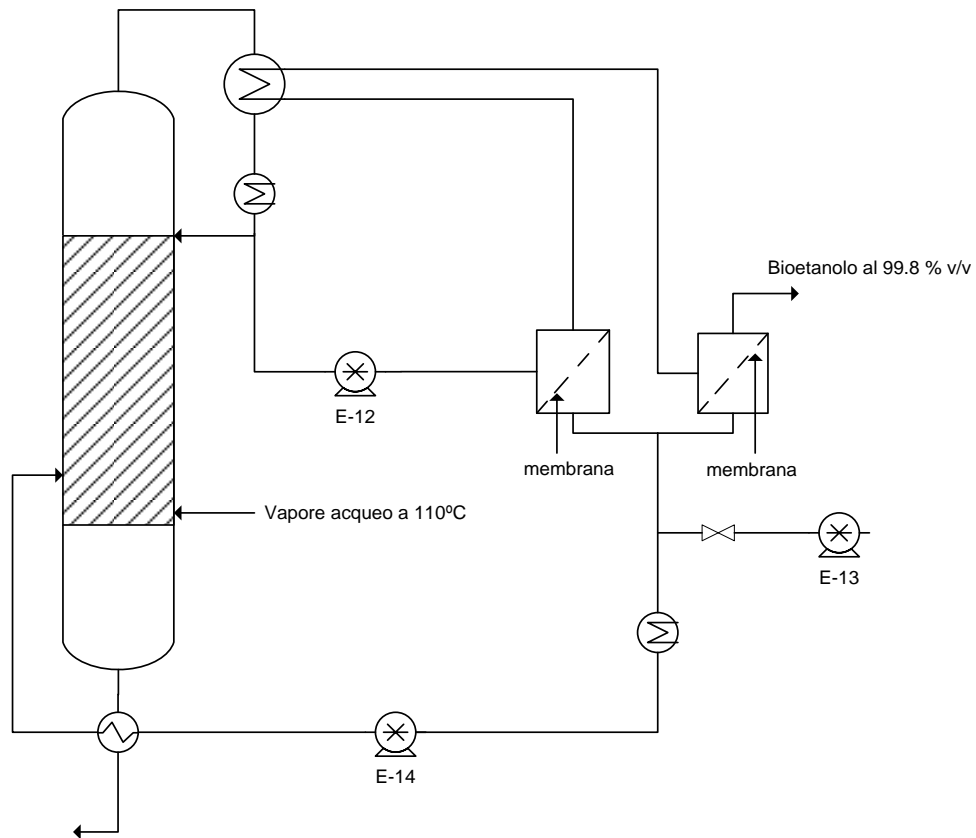


Figura 1. 5. Schema della disidratazione per pervaporazione (Pin e Vecchiet, 2008).

1.2.4. Lo scenario di produzione del bioetanolo

Produzione mondiale

Allo stato attuale il Brasile, gli Stati Uniti e l'Unione Europea sono i maggiori produttori di biocarburanti: in Brasile (22,6 milioni m³ nel mercato di biocarburanti) e negli Stati Uniti prevale la produzione del bioetanolo, mentre nell'U.E. è più rilevante la produzione di biodiesel (Carrizo *et al.*, 2009).

In risposta alle politiche energetiche e ambientali avviate in seguito al Protocollo di Kyoto e in considerazione del fatto che molti Paesi non hanno approvvigionamenti propri sufficienti, si prevede che il mercato dei biocarburanti, nel breve termine, andrà incontro a una forte

espansione. Secondo quanto indicato dalla *International Energy Agency* (IEA), si attende che entro il 2020 la produzione mondiale di biocarburanti ammonterà a circa 100 milioni di tonnellate.

A livello mondiale il bioetanolo è il biocarburante con la più ampia diffusione. In Figura 1.8 è riportata la produzione di bioetanolo nel periodo 1975-2005 (Figura 1.6). Il Programma Pro-alcool, attivato nel 1975 dal governo brasiliano, è stato la prima importante azione, mirata a sostituire il carburante fossile importato con il bioetanolo prodotto dalla canna da zucchero, coltivata nel Paese. Nel 2004, la produzione mondiale di bioetanolo ammontava a circa 26 milioni di tonnellate e nel 2005 ha raggiunto i 28 milioni di tonnellate. Nel periodo 2004-2005, la crescita annua mondiale di produzione del bioetanolo si è attestata attorno al 12%; circa il 60% della produzione globale deriva dalla canna da zucchero, mentre il 40% da colture cerealicole, nella maggior parte dei casi da mais (Dufey, 2006). Nel 2005 gli Stati Uniti hanno prodotto circa 12,9 milioni di tonnellate di bioetanolo, essenzialmente da mais; il Brasile invece ne ha prodotto 12,8 milioni di tonnellate, ricavate prevalentemente dalla canna da zucchero (Monsma, 2006).

L'interesse degli Stati Uniti nei confronti della produzione del bioetanolo è sorto negli anni Settanta, in risposta alla crisi petrolifera. Il forte sostegno governativo, che ha condotto gli Stati Uniti a raggiungere il primato mondiale, è testimoniato dall'emanazione nell'agosto 2005 della legge, nota come *Energy Policy Act*, per il miglioramento della sicurezza degli approvvigionamenti energetici. Questa legge ha fissato in 22,7 milioni di tonnellate di bioetanolo l'obiettivo di immissione nel mercato per il 2010. La recente decisione di portare l'obiettivo di sostituzione per il 2030 al 30% testimonia l'intenzione di sostenere anche nel lungo termine la produzione del bioetanolo, al fine di ridurre la dipendenza dai combustibili fossili. Il governo statunitense, tuttavia, intende raggiungere questo obiettivo, avvalendosi anche del bioetanolo prodotto in Brasile, che è il maggiore Paese esportatore (circa il 50% delle esportazioni mondiali); a questo proposito nel marzo 2007, infatti, è stato siglato un accordo tra USA e Brasile per l'importazione di bioetanolo prodotto in Brasile a partire da canna da zucchero.

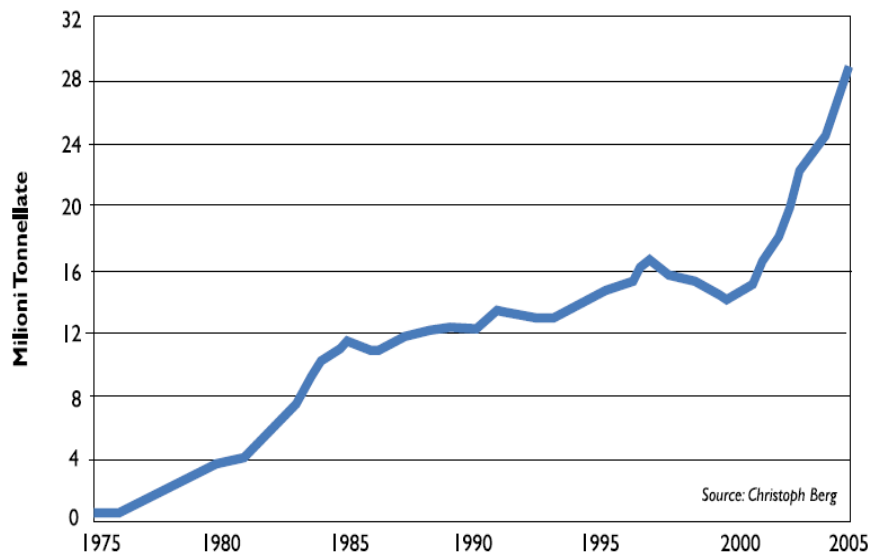


Figura 1. 6. Andamento della produzione mondiale di bioetanolo nel periodo 1975-2005(Cencic *et al.*, 2007).

Le proiezioni nel medio termine suggeriscono un aumento del tasso annuo di crescita del mercato globale del bioetanolo tra il 2006 e il 2020 del 6,5% (RNCOS, 2006).

Produzione in Europa

A livello europeo, nel 2005, la produzione di bioetanolo è stata di 720927 tonnellate, con un incremento del 70,5% rispetto all'anno precedente. Le materie prime principali attualmente utilizzate sono barbabietola da zucchero e frumento. Tale incremento è riconducibile in parte al raddoppio della produzione del bioetanolo nei Paesi membri, in parte all'allargamento dell'U.E. a nuovi Stati produttori, quali Ungheria, Lituania e Repubblica Ceca (Tabella 1.8).

Il maggiore produttore di bioetanolo tra i Paesi dell'U.E. è la Spagna, con una produzione di 240000 t/anno, ottenuta principalmente dal frumento, dall'orzo e dai sottoprodotti della filiera del vino.

Tabella 1. 8. Dati di produzione (in tonnellate) del bioetanolo nell'U.E.; i dati sono soggetti a un errore del +/-5% ¹ (Cencic *et al.*, 2007)

Paese Membro	2004 [t]	2005 [t]	Incremento 2004/2005[%]
Spagna	202 354	240000	18,6
Francia	80887	99780	23,4
Svezia	56529	130160	130,2
Polonia	38270	68000	77,7
Germania	20000	120000	500,0
Finlandia	3768	36800	876,7
Ungheria	/	11840	/
Lituania	/	6296	/
Paesi Bassi	11146	5971	-46,4
Repubblica Ceca	/	1120	/
Lettonia	9800	960	-90,2
Totale	422754	720927	70,5

¹“Biofuel barometer”, (2006), *EurObserv'ER*,
www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro173b.pdf

Il Brasile importa il 28,5% della sua produzione di etanolo all'Europa, approssimativamente 6 milioni m³ (Carrizo *et al.*, 2009).

Produzione in Italia

La produzione italiana è ancora molto limitata. Alcune iniziative industriali di dimensioni rilevanti per la sua produzione e la trasformazione sono state avviate, grazie soprattutto alla spinta data dalla defiscalizzazione. Nel 2005, in Italia il bioetanolo è stato prodotto principalmente dalla distillazione dei sottoprodotti delle filiere per la produzione del vino (distillazioni obbligatorie ai sensi dell'art. 27 e di crisi ai sensi dell'art.30 del Regolamento (CE) n. 1493/1999) e da melasso e colture cerealicole (Tabella 1.9).

Tabella 1. 9. Materie prime e produzione in tonnellate di bioetanolo anidro in Italia nel 2005 (Cencic *et al.*, 2007)

Materia prima	Produzione [t]
Sottoprodotti del vino (distillazioni obbligatorie e di crisi)	40000
Sottoprodotti della filiera zucchero e cereali	56 000

Mancano, tuttavia, delle stime attendibili sull'effettiva capacità produttiva dell'intero settore, soprattutto perché, a fronte di una buona presenza di distillerie, alcune delle quali tuttavia in fase di chiusura, pochi sono gli impianti in grado di produrre il bioetanolo anidro, utilizzabile per la miscelazione con la benzina.

1.3. Bioetanolo di seconda generazione come semplificazione della filiera

Uno dei campi di ricerca sul bioetanolo di seconda generazione riguarda lo sviluppo di soluzioni tecniche, che siano in grado di integrare tutte le fasi della filiera, a eccezione del pre-trattamento, in un numero di reattori progressivamente più ridotto, con la finalità di diminuire i costi per la realizzazione dell'impianto (Mamma *et al.*, 1996; Kim, Lee e Torget, 2001; Lynd *et al.*, 2002; Öhgren *et al.*, 2006). Il pre-trattamento della biomassa rimane ad ogni modo una fase necessaria per rendere il substrato (cellulosa, emicellulosa) accessibile all'attacco enzimatico.

Le soluzioni attualmente allo studio sono:

- SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*); in quattro reattori hanno luogo le tre fasi della filiera (Figura 1.7) : idrolisi mediante cellulasi commerciali, fermentazione degli zuccheri esosi e fermentazione degli zuccheri pentosi. Il vantaggio del modello SHF è la possibilità di condurre ciascuno stadio di processo nelle condizioni ottimali, il maggiore inconveniente consiste invece nell'elevato costo di impianto dovuto alla necessità di gestire differenti reattori per ciascuna fase di processo;

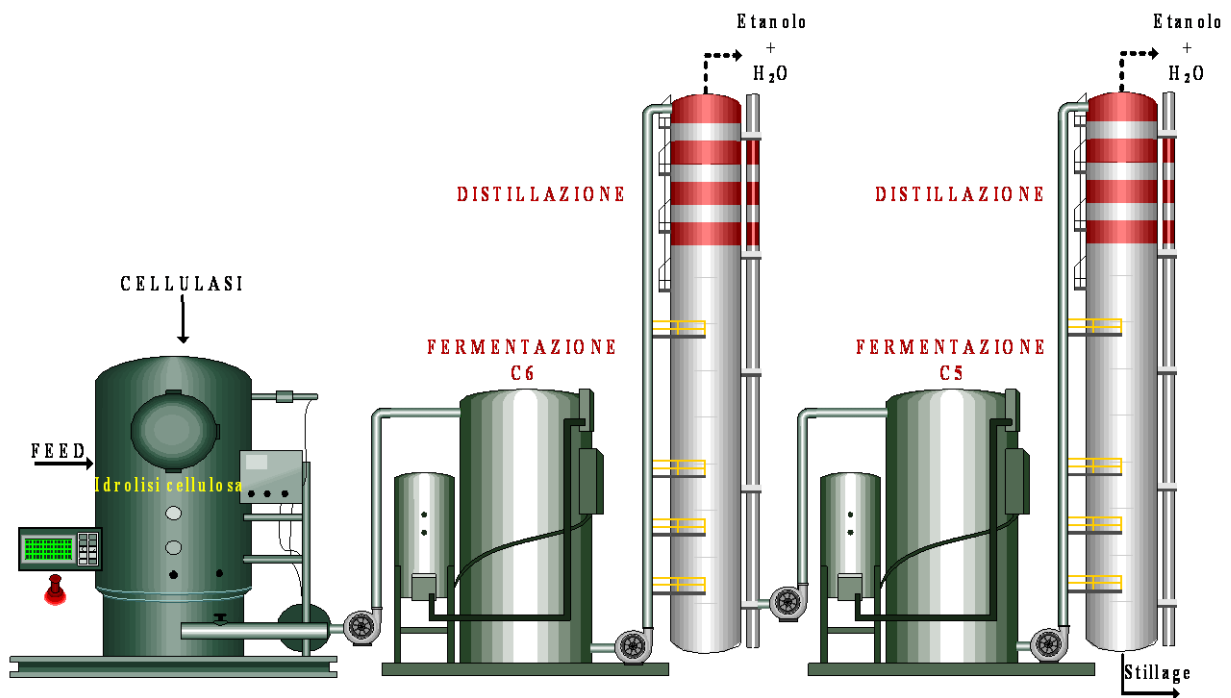


Figura 1. 7. Schema del modello SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*).

- SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*); il progressivo miglioramento del sistema SHF ha portato alla definizione del processo SSF in cui si propone la simultaneità di idrolisi e fermentazione degli zuccheri esosi (Figura 1.8). Sono dunque necessari due reattori: il primo per l'idrolisi ad opera delle cellulasi e la fermentazione degli zuccheri esosi, il secondo per la fermentazione dei pentosi.

L'approccio SSF riduce quindi i costi di investimento e di esercizio del processo anche se inevitabilmente rimangono dei limiti di carattere gestionale: gli enzimi commerciali e il microrganismo fermentante devono necessariamente operare alle stesse condizioni pur avendo spesso *optimum*, ad esempio di pH e temperatura, decisamente differenti.

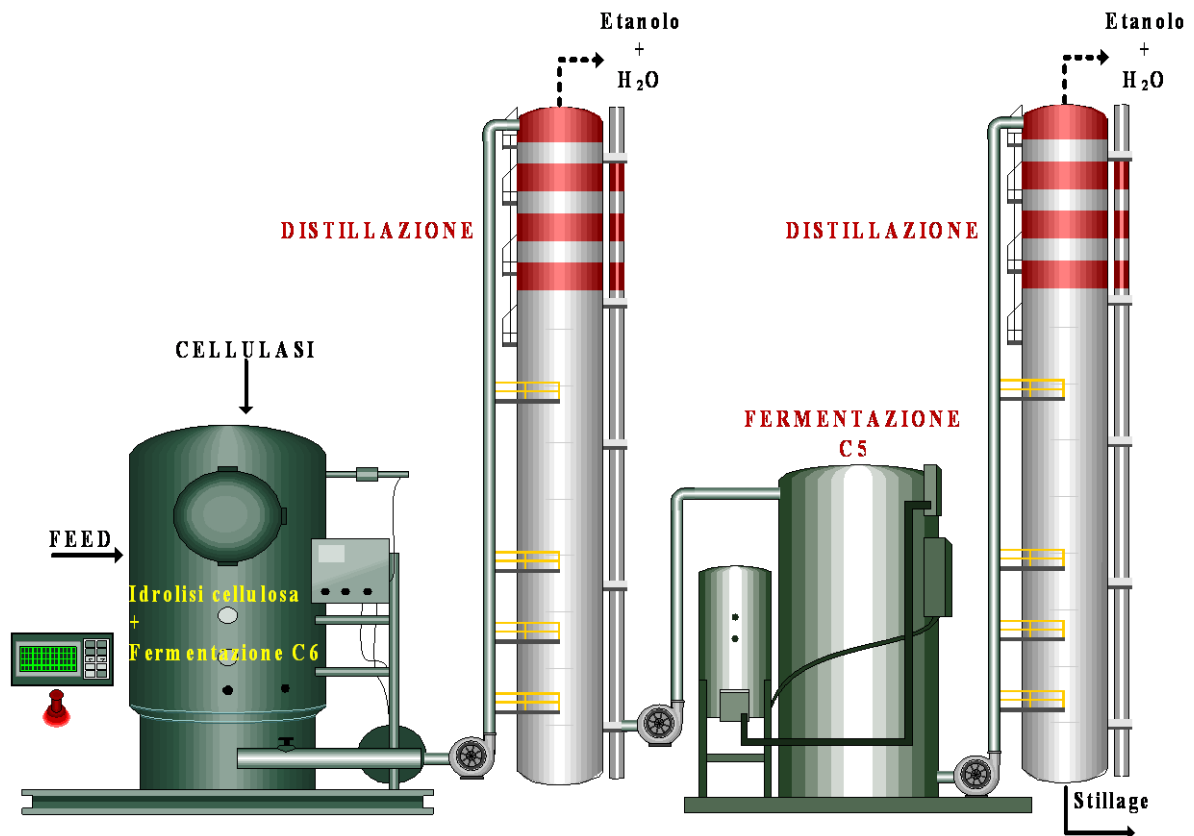


Figura 1. 8. Schema del modello SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

Il compromesso gestionale che ne deriva mira a ridurre le inefficienze sia durante la saccarificazione (resa in termini di zuccheri semplici liberati) sia durante la fase di fermentazione (resa in etanolo: g etanolo evoluti /g cellulosa).

- SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*): la simultaneità è estesa alla fermentazione di entrambe le famiglie di zuccheri pentosi ed esosi. È prevista in un unico passaggio mediante l'impiego di un ceppo microbico capace di fermentare zuccheri C5 e C6 (Figura 1.9);

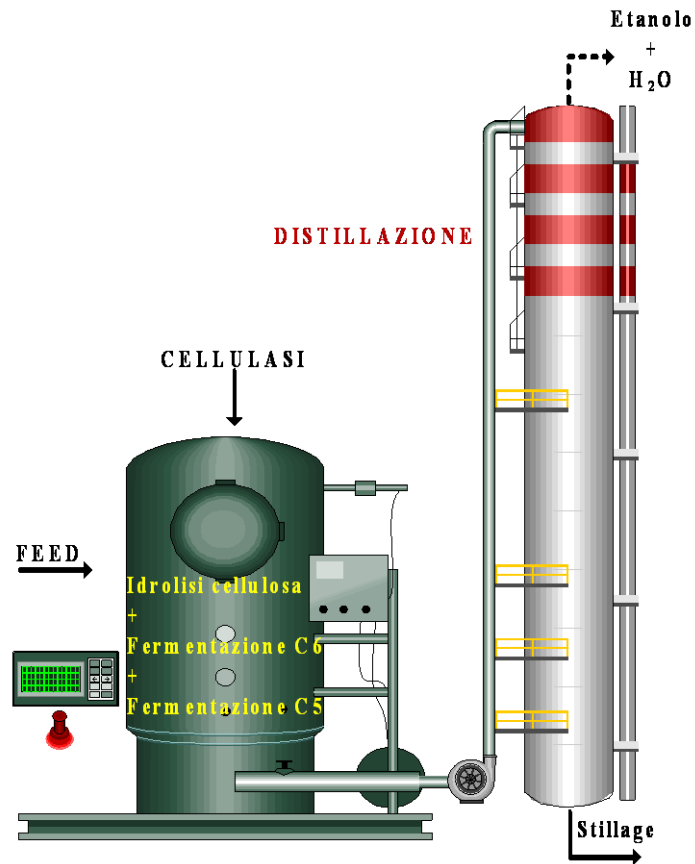


Figura 1. 9. Schema del modello SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*).

- Il modello CBP (*Consolidated BioProcessing*): l'ultima frontiera nella produzione del bioetanolo di seconda generazione, dove a differenza del modello precedente qua anche è prodotta la enzima insieme alla idrolisi e la fermentazione delle esosi e pentosi (Figura 1.10).

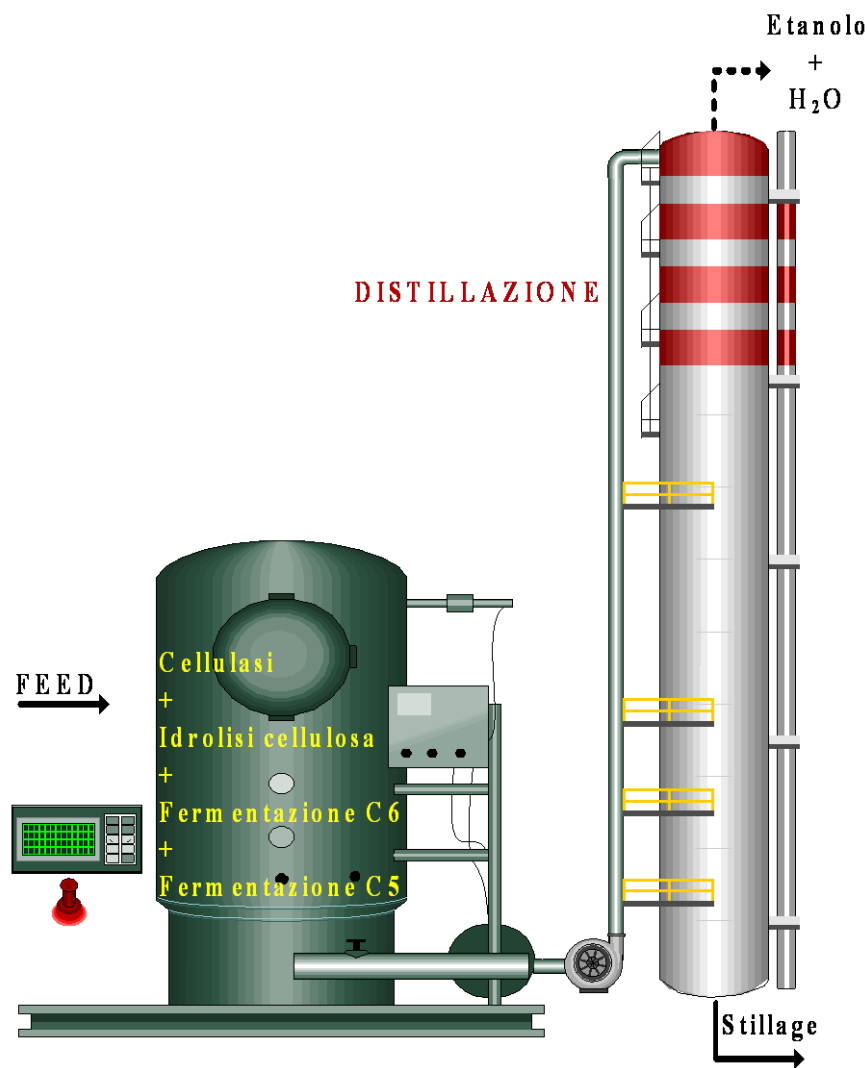


Figura 1. 10. Schema del modello CBP (*Consolidated BioProcessing*).

Il più grande ostacolo tecnico allo sfruttamento di biomassa lignocellulosica è rappresentato dalla mancanza di tecnologie a basso costo che permettano di superare la natura recalcitrante della biomassa di partenza durante la fase di pre-trattamento. Come sopra riportato, il processo tradizionale per la conversione del materiale lignocellulosico in etanolo, è caratterizzato da quattro fasi: produzione degli enzimi saccarolitici (cellulasi ed emicellulasi), idrolisi dei polisaccaridi presenti nella biomassa pretrattata, fermentazione degli zuccheri esosi e fermentazione dei pentosi.

Il continuo miglioramento del processo di conversione è tutt'ora oggetto di studio e una sua semplificazione si è già ottenuta nei sistemi SHF, SSF e SSCF, ma una prospettiva completamente nuova è oggi rappresentata dal modello CBP (*Consolidated Bioprocessing*). Questo sistema si basa sull'efficace integrazione in un unico fermentatore dei processi biologici richiesti per la conversione della lignocellulosa (Figura 1.11).

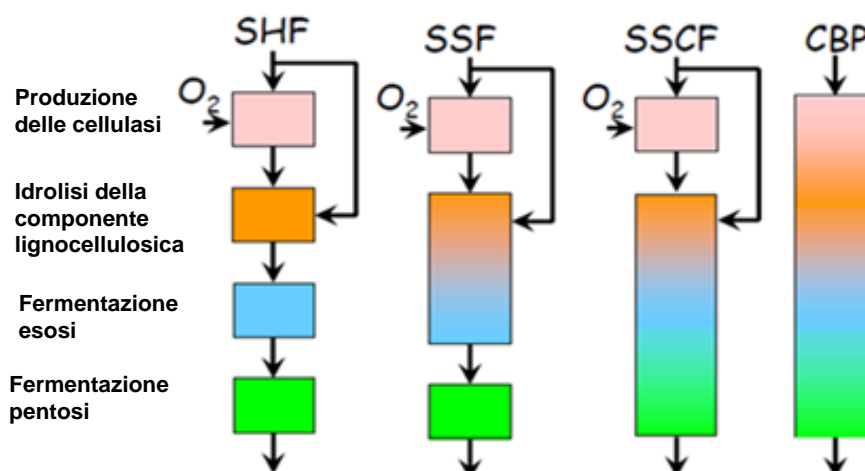


Figura 1. 11. Schema delle semplificazioni di processo ottenute con il sistema CBP (*Consolidated BioProcessing*).

Nel modello CBP si mira alla completa simultaneità degli stadi di processo assicurando la completa conversione in un unico reattore nel quale la biomassa di partenza viene processata mediante l'impiego di un microbo o di un consorzio microbico capace di fermentare la matrice lignocellulosica in etanolo senza l'ausilio di enzimi commerciali. Il modello CBP, nel quale sono integrati singoli processi come la produzione d'enzimi, saccarificazione e la fermentazione è una strategia promettente per la produzione di etanolo a partire di materiali lignocellulosici (Hasunuma e Kondo, 2012).

Nonostante non esistano in natura microorganismi che esibiscano tutte le caratteristiche richieste del processo del CBP, alcune specie batteriche e fungine (specie mesofile e termofile quali *Clostridium* sp, *Fusarium oxysporium* *Trichoderma* sp) possiedono alcune delle proprietà ricercate: da un lato la produzione di enzimi cellulolitici e dall'altro l'elevata capacità fermentativa (van Zyl *et al.*, 2007).

Il ceppo ideale dovrebbe essere in grado di idrolizzare la cellulosa, fermentare i pentosi e gli esosi risultanti e dimostrarsi tollerante alle condizioni di stress tipiche di un impianto industriale, nonché alla eventuale presenza di inibitori. In questa prospettiva, si muovono le ultime strategie molecolari e di selezione allo scopo di sviluppare un lievito ricombinante che presenti tutte le caratteristiche idonee per un suo utilizzo nel processo CBP su scala industriale (Tabella 1.10).

Tabella 1. 10.Caratteristiche richieste/desiderabili per un ceppo di *S. cerevisiae* utilizzabile in un processo CBP (Lynd , 1996; Zaldivar *et al.*, 2001)

Caratteristiche richieste	Presenza nei ceppi esistenti di <i>S. cerevisiae</i>
<i>Caratteristiche essenziali:</i>	
Capacità di fermentazione di zuccheri esosi e pentosi	Solamente C6 da ceppi industriali e <i>wild-type</i> Utilizzazione parziale dei C5 ottenuta da ceppi geneticamente modificati
Alta capacità fermentativa	Nella maggior parte dei ceppi
Resistenza ad alte concentrazioni di etanolo	Nella maggior parte dei ceppi Nella maggior parte dei ceppi
Generale tolleranza dei processi industriali	In ceppi di laboratorio
Alto livello di espressione di geni eterologhi	In ceppi di laboratorio e in alcuni ceppi industriali
Alto livello di produzione di proteine eterologhe	
<i>Caratteristiche desiderabili:</i>	
Fermentazione simultanea degli zuccheri	Ceppi industriali ingegnerizzati per la fermentazione di maltosio e glucosio
Riutilizzabilità	Presente nella maggior parte dei ceppi
Supplemento minimo di nutrienti	Molti ceppi industriali, particolarmente in quelli utilizzati in vinificazione
Adattabilità alla manipolazione genetica	Tutti i ceppi di laboratorio e alcuni ceppi industriali

1.4. Pre-trattamenti del materiale di partenza ed inibitori

I metodi precedentemente descritti per il pre-trattamento della biomassa lignocellulosica producono una grande varietà di composti (Figura 1.12). In seguito ad idrolisi della cellulosa, il D-glucosio è lo zucchero predominante, mentre il D-galattosio, il D-mannosio e il D-ramnosio (tutti esosi), come pure il D-xilosio e L-arabinosio (pentosi) risultano rilasciati in seguito ad idrolisi dell'emicellulosa. Anche gli acidi uronici, come l'acido 4-*O*-metilglucuronico, sono prodotti durante l'idrolisi dell'emicellulosa. La lignina infine, un polimero complesso aromatico insolubile in acqua, è costituita da subunità di fenil-propano.

Il trattamento di idrolisi causa una parziale degradazione della lignina e degli zuccheri monomeri rilasciati da cellulosa ed emicellulosa andando a formare tre principali gruppi di composti che risultano fortemente inibenti la successiva fase fermentazione:

- A. derivati del furano (2-furaldeide e 5-idrossimetil-2-furaldeide);
- B. acidi deboli (principalmente acidi acetico, formico, levulinico);
- C. composti fenolici (vanillina, aldeide coniferilica, aldeide siringica).

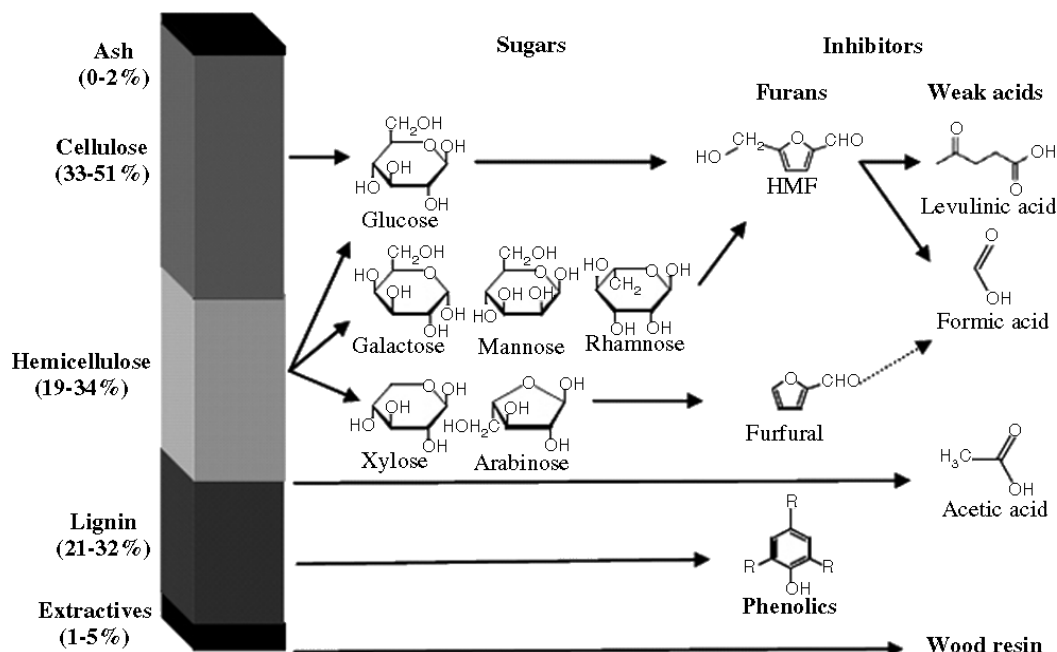


Figura 1. 12. Composizione media della biomassa lignocellulosica e principali prodotti derivati dalla sua idrolisi.

Derivati del furano

I derivati del furano come 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF) e 2-furaldeide (furfurale) si formano in seguito a deidratazione rispettivamente di esosi e pentosi (Ulbricht *et al.*, 1984). Il livello dei furani varia in accordo con il tipo di materiale grezzo e della procedura di pre-trattamento utilizzato (Tabella 1.11). A titolo esemplificativo, la concentrazione di HMF nell'idrolizzati di abete rosso (*Picea abies*) possono variare dai 2,0 ai 5,9 g/l a seconda che l'idrolisi con acido diluito venga eseguita in uno o due passaggi (Almeida *et al.*, 2007; Larsson, *et al.*, 1998; Nilverbrant *et al.*, 2003). In linea generale, il furfurale è solitamente presente in quantità minori rispetto al HMF, ma spesso è comunque presente in concentrazioni tali da risultare inibenti per la crescita del microrganismo fermentante (circa 1 g/l).

L'HMF e il furfurale riducono la resa volumetrica di etanolo e la produttività oltre che influire negativamente sulla crescita microbica. Tali effetti dipendono dalla concentrazione degli inibitori e risultano ceppo-specifici. Effetti sinergici tra l'HMF e il furfurale sono stati dimostrati (Taherzadeh *et al.*, 2000). La conversione del HMF e del furfurale nei relativi alcoli, meno inibenti, è stata studiata aggiungendo in modo intermittente 2 g/l di ciascun composto in una coltura *batch* di *S. cerevisiae*. Nell'intervallo di tempo in cui sia il furfurale che l'HMF erano stati presenti nella coltura non si è stata osservata crescita, inoltre il tasso dell'*uptake* specifico di HMF e furfurale è stato chiaramente inferiore con aggiunte di 4 g/l di ciascun componente. Quando concentrazioni equimolari di ciascun composto sono state confrontate si è visto che l'HMF ha un effetto inibitore minore rispetto al furfurale, ma per contro la sua conversione in furfurolo, da parte del lievito, necessita di più tempo (Taherzadeh *et al.*, 2000).

Diversi meccanismi possono spiegare l'effetto inibitorio dei furani sulla fermentazione alcolica. *In vitro* le misurazioni hanno mostrato che il furfurale e l'HMF inibiscono direttamente gli enzimi alcol deidrogenasi, piruvato deidrogenasi e l'aldeide deidrogenasi (Modig *et al.*, 2002).

Acidi deboli

Gli acidi deboli (acidi alifatici) più comunemente presenti negli idrolizzati di matrici lignocellulosiche sono l'acido acetico, formico e levulinico. L'acido formico e levulinico si formano come prodotti della rottura dell'HMF e furfurale. L'acido formico inoltre può formarsi dal furfurale in condizioni di elevata temperatura e di elevata acidità. L'acido acetico si forma per de-acetilazione delle catene di emicellulosa (Tabella 1.11).

Composti fenolici

Durante l'idrolisi acida dalla degradazione della lignina e dei vari polisaccaridi viene generata una grande quantità di composti fenolici. La quantità e il tipo di tali composti dipende dal tipo di biomassa (Tabella 1.11), questo perché nella parete cellulare delle varie specie vegetali la lignina si presenta con strutture molecolari molto diverse, come anche il grado e il modo in cui si associa all'emicellulosa e alla cellulosa (Perez *et al.*, 2002).

Gli acidi deboli, nei lieviti, inibiscono la fermentazione riducendo la formazione di biomassa e la resa in etanolo. L'aggiunta di acido acetico, levulinico, formico, singolarmente o

in combinazione riducono in egual misura la resa in etanolo, indicando la presumibile assenza di effetti sinergici tra i diversi acidi (Larsson *et al.*, 1998).

L'effetto inibitorio degli acidi deboli è da imputare all'accumulo di anioni intracellulari. La forma indissociata di un acido debole infatti entra nella cellula per diffusione facilitata. In accordo con la teoria dell'accumulo intracellulare di anioni (Russel, 1992), la forma anionica dell'acido rimane intrappolata all'interno della cellula, mentre l'acido indissociato, presente all'esterno della cellula, continua a diffondere all'interno fino a che non viene raggiunto l'equilibrio del gradiente di concentrazione. Questa teoria viene supportata dal fatto che l'acido formico inibisce più dell'acido levulinico che a sua volta è un inibitore più forte dell'acido acetico (Maiorella *et al.*, 1983). Questa evidenza sembra confermare il dato che l'aumento di tossicità sia associato alla dimensione della molecola, più questa è piccola più la sua diffusione attraverso la membrana plasmatica è facilitata con una probabile maggior tossicità dell'anione. La maggiore tossicità dell'acido levulinico rispetto all'acetico sembra derivare dalla maggiore idrofobicità dell'acido levulinico che facilita l'attraversamento della membrana cellulare.

A livello intracellulare, a causa del maggiore pH, l'acido debole si dissocia liberando protoni, causando così una diminuzione del pH del citosol. La cellula contrasta questo fenomeno grazie all'azione di ATPasi di membrana, che estrudono i protoni prodotti dalla dissociazione dell'acido. In questo modo, la cellula consuma ATP (*Adenosine triphosphate*) riducendone di conseguenza la quantità disponibile per la crescita cellulare.

Ridotte concentrazioni di acidi deboli determinano un effetto positivo sulla produzione di etanolo (Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000). L'influenza dell'acido acetico, formico e levulinico sulla resa in alcool di *S. cerevisiae* è stata studiata in fermentazioni modello (Larsson *et al.*, 1998). Concentrazioni di acido inferiori a 100mM incrementano la resa in alcool etilico a pH 5,5, mentre, a concentrazioni superiori, la resa di fermentazione è decisamente inferiore. Si pensa che basse concentrazioni di acido debole stimolino la produzione di ATP.

Inoltre gli acidi deboli inibiscono la crescita cellulare riducendo anche l'*uptake* degli aminoacidi aromatici presenti nel mezzo colturale (Bauer *et al.*, 2003).

Tabella 1. 11 Concentrazione di alcuni inibitori presenti negli idrolizzati lignocellulosici ottenuti a partire da abete rosso, salice, grano, canna da zucchero, stocchi di mais (Almeida *et al.*, 2007)

Inibitore	Concentrazione (g/l)				
	Abete rosso	Salice	Grano	Canna da zucchero	Stocchi di mais
Derivati del furano					
HMF	2,0 – 5,9	n.q.	n.i.	0,6	0,1
2-Furaldeide	0,5 – 1,0	n.q.	n.i.	1,9	11
Acidi alifatici					
acido acetico	2,4	n.q.	1,6	4,4	1,6
acido formico	1,6 – 3,1	n.q.	1,4	1,4	-
Composti fenolici					
4-idrossibenzaldeide	n.i.	0,01	0,02	-	-
Vanillina	0,12	0,43	0,03	-	-
aldeide coniferilica	0,035	n.i.	-	-	-
aldeide sirigica	0,107	-	0,024	-	-
acido sirigico	n.i.	n.q.	0,022	-	-

n.i. non identificato; n.q. non quantificato

1.5. Termotolleranza: uno dei caratteri più interessanti per un ceppo industriale di *S. cerevisiae*

La differenza di temperatura ottimale fra la saccarificazione enzimatica del materiale lignocellulosico e la fermentazione microbica è uno degli inconvenienti più difficili da superare per aumentare l'efficienza nella produzione del bioetanolo in un processo SSF e/o CBP. L'applicazione di un ceppo di lievito termotollerante in questi contesti può consentire di condurre l'idrolisi e la fermentazione (Hasunuma e Kondo, 2012).

La tolleranza ad elevate temperature (> 40°C) è una caratteristica desiderata dei lieviti utilizzati nei paesi tropicali, dove la temperatura supera i valori ottimali di crescita dei microorganismi mesofilli. Questo può provocare stress termico e diminuzione della resa di etanolo. L'utilizzo di lieviti termotolleranti oppure di altri organismi mesofilli permetterebbe di abbassare il costo del processo riducendo notevolmente i costi elevati determinati dai sistemi di raffreddamento (Fernández *et al.*, 2008).

I fenomeni relativi alla termotolleranza e alla tolleranza all'etanolo dei microorganismi sono stati investigati esaustivamente. È stato determinato inoltre che la tolleranza all'etanolo e alle elevate temperature sono legate: infatti alte concentrazioni di etanolo decrementano la temperatura ottimale di crescita e l'aumento della temperatura incrementano l'effetto inibitore dell'etanolo. Gli effetti negativi della temperatura e dell'etanolo sono legati ad alterazioni della permeabilità delle membrane cellulare, alla de-naturazione delle proteine, così come all'inibizione del trasporto di nutrienti. Il meccanismo di risposta cellulare allo stress per temperatura ed etanolo è essenzialmente simile e consiste in cambi nella composizione lipidica delle membrane e nella sintesi transitoria di proteine.

Fra le strategie per migliorare la tolleranza termica dei lieviti vi è la selezione di ceppi resistenti, l'adattamento di ceppi mediante incubazione a temperature crescenti, la fusione di protoplasti e la mutagenesi (Fernández *et al.*, 2008).

1.6. Produzione di bioetanolo mediante processi CBP ed SSF ad alta temperatura

Una delle maggiori sfide nel processo SSF e CBP è la temperatura ottimale richiesta nelle fasi di saccarificazione e fermentazione. La saccarificazione con enzimi cellulolitici è eseguita ad un regime termico di circa 50 °C, mentre la maggior parte dei microbi ha una temperatura ottimale per la fermentazione dell'etanolo tra i 28°C e 37 °C (Hasunuma e Kondo, 2012).

La produzione di etanolo ad elevate temperatura ha ricevuto molta attenzione da parte dei ricercatori proprio per i suoi numerosi vantaggi: dalla riduzione dei costi associati al raffreddamento, all'evaporazione continua dell'etanolo dal brodo sottoposto a pressione, dalla riduzione di rischio di contaminazione alla maggior sostenibilità del processo per applicazioni in paesi tropicali così come per un ulteriore miglioramento della efficienza dell'intero sistema SSF. Abdel-Banat *et al.* (2010) hanno calcolato che un incremento di temperatura in 5 °C nella fermentazione può ridurre decisamente il costo di produzione del bioetanolo da materiali amidacei utilizzando una α -amilasi termotollerante e riducendo drasticamente i fabbisogni energetici per il raffreddamento. La generazione di vapori di etanolo durante la fermentazione mantiene la concentrazione di etanolo a bassi livelli che non sono pericolosi per il lievito fermentante, semplificando inoltre la successiva fase di distillazione.

Una delle ragioni per l'utilizzo delle SSF è il vantaggio di ridurre al minimo l'inibizione delle cellulasi ad opera del glucosio, aumentando notevolmente il tasso di saccarificazione e, di

conseguenza, la resa in etanolo. In ogni caso, lo svantaggio del processo SSF rimane la forte contrazione in efficienza di idrolisi eseguita a temperatura molto inferiore rispetto a quella ottimale degli enzimi idrolitici, in modo tale da essere compatibile con i ranghi termici del microbo fermentante. Di conseguenza, la disponibilità di ceppi di lievito termotolleranti capaci di produrre etanolo a temperature molto più interessanti per la saccarificazione del substrato (40-50°C) è di fondamentale importanza.

Ceppi di lievito termotolleranti afferenti ai generi *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e *Fabospora* possono produrre più del 5% (w/v) di etanolo ad elevata temperatura (>40 °C). Alcuni lieviti termotolleranti e etanologeni sono stati isolati e modificati geneticamente per la produzione di etanolo da biomasse lignocellulosiche (Tabella 1.12). La specie *Kluyveromyces marxianus* appare particolarmente promettente. Molti ceppi di *K. marxianus* crescono bene a temperature comprese nell'intervallo 45-52°C. Unceppo termotollerante *K. marxianus*, IMB3, ha prodotto 60-72 g/l di etanolo a 42 °C. Inoltre, *K. marxianus* presenta ulteriori vantaggi tra cui un elevato tasso di crescita e la capacità di utilizzare, anche ad temperature elevate, un'ampia varietà di zuccheri (ad es. arabinosio, galattosio, mannosio, xilosio).

A causa di questi vantaggi, *K. marxianus* è stata usata per la produzione di etanolo a partire da substrati rilevanti industrialmente come succo di canna di zucchero, succo d'insilato di mais, melassa, siero di latte in polvere. Vari materiali lignocellulosici (pioppo, eucalipto, sorgo dolce, bagassa, paglia di grano, sottoprodotto di *Brassica carinata*), che sono stati pretrattati mediante *steam explosion*, sono stati convertiti a etanolo tramite un processo SSF usando *K. marxianus*. Pertanto, ceppi microbici termotolleranti capaci di produrre una notevole quantità di etanolo a temperature più favorevoli per la saccarificazione, sono essenziali per il miglioramento dell'efficienza SSF. Oltre alla termotolleranza, è carattere desiderabile anche la capacità di fermentare lo xilosio per una conversione economicamente sostenibile di materiali lignocellulosici a etanolo; è importante far notare infatti che lo xilosio è lo zucchero pentosio più comune nella emicellulosa ed è il monosaccaride più abbondante, dopo il glucosio, nella biomassa lignocellulosica.

Recentemente sono stati identificati lieviti termotolleranti e etanolo genici potenzialmente utilizzabili per la produzione di etanolo da biomassa. Per esempio, un lievito termotollerante, *Hansenula polymorpha* è capace di produrre etanolo a partire da glucosio, cellobiosio e xilosio ad elevate temperature (superiori a 37 °C). Un nuovo ceppo di lievito termotollerante, *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) IPE100, ha prodotto etanolo con un rendimento teorico del 85% per g di glucosio a 42 °C.

Tabella 1. 12. Dati recenti sulla produzione di etanolo da materiali cellulosici ed emicellulosici con ceppi di lievito termotolleranti in sistema SSF o CBP ad elevata temperatura (Hasunuma e Kondo, 2012)

Ceppo	Fonte carbonio	T (°C)	P (g/l)	Y E/S (%)	Ref.
<i>K. marxianus</i> CECT10875	100 g/l substrati pretrattati mediante <i>steam explosion</i> ^a	42	16,2-19,0	60,9-71,2 ^c	(Ballesteros <i>et al.</i> , 2004)
<i>H. polymorpha</i>	90 g/l xilano di betulla	48	0,35	NC ^d	(Voronovsky <i>et al.</i> , 2009)
<i>Debaromyceshasenii</i>	25 g/l xilano di avena farro / emicellulosa di crusca di frumento	40	9,1-9,5	NC ^d	(Menon <i>et al.</i> , 2010)
<i>I. orientalis</i> TTK316	100 g/l Avicel	40	29	NC ^d	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. giabrata</i> Cgrd1	50g/l Avicel	42	17	66,6	(Watanabe <i>et al.</i> , 2010)
<i>K. marxianus</i> NBRC1777	10 g/l β-glucano di orzo	48	4,24	92,2 ^e	(Yanase <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. kudravzevii</i> HOP-1	100 g/l paglia di riso pretrattata	40	24,25	82 ^e	(Oberoi <i>et al.</i> , 2011)
<i>K. marxianus</i> IBM3	80 g/l miscanto pretrattato mediante <i>steam explosion</i>	45	22,5	86 ^e	(Pessani <i>et al.</i> , 2011)
<i>K. marxianus</i> IBM3	120 g/l miscanto pretrattato mediante <i>steam explosion</i>	45	32	82 ^e	(Pessani <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. cerevisiae</i>	161 g/l sottoprodotti lavorazione della carta	42	40	66,3 ^c	(Prasetyo <i>et al.</i> , 2011)
<i>K. marxianus</i> CHY1612	160 g/l paglia di orzo, macinata	45-35 ^b	34,3	70,2 ^c	(Kang <i>et al.</i> , 2012)

T, temperatura; P, concentrazione di etanolo prodotto; Y_{E/S}, percentuale rispetto alla resa teorica in etanolo (%).

^a Sostrato con contenuto dipoplar, eucalipto, paglia di grano, bagassa di sorgo dolce, residuo di *Brassica carinata*.

^b La temperatura fu spostata di 45 a 35 °C durante la saccarificazione e SSF.

^c Resa di etanolo basato sugli esosi.

^d NC, non calcolato.

^e Resa di etanolo basato su glucano.

La produzione eterologa di cellulasi è stata studiata anche in ceppi di lievito termotolleranti CBP. Alcuni geni eterologhi sono stati introdotti ed espressi in *K. marxianus*, uno dei ceppi di lievito da esplorare come alternativa a *S. cerevisiae*. I ceppi ricombinanti risultanti hanno prodotto 43,4 g/l di etanolo a partire di 100 g/l di cellobiosio. Nonostante queste evidenze sperimentali promettenti poco etanolo è stato prodotto a partire da materiale cellulosico CMC. Per migliorare l'efficienza di conversione in etanolo da cellulosa, un ceppo di *K. marxianus*, è stato ingegnerizzato per la produzione della endoglucanasi EGII di *T. reesei* e beta-glucosidasi BGL1 di *A. aculeatus*. Il ceppo ricombinanti ha prodotto 20,4 g/l di etanolo a partire da 53,4 g/l cellobiosio a 45 °C.

1.7. Scopi della tesi

Il presente lavoro di tesi è finalizzato alla selezione di ceppi di lievito con caratteristiche idonee al loro utilizzo per la produzione di bioetanolo da matrici lignocellulosiche. A tal fine è stata condotta un programma di isolamento di nuovi ceppi di *S. cerevisiae* a partire da vinaccia contenente elevate concentrazioni di inibitori. I ceppi di lievito, identificati mediante tecniche di biologia molecolare, sono stati caratterizzati per il loro vigore fermentativo in presenza di elevate concentrazioni di glucosio e/o xilosio, gli zuccheri più abbondanti negli idrolizzati di lignocellulosa.

Nella seconda parte di questo lavoro, gli isolati di lievito sono stati saggiati per la tolleranza a differenti inibitori (acidi organici e derivati del furano) che si formano durante il pre-trattamento dei substrati lignocellulosici durante la produzione di bioetanolo di seconda generazione nonché per la loro termotolleranza.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Ceppi microbici

I ceppi di riferimento utilizzati in questo lavoro di tesi (Tabella 2.1) sono stati precedentemente isolati da differenti ambienti enologici ed appartengono alla collezione del Dipartimento Dafnae (Università di Padova).

Tabella 2. 1.Ceppi microbici impiegati

<i>Specie</i>	Ceppo	Caratteristiche/utilizzo	Fonte o riferimento
<i>S. cerevisiae</i>	27P	Vinaccia, caratteristiche industriali per il bioetanolo	Favaro <i>et al.</i> , 2012
<i>S. cerevisiae</i>	MEL2	Vinaccia, caratteristiche industriali per il bioetanolo	Favaro <i>et al.</i> , 2013

2.2. Mezzi colturali

Sono stati impiegati i terreni colturali riportati in tabella 2.2.

Tabella 2. 2.Terreni colturali impiegati in laboratorio

MEZZO DI CRESCITA	Riferimento bibliografico o Ditta produttrice
<i>Yeast Mould</i> (YM)	OXOID
<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (YPD)	DIFCO
<i>Must Nutrient Synthetic</i> (MNS,)	Delfini, 1995
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB)	DIFCO

La composizione del mezzo MNS è riportata in Tabella 2.3. Dove necessario, è stato aggiunto agar-agar all'1,5% per ottenere il terreno solido. Il terreno YPD è stato autoclavato per 21 minuti a 121° C, mentre il mezzo MNS è stato sterilizzato mediante filtrazione con filtri a porosità 0,22 µm (Millipore).

Tabella 2. 3.Composizione del mezzo MNS (Delfini, 1995)

Componenti variabili	(g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
NaCl	0,1
acido malico	2,0
acido tartarico	3,0
Vitamine	(mg/l)
Biotina	0,02
acido pantotenico	0,4
Inositolo	2,0
acido nicotinico	0,4
Tiamina	0,4
Piridossina	0,4
acido aminobenzoico	0,2
Microelementi	(mg/l)
H ₃ BO ₃	0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,04
KI	0,1
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,4
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	100

2.3. Isolamento di ceppi di lievito resistenti agli inibitori della fermentazione da vinaccia

La vinaccia è stata collezionata durante la vendemmia 2011, immediatamente dopo pressatura, da una cantina della regione Veneto (Italia). Per l'allestimento dell'esperimento, una aliquota da 15 kg di vinaccia non solfitata è stata irrorata con il *cocktail* di inibitori 1x (g/kg vinaccia: acido lattico 1,73; acido acetico 1,80; acido formico 0,6; furfurale 0,69; idrossi-metil-furfurale 0,94) e trasferita in un sacco di plastica chiuso con un tappo spugnoso per consentire il rilascio di gas in eccesso durante la fermentazione. Il sacco è stato incubato per 3 giorni a 30°C, al termine dei quali si è proceduto a trasferire 10 grammi di vinaccia in due bottiglie di fermentazione da 100 ml contenente YNB formulato con il *cocktail* 1x e con l'aggiunta di 100 g/l di glucosio e 50 g/l di xilosio. L'incubazione a 30°C è durata sette giorni, al termine dei quali si è proceduto all'isolamento dei ceppi di lieviti secondo quanto descritto di seguito.

A distanza di una settimana, 10 ml di ciascuna bottiglia di fermentazione sono stati trasferiti in condizioni asettiche in una nuova bottiglia di fermentazione contenente 90 ml di terreno YNB con 100 g/l di glucosio e 50 g/l di xilosio formulato aggiungendo il *cocktail* di

inibitori 2x. Al termine dell'incubazione (7 giorni a 30 °C), è stato eseguito l'isolamento dei ceppi di lievito da entrambe le bottiglie di fermentazione.

Per l'isolamento dei ceppi di lievito, dieci ml di vinaccia e brodo colturale sono stati prelevati da ciascuna bottiglia e dispersi in 100 ml di soluzione fisiologica (0,85% NaCl). Dopo le opportune diluizioni decimali, si è proceduto a seminare piastre di WL agar (Wallerstein Laboratori, Oxoid, Milano, Italia) con aggiunta di 100 µg/ml *chloramphenicol* (Sigma, Milano, Italia) per contrastare la crescita batterica, e incubate a 30 °C per 3 giorni. Dopo l'incubazione, sono state casualmente prelevate 10 colonie, purificate a colonia pura ristricciando due volte su piastre fresche di YM, stoccate in glicerolo al 20% e conservate a -80°C per successive analisi.

2.3.1 Identificazione dei ceppi di lievito

Gli isolati di lievito sono stati identificati mediante sequenziamento di una porzione della regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*) come sotto riportato. Questo sistema di identificazione prende in considerazione le informazioni ricavate analizzando la regione di DNA codificante l'RNA ribosomale che per le sue caratteristiche funzionali, risulta particolarmente conservata tra gli organismi viventi. In *S. cerevisiae* questa regione è presente nel cromosoma XII, ripetuta in un centinaio di copie poste in tandem (Johnston *et al.*, 1997).

Sequenziamento ITS

I ceppi di lievito, conservati in glicerolo a -20°C, sono stati piastrati su terreno solido YPD e incubati a 30°C *overnight*. Da ogni piastra è stata prelevata una singola colonia, con ansa sterile, quindi risospesa in 20 µl di acqua deionizzata sterile in tubi da 0,5 ml. 5µl di ogni sospensione cellulare sono stati sottoposti ad amplificazione PCR utilizzando il PTC200 *thermocycler* (MJ Research Inc., MA). I primer utilizzati ITS1 e ITS4 sono stati precedentemente descritti da Guillamon *et al.* (1998).

La *mastermix* è stata preparata ponendo in tubi da 0,2 ml le seguenti concentrazioni di reagenti: 200 mM dNTPs (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden), 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,02 U/ml Taq polimerasi (Amersham), 2 µM di ciascun *primer* (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany; HPSF purificati), per un volume totale di 25 µl. Ad ogni provetta contenente la *mastermix* è stata aggiunto, per ciascun ceppo, un'aliquota di 5 µl della sospensione cellulare, preparata come indicato in precedenza.

I campioni sono stati posti nel *thermalcycler* prevedendo, per ottenere la lisi cellulare, un riscaldamento preliminare a 94°C per 5 min. Il successivo protocollo di amplificazione PCR è costituito da 30 cicli di: denaturazione iniziale a 94°C per 30s; *annealing* a 56°C per 30s ed *extension* a 72°C per 30s.

Il prodotto di amplificazione è stato controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio (1%). La corsa è stata effettuata in un apparato per elettroforesi orizzontale usando TBE (0,5X, 44,5 mM Tris, 44,5 mM acido borico, 1 mM EDTA) come tampone ed applicando una differenza di potenziale variabile di 100 V. La presenza di una banda di circa 1000 bp ha consentito di procedere nel sequenziamento degli amplificati.

Dopo la quantificazione su gel d'agarosio i prodotti di PCR sono stati opportunamente diluiti. Un'aliquota contenente 20 ng di DNA di ciascun prodotto di amplificazione è stata mescolata con 6,4 pmoli di *primer* ITS1 in una microprovetta da 0,2 ml. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad essiccazione e consegnati al Servizio Sequenziamento di *BMR Genomics* (Padova).

L'analisi delle sequenze nucleotidiche fornite da *BMR Genomics* è stata effettuata mediante software per l'analisi di similarità di sequenza (BLAST e CLUSTALW), disponibili in rete presso i principali *server* di biologia molecolare. L'identificazione delle specie è stata eseguita confrontando l'allineamento BLASTN delle sequenze ottenute con quelle presenti nel *database* pubblico Gen Bank. Per l'attribuzione tassonomica è stato considerato un minimo di similarità di sequenza del 98 %.

2.4. Valutazione del vigore fermentativo

Il vigore fermentativo di ciascun ceppo di lievito è stato valutato secondo il metodo descritto da Delfini (1995). Le prove sperimentali sono state condotte a 25 e 40°C in due mezzi colturali: MNS glucosio (contenente 20% glucosio) ed MNS glucosio + xilosio (contenente 10% glucosio e 5% xilosio). In breve, un pre-cultura di lievito, cresciuta *overnight* in YPD, è stata utilizzata per inoculare 100 ml di mezzo colturale MNS alla concentrazione finale di $7,5 \times 10^4$ cellule/ml. Le bottiglie di fermentazione, dalla capacità di 120 ml, sono state quindi chiuse mediante tappi in plastica opportunamente sterilizzati ed incubate in condizioni statiche a 25 e 40°C. L'esperimento è stato condotto in duplicato.

Il calo in peso dovuto alla perdita di CO₂ evoluta durante la fermentazione è stato monitorato giornalmente. La misura registrata è stata convertita in quantità di glucosio consumato mediante il fattore di conversione 2,118 proposto da Delfini (1995). Sono stati

considerati come parametro di confronto tra i ceppi il calo in peso dopo 2, 7, 14 e 21 giorni di incubazione.

2.5. Valutazione della tolleranza agli inibitori

La tolleranza dei ceppi di lievito *S. cerevisiae* nei confronti degli inibitori normalmente presenti negli idrolizzati di lignocellulosa è stata valutata in terreno YNB liquido.

Per la preparazione dell'inoculo, gli isolati di lievito sono stati coltivati *overnight* in YNB, centrifugati (5000 rpm, 2 min), lavati 2x, risospesi in NaCl (0,9%) ed inoculati alla concentrazione di circa 1×10^6 /ml in 900 μ l di terreno colturale, precedentemente aliquotato in *ependorf* dalla capacità di 2 ml.

Il terreno colturale YNB è stato preparato aggiungendo, dopo sterilizzazione in autoclave, concentrazioni crescenti dei singoli inibitori e anche dei *cocktail* di inibitori. Le concentrazioni proposte in questa tesi derivano da un precedente studio di numerosi lavori scientifici finalizzato alla individuazione, per ciascun inibitore, di un valore medio espresso in g/l che si può riscontrare in idrolizzati derivati da differenti matrici lignocellulosiche. I valori utilizzati in questa tesi sono riportati in Tabelle 2.4 e 2.5, rispettivamente, come singolo o formulati in *cocktails*.

Tabella 2. 4. Inibitori

Inibitore	concentrazione crescente (g/l)			
acido acetico	1,80	3,60	5,40	7,20
acido formico	0,61	1,22	1,83	2,44
furfurale (2-furaldehyde)	0,69	1,39	2,08	2,77
idrossi-metil-furfurale	0,94	1,88	2,81	3,75

I *cocktail* sono stati formulati aggiungendo concentrazioni crescenti di ciascun inibitore secondo quanto descritto nella Tabella 2.5.

Tabella 2. 5. Composizione dei *cocktail* utilizzati come inibitori

Componenti del <i>Cocktail</i>	Concentrazione crescente dei <i>cocktail</i>			
	A	B	C	D
acido lattico	1,73	3,45	5,17	6,89
acido acetico	1,80	3,6	5,40	7,20
acido formico	0,61	1,22	1,83	2,44
furfurale	0,69	1,39	2,08	2,77
Idrossi-metil-fufurale	0,94	1,88	2,81	3,75

L'esperimento eseguito in duplicato, è stato condotto a 30°C in uno *shaker* orizzontale con una agitazione di circa 100 *rpm*. Dopo 40 ore di incubazione, si è proceduto alla lettura della densità ottica ($DO_{600\text{ nm}}$) mediante spettrofotometro. La tolleranza a ciascuna concentrazione di inibitore e di *cocktail* è stata valutata come percentuale di densità ottica rispetto al valore di DO registrato nel terreno di controllo YPD senza aggiunta di inibitore.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Dal processo di selezione operato a partire da vinacce e in presenza di inibitori come descritto in materiali e metodi, sono stati isolati quaranta ceppi di lievito. I venti ceppi di lievito, isolati da vinaccia contenente il *cocktail* di inibitori A, sono stati nominati con la lettera A mentre i venti isolati di lievito, ottenuti da vinaccia addizionata del *cocktail* di inibitori B, sono stati identificati con la lettera B.

3.1. Identificazione genetica degli isolati di lievito

I quaranta ceppi di lievito isolati su terreno WL da vinaccia contenente elevate concentrazioni di inibitori sono stati identificati mediante il sequenziamento di una porzione della regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Tutti gli isolati sono risultati afferenti alla specie *S. cerevisiae* e sono stati quindi saggiati per il loro vigore fermentativo e la tolleranza ad inibitori (acidi organici e derivati del furano).

3.2. Valutazione del vigore fermentativo

I quaranta ceppi di lievito, identificati come *S. cerevisiae* sono stati valutati per la tolleranza agli inibitori sono stati valutati per la loro capacità fermentativa in un terreno colturale minimo (MNS) contenente glucosio (200 g/l) o una miscela di glucosio (100 g/l) e xilosio (50 g/l).

Come indicato in Tabella 3.1 (MNS contenente 200 g/l di glucosio), la maggior parte dei lieviti hanno dimostrato promettenti prestazioni in termini di vigore fermentativo alla temperatura di 25°C mentre, una volta incubati a 40°C tutti i ceppi saggiati mostrano un calo significativo nel consumo di glucosio. Un simile risultato è comprensibile considerando l'*optimum* termico (25-30°C) della specie *S. cerevisiae* (Moritura *et al.*, 1997). A temperature più elevate (38-43°C) infatti, il lievito subisce notevoli stress metabolici, con conseguenti diminuzioni nella velocità e resa fermentativa (Ojumue e Ogunkunle, 2005). In linea generale, è opportuno sottolineare che vi sono differenze significative tra i ceppi di *S. cerevisiae* A (isolati da vinaccia contenente il *cocktail* di inibitori A) e gli isolati *S. cerevisiae* B (ottenuti da vinaccia contenente il *cocktail* di inibitori B).

A 25 °C, numerosi ceppi, come *S. cerevisiae* A12, A16 e B4, si sono distinti per il loro elevato vigore fermentativo, essendo capaci di consumare tutto il glucosio disponibile. A 40

°C, invece, solo alcuni ceppi sono risultati capaci di utilizzare tutto il glucosio(100 g/l) contenente nel terreno colturale (*S. cerevisiae* A7, A15 e A20).

Tabella 3. 1. Vigore fermentativo, espresso in grammi di zucchero consumati per litro di mezzo colturale (glucosio 200g/l), di ceppi *S. cerevisiae* incubati a 25°C e 40 °C in MNS

Specie	Ceppo	Temperatura							
		25 °C				40 °C			
		Giorni				Giorni			
		2	7	14	21	2	7	14	21
<i>S. cerevisiae</i>	A1	+	+++	++++	+++++	-	+	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A2	+	++++	+++++	+++++	-	+	+	++
<i>S. cerevisiae</i>	A3	+	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A4	-	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A5	-	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A6	+	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A7	+	+++	++++	++++	+	++	+++	+++
<i>S. cerevisiae</i>	A8	+	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A9	+	+++	++++	+++++	-	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A10	+	+++	++++	+++++	-	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A11	-	+++	++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A12	-	+++	+++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A13	+	+++	++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A14	+	++++	+++++	+++++	-	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A15	+	+++	++++	++++	++	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A16	+	+++	++++	+++++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A17	+	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A18	+	+++	++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A19	+	+++	++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	A20	+	+++	++++	++++	++	+++	+++	+++
<i>S. cerevisiae</i>	B1	+	+++	++++	+++++	+	+	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	B2	+	+++	++++	++++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B3	+	+++	++++	++++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B4	+	+++	++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	B5	-	+++	++++	+++++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B6	+	+++	++++	+++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B7	-	+++	++++	+++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B8	-	+++	++++	+++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B9	+	+++	++++	+++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B10	+	+++	++++	+++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	B11	-	+++	++++	++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B12	+	+++	+++	++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B13	+	+++	++++	++++	+	+	+	++
<i>S. cerevisiae</i>	B14	+	+++	++++	++++	-	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	B15	+	+++	+++	+++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B16	-	+++	++++	++++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B17	+	+++	++++	+++++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B18	+	++++	++++	++++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B19	+	+++	++++	++++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	B20	+	+++	++++	++++	+	+	+	+

- :<30 g/l; + : 30-70 g/l; ++ :70-110 g/l; +++ : 110-150 g/l; ++++ : ≥150-190 g/l; +++++ : ≥190 g/l

Le cinetiche di fermentazione dei ceppi di lievito con le migliori performance fermentative una volta incubati a 25 e 40 °C in MNS sono riportate in Figura 3.1 unitamente come termine di paragone, a quella dei ceppi di *S. cerevisiae* B15 (148,2 g/l) e B14 (31,0 g/l) caratterizzati dai più bassi vigori fermentativi, rispettivamente, a 25 e 40 °C. Questo ultimo ceppo (B14), a la temperatura di 25 °C utilizzo più di 150 g/l del glucosio disponibile nel terreno colturale come è riportata in Tabella 3.1.

Quando il saggio è condotto a 40°C si nota un evidente e generalizzato calo di vigore fermentativo: i ceppi *S. cerevisiae* sono capaci di utilizzare solo una minima parte dello zucchero disponibile nel terreno colturale. A 25 °C (Figura 3.1a), il più elevato vigore fermentativo è stato conseguito da *S. cerevisiae* B4, A12, A16 e A1 capaci di utilizzare, già nei primi giorni di fermentazione, ingenti quantitativi di glucosio. A 40 °C (Figura 3.1b) invece, in ceppi di *S. cerevisiae* più interessanti sono risultati essere *S. cerevisiae* A20, A7, A15 e A8 avendo una velocità di consumo di glucosio molto simili a quelli saggiati a 25 °C al meno nei primi gironi (Figura 3.1).

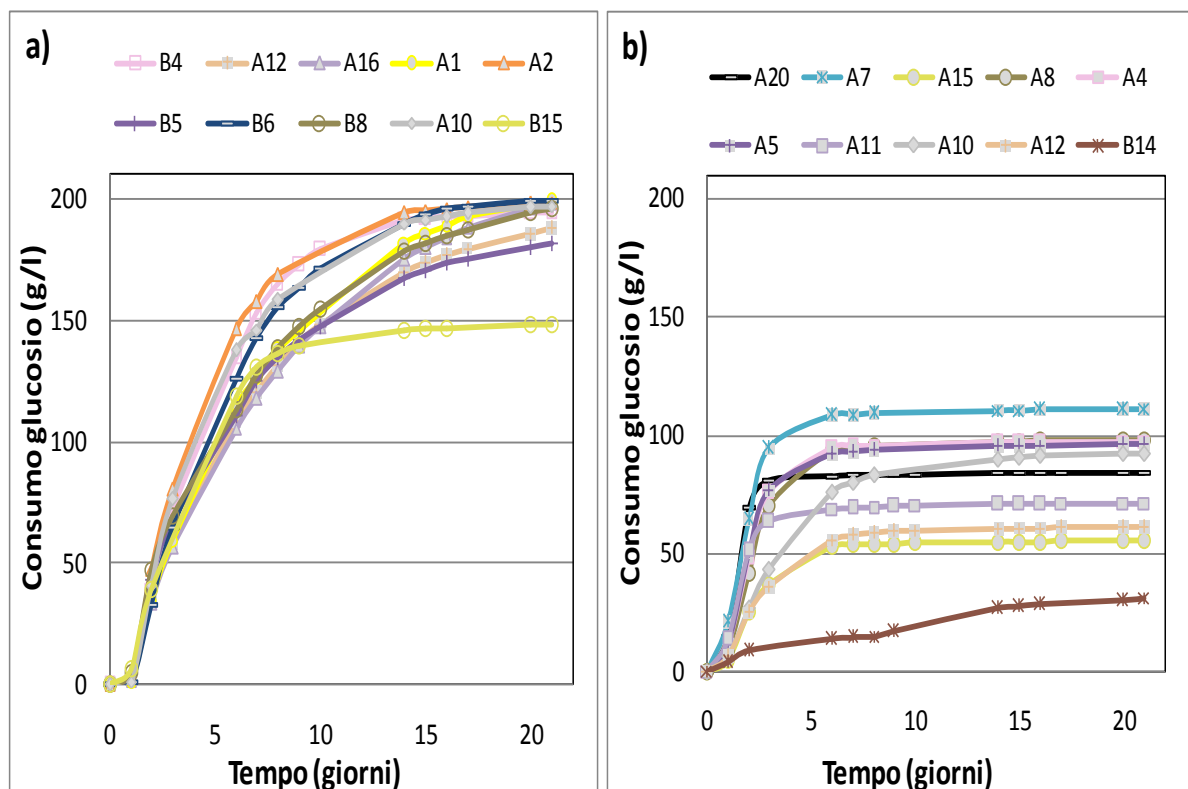


Figura 3. 1. Cinetica di fermentazione di ceppi *S. cerevisiae* incubati a 25°C (a) e 40 °C (b) in terreno colturale MNS contenente una miscela di glucosio (200 g/l). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.

La Tabella 3.2 riporta i dati del vigore fermentativo dei quaranta ceppi di *S. cerevisiae*, incubati a 25°C in MNS contenente glucosio (100 g/l) e xilosio (50 g/l). Anche in questo caso è evidente l'effetto della temperatura sulla capacità fermentativa dei ceppi di *S. cerevisiae*: a 40 °C, il consumo di glucosio è inferiore rispetto a quello registrato a 25 °C. In presenza di xilosio, i ceppi saggiati si caratterizzano per un più contenuto potere fermentativo rispetto a quello esibito nel terreno colturale contenente solo glucosio. Molto probabilmente, infatti, pur non essendo capaci di metabolizzare lo xilosio, lo zucchero pentosio potrebbe tuttavia aver influito sul tasso di *uptake* del glucosio riducendo così la resa in alcool etilico.

Quando il saggio è condotto a 40°C si nota un evidente e generalizzato calo di vigore fermentativo: i ceppi *S. cerevisiae* sono capaci di utilizzare solo una minima parte dello zucchero disponibile nel terreno colturale. A 25 °C (Figura 3.2a), il più elevato vigore fermentativo è stato conseguito da *S. cerevisiae* B17, A20, B20 e B19 capaci di utilizzare, già nei primi giorni di fermentazione, ingenti quantitativi di glucosio. A 40 °C (Figura 3.2b) invece, in ceppi di *S. cerevisiae* più interessanti sono risultati essere *S. cerevisiae* B16, A1, A2 e A7, il ceppo *S. cerevisiae* B14 (Figura 3.2b) mostro il più basso vigore fermentativo dei relativi quaranta ceppi saggiati (Tabella 3.2).

Tabella 3. 2. Vigore fermentativo, espresso in grammi di zucchero consumati per 100 ml di mezzo colturale (glucosio 100g/l e xilosio 50g/l), di ceppi *S. cerevisiae* incubati a 25°C e 40 °C in MNS

Specie	Ceppo	Temperatura							
		25 °C				40 °C			
		Giorni				Giorni			
		2	7	14	21	2	7	14	21
<i>S. cerevisiae</i>	A1	-	++	++	++	-	+	+	++
<i>S. cerevisiae</i>	A2	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A3	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A4	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A5	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A6	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A7	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A8	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A9	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A10	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A11	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A12	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A13	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A14	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A15	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A16	-	+++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A17	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A18	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A19	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	A20	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B1	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B2	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B3	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B4	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B5	+	++	++	++	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	B6	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B7	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B8	+	++	++	++	-	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	B9	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B10	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B11	-	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B12	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B13	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B14	+	++	++	++	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	B15	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B16	-	++	++	++	+	++	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	B17	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B18	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B19	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	B20	+	++	++	++	+	+	+	+

- :<30 g/l; + : 30-70 g/l; ++ :70-110 g/l; +++ : 110-150 g/l; ++++ : ≥150-190 g/l; +++++ : ≥190 g/l

Le cinetiche di fermentazione dei ceppi di *S. cerevisiae* caratterizzati dai più elevati valori di vigore fermentativo in MNS (glucosio 100g/l e xilosio 50 g/l) incubati

rispettivamente a 25 °C e 40°C sono riportate in Figura 3.2. I ceppi *S. cerevisiae* A16 e B14, caratterizzati dal più basso vigore fermentativo, rispettivamente a 25 e 40°C, sono stati inseriti, a fini comparativi, in Figura 3.2. La maggior parte dei lieviti è in grado di consumare tutto il glucosio disponibile nel mezzo. Il ceppo A16 (incubato a 25 °C) conferma una cinetica di fermentazione più lenta rispetto a quella degli altri isolati (Figura 3.2a). Una volta incubati a 40°C, le performance fermentative dei ceppi sono decisamente più contenute. Le differenze in termini di consumo di glucosio sono molto marcate tra gli isolati saggiati: ad esempio, *S. cerevisiae* A18 selezionato tra i migliori nove ceppi per quanto concerne il vigore fermentativo a 25°C ha una capacità fermentativa decisamente inferiore a 40°C.

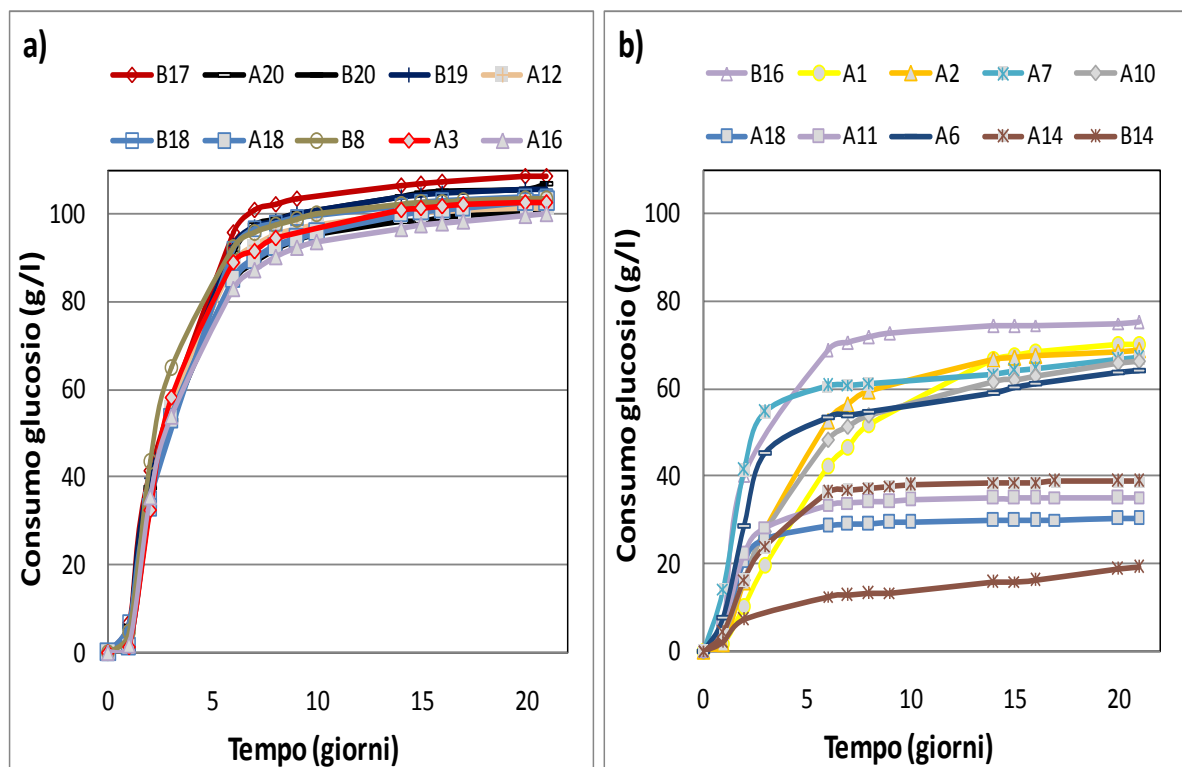


Figura 3. 2. Cinetica di fermentazione di ceppi *S. cerevisiae* incubati a 25°C (a) e 40 °C (b) in terreno culturale MNS contenente una miscela di glucosio 100g/l e xilosio 50g/l. I dati riportati sono la media di due repliche: la differenza tra i valore è inferiore al 5%.

3.3. Valutazione della tolleranza agli inibitori presenti negli idrolizzati lignocellulosici

I quaranta ceppi di *S. cerevisiae* isolati in questo lavoro di tesi da vinaccia sono stati saggiati anche per la loro tolleranza a differenti sostanze inibenti aggiunte nel terreno culturale YNB prevedendone poi l'aggiustamento del pH a 4.5.

Dei nove ceppi *S. cerevisiae* migliori su 40 saggiati (tanto dei ceppi gruppo *cocktail* A come i ceppi gruppo *cocktail* B), si osserva che quelli del gruppo B rispondono meglio in confronto a quelli del gruppo A quando si fa un'analisi di risposta al *cocktail* C; numericamente 8 su 3 crescono a questo livello rispettivamente (Tabella 3.3).

Come indicato in Tabella 3.3, la tolleranza a ciascun inibitore o *cocktail* di inibitori è risultata ceppo-specifica. Gli acidi deboli saggiati: acido acetico e formico, non hanno ridotto fortemente la crescita dei ceppi saggiati almeno fino a concentrazioni di, rispettivamente, 5,4 g/l e 1,83 g/l. A queste concentrazioni, alcuni ceppi di lievito, quali *S. cerevisiae* B1, B2, B14, B15, A9 e A9, non sono influenzati negativamente da acido acetico ed acido formico. In linea generale tra i due acidi sembra avere un potere inibente più forte il acido acetico. La presenza di acido formico in concentrazioni crescenti ne ha infatti limitato considerevolmente la crescita. La presenza di concentrazioni crescenti di furfurale influisce negativamente sulla capacità dei lieviti di produrre biomassa (Tabella 3.3). Alla concentrazione di 2,08 g/L, infatti, la maggioranza dei ceppi valutati presenta una crescita ridotta (<50% della crescita, OD relativo) e solo alcuni *S. cerevisiae* sono in grado di tollerare un contenuto di furfurale pari a 2,77 g/l. L'idrossimetilfurfurale sembra tenere un comportamento inibenti simile a quelli degli acidi deboli (Tabella 3.3).

I ceppi di *S. cerevisiae* sono stati valutati per la loro capacità di crescere anche in terreni colturali contenenti differenti *cocktail* di inibitori (vedi paragrafo 2.5) al fine di studiarne un eventuale effetto sinergico. Come riportato in Tabella 3.3, tutti i lieviti hanno dimostrato una buona tolleranza nei confronti del *cocktail* A e una considerevole sensibilità al *cocktail* B ottenuto aggiungendo (g/l): acido acetico 3,60, acido formico 1,22; acido lattico 3,44; furfurale: 1,39 e HMF 1,88. In presenza del *cocktail* C, solo alcuni ceppi di lievito hanno dimostrato una buona tolleranza. Questo risultato è di notevole interesse, dal momento che nessun ceppo di *S. cerevisiae* è stato finora descritto per una così elevata tolleranza nei confronti di molteplici inibitori. È opportuno sottolineare che la maggior parte dei ceppi capaci di tollerare il *cocktail* C derivino da vinaccia contenente il *cocktail* B (Figura 3.5).

Tabella 3. Tolleranza di ceppi di lievito *S. cerevisiae* nei confronti di concentrazioni (g/l) crescenti di acidi deboli, idrossi-metil-furfurale e furfurale aggiunti nel mezzo YNB in singolo o formulati nei *cocktail* A, B, C, D

Specie	Ceppo	Acido acetico (g/l)				Acido formico(g/l)				HMF(g/l)				Furfurale(g/l)				Cocktail				
		1,80	3,60	5,40	7,20	0,61	1,22	1,83	2,44	0,94	1,88	2,81	3,75	0,69	1,39	2,08	2,77	A	B	C	D	
<i>S. cerevisiae</i>	A1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A18	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	A20	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B18	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<i>S. cerevisiae</i>	B20	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
																					>90	■
																					71-90	■
																					51-70	■
																					26-50	■
																					<25	■

In Figura 3.4, è riportata la tolleranza agli acidi deboli: acido acetico (Figura 3.4a) e acido formico (Figura 3.4b) dei migliori nove ceppi di *S. cerevisiae* e anche a fianco a loro il più sensibile. In relazione al acido acetico il lievito più sensibile è il A19. I ceppi *S. cerevisiae* B1 e B15 si sono distinti per la sua notevole capacità di produrre biomassa anche alle più elevate concentrazioni di acido acetico. Quando il saggio si è fatto con l'acido formico il più sensibile è il ceppo *S. cerevisiae* B12 e dal altra parte il ceppo *S. cerevisiae* A15 e B2 si sono distinti per la sua notevole capacità di produrre biomassa anche alle più elevate concentrazioni di acido formico.

Le risposte ai singoli inibitori dei 9 ceppi migliori rispetto ai 40 saggiati e il peggiore si mostrano nelle seguenti figure (Figura 3.3, e Figura 3.4) e anche mostrato come combinazione de tutti quanti espresso come *cocktail* (Figura 3.5).

- **Acidi deboli : Acido acetico e acido formico**

Gli isolati che hanno dimostrato una maggiore tolleranza al acido acetico sono riportati in Figura 3.3a. *S. cerevisiae* B1, B14 e B15 si sono distinti per la loro elevata capacità di crescere in presenza di 7,20 g/l di acido acetico (crescita relativa fino al 85 % di OD relativa). Il ceppo più sensibile alle più alte concentrazioni di acido acetico è il ceppo *S. cerevisiae* A19 che riesce a crescere a meno del 20 % di OD relativa.

Anche la tolleranza all'acido formico è risultata ceppo-specifica. Alle concentrazioni valutate in questa tesi, tale inibitore è meno tossico per i ceppi di lievito saggiati rispetto al all'acido formico (Figura 3.3b). La maggior parte dei lieviti, infatti, ha dimostrato una buona tolleranza anche in presenza di 2,44 g/l di acido formico. Di notevole interesse, risultano alcuni ceppi di *S. cerevisiae* capaci di crescere fino al 90% di OD relativa (A15, B2 e B4), una volta incubati in YNB contenente la più alta concentrazione di acido formico (2,44 g/l). Il ceppo più sensibile alle più alte concentrazioni di acido formico è il ceppo *S. cerevisiae* B12 che riesce a crescere fino a meno del 45 % di OD relativa.

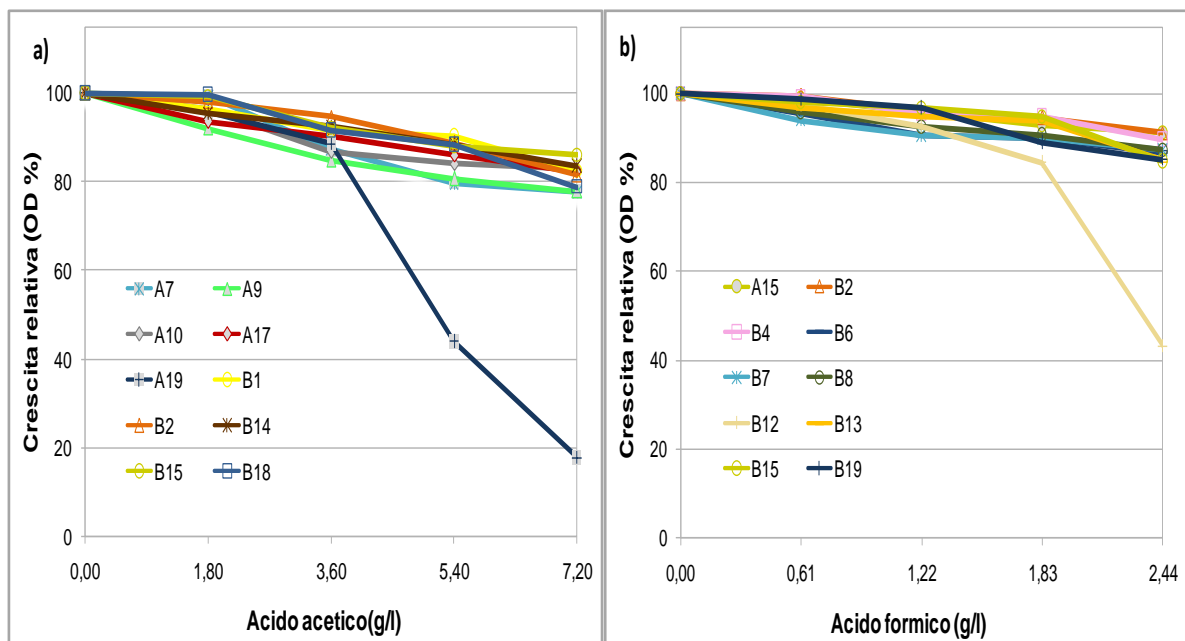


Figura 3. 3. Tolleranza all'acido acetico (a) e acido formico (b) di ceppi *S. cerevisiae* cresciuti per 40 h in YNB, contenente concentrazioni crescenti di inibitore (1,80; 3,60; 5,40; 7,20 g/l e 0,61; 1,22; 1,83; 2,44 g/l rispettivamente). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.

- Derivati del furano: furfurale e idrossi-metil-furfurale (HMF)

Gli isolati che hanno dimostrato una maggiore tolleranza al furfurale sono riportati in Figura 3.4b. *S. cerevisiae* A4 e A5 si sono distinti per la loro elevata capacità di crescere in presenza di 2,77 g/l di furfurale (crescita a torno del 75 % di OD relativa). Invece il ceppo *S. cerevisiae* A13 risulta il più sensibile mostrando una crescita quasi nulla (Figura 3.4b) Anche la tolleranza all'idrossimetilfurfurale è risultata ceppo-specifica. Alle concentrazioni valutate in questa tesi, tale inibitore è meno tossico per i ceppi di lievito saggiati rispetto al furfurale. La maggior parte dei lieviti, infatti, ha dimostrato una buona tolleranza anche in presenza di 2,81 g/l di HMF. Di notevole interesse, risultano alcuni ceppi di *S. cerevisiae* capaci di crescere fino al 90% di OD relativa (A4, B18 e B12), una volta incubati in YNB contenente la più alta concentrazione di HMF (3,75 g/L). Il ceppo più sensibile alle più alte concentrazioni di idrossimetilfurfurale è il ceppo *S. cerevisiae* B2 che riesce a crescere fino a meno del 20 % di OD relativa.

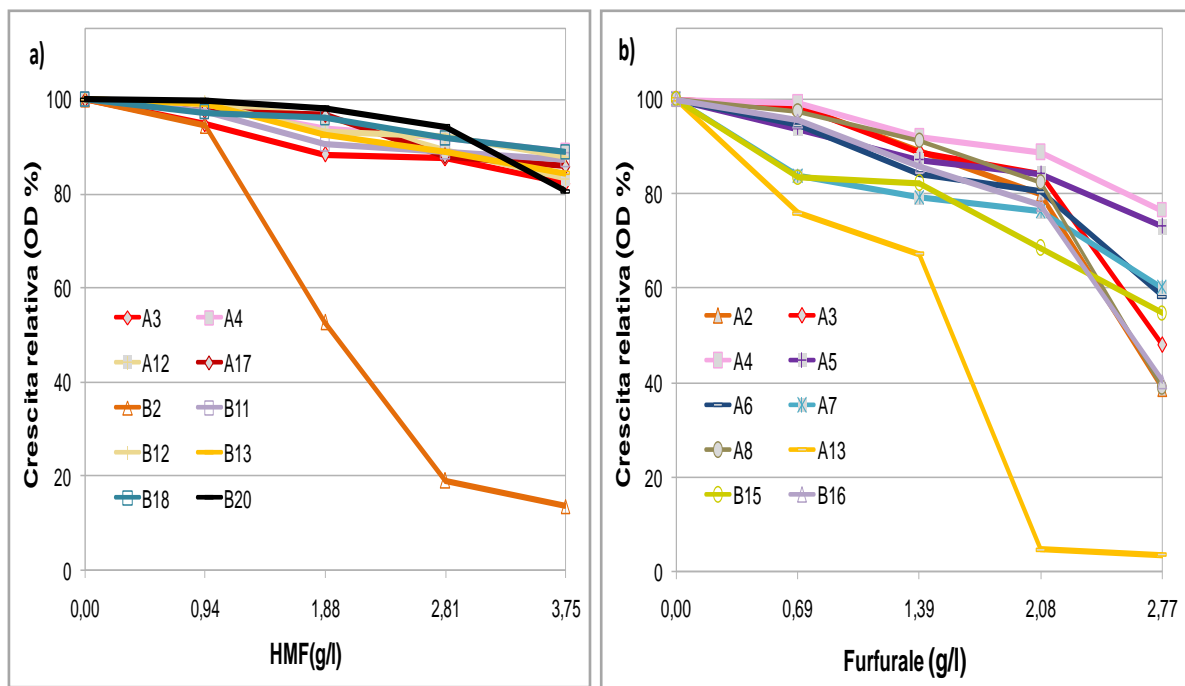


Figura 3. 4. Tolleranza all'HMF (a) e al furfurale (b) di ceppi *S. cerevisiae* cresciuti per 40 h in YNB contenente concentrazioni crescenti di inibitore (0,94; 1,88; 2,81; 3,75 g/l e 0,69; 1,38; 2,08; 2,77 g/l rispettivamente). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.

- *Cocktail*

Gli isolati che hanno dimostrato una maggiore tolleranza al cocktail sono riportati in Figura 3.5. *S. cerevisiae* B5, B6 e B7 si sono distinti per la loro elevata capacità di crescere in presenza del *cocktail* C (crescita a torno del 50 % di OD relativa). Invece il ceppo *S. cerevisiae* B2 risulta il più sensibile mostrando una crescita quasi nulla anche incubato con il *cocktail* A (Figura 3.5)

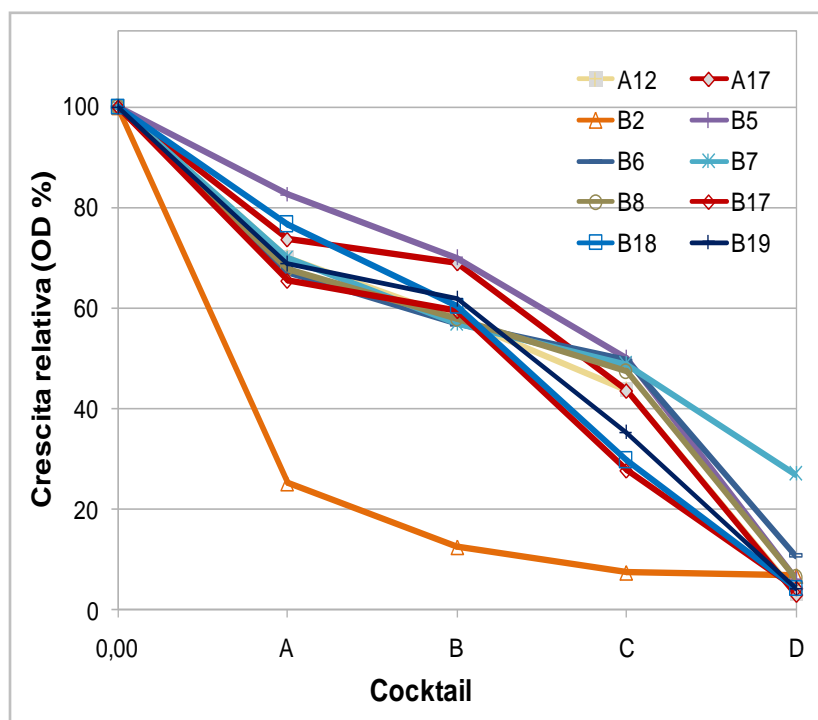


Figura 3. 5. Tolleranza ai cocktail di ceppi *S. cerevisiae* cresciuti per 40 h in YNB contenente concentrazioni crescenti di inibitore (1,8; 3,6; 5,4; 7,2 g/l). I dati riportati sono la media di due replicati: la differenza tra i valori è inferiore al 5%.

Questa evidenza sembra confermare l'efficacia del programma di arricchimento, in vinaccia d'uva, di ceppi di lieviti resistenti a molteplici inibitori. La presenza costante di inibitori, aggiunti progressivamente in concentrazioni crescenti, unitamente alla disponibilità di elevati livelli di zucchero, sembrano aver contribuito alla selezione di ceppi di *S. cerevisiae* altamente fermentanti capaci, inoltre, di tollerare concentrazioni di inibitori più elevate rispetto a quelle utilizzate nel programma di arricchimento. La disponibilità di ceppi lievito efficacemente fermentanti e, al tempo stesso, tolleranti nei confronti degli inibitori presenti negli idrolizzati lignocellulosici è di fondamentale importanza per lo sviluppo di un lievito per la produzione industriale di bioetanolo di seconda generazione. In questa prospettiva, considerando sia i risultati del vigore fermentativo (Paragrafo 3.2) sia i dati ottenuti circa la tolleranza agli inibitori, i lieviti *S. cerevisiae* isolati e caratterizzati nel corso di questo lavoro di tesi sono da considerarsi decisamente interessanti. In particolare, alcuni ceppi, come ad esempio *S. cerevisiae* A12, A17, B6 e B7, hanno dimostrato una notevole tolleranza agli inibitori ed elevate performance fermentative anche a 40 °C.

4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

In questo lavoro di tesi, è stato eseguito un programma di isolamento mirato all'ottenimento di ceppi di lievito *S. cerevisiae* che potrebbero essere efficientemente utilizzati in impianti industriali per la produzione di bioetanolo di seconda generazione a partire da idrolizzati lignocellulosici. Alcuni ceppi di lievito, infatti, hanno dimostrato notevoli capacità fermentative e promettente tolleranza agli inibitori. Il programma di arricchimento in ceppi di lievito fermentanti e tolleranti ottenuto aggiungendo progressivamente concentrazioni crescenti di inibitori (*cocktail* A e B) alla vinaccia d'uva si è rivelato uno strumento molto efficace per selezionare ceppi di *S. cerevisiae* capaci di tollerare furani e acidi deboli.

In particolare, alcuni ceppi, come ad esempio *S. cerevisiae* A12, A17, B6 e B7, hanno dimostrato una notevole tolleranza agli inibitori ed elevate performance fermentative anche a 40 °C

I ceppi di *S. cerevisiae* più promettenti verranno valutati in futuro per la capacità di produrre etanolo sia da *cocktails* di inibitori sia da differenti idrolizzati lignocellulosici. Isolati di lievito con simili caratteristiche costituiscono inoltre un importante punto di partenza verso lo sviluppo di un ceppo CBP per la conversione di matrici lignocellulosiche in etanolo.

5. BIBLIOGRAFIA

- Almeida, J., Molding, T., Hahn-Hagerdal, B., Linden, G., and Gorwa-Grauslund, M. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 82, 340-349.
- Bailey, B. (1996). Performance of ethanol as a transportation fuel. In: Wyman C.E. (Ed) *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Taylor and Francis, Bristol, Paris.
- Ballesteros, M., Oliva, J., Negro, M., Manzanares, P., and Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem*, 39:1843-8.
- Campell, C. J., and Laherrère, J. H. (1998). The end of cheap oil. *Scientific American*, 19 (2): 10-13.
- Carrizo, S., Ramousse, D., and Velut, S. (2009). Biocombustibles en Argentina, Brasil y Colombia: Avances y limitaciones. *Geograficando*, 5: 63-82.
- Cencič, V., Jodice, R., Migliardi, D., Picco, D., Pin, M., and Radu, R. (2007). I biocarburanti. Consorzio per l'AREA di ricerca scientifica e tecnologica di Trieste. AREA Science Park.
- Chandel, A., Chan, E., Rudravaram, R., Narasu, M., Rao, L., and Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol Mol Biol*, 2: 14-22.
- Choi, C., and Matherws, A. (1996). Two-step acid hydrolysis process kinetics in the saccharification of lowgrade biomass: 1. Experimental studies on the formation and degradation of sugar. *Bioresour Technol*, 44: 101-106.
- Delfini, C. (1995). *Scienza and tecnica di microbiologia enologica*. Edizione Il lievito, Asti.
- Dufey, A. (2006). *Biofuel production, trade and sustainable development: emerging issues*, Economics Programme/International Institute for Environment and Development, London
- Eisentraut, A. (2010). Sustainable production of second-generation biofuels. Potential and perspectives in major economies and developing countries. International Energy Agency (IEA), 221.

- Favaro, L., Basaglia, M., van Zyl, W., and Casella, S. (2012a). Using an efficient fermenting yeast enhances ethanol production from unfiltered wheat bran hydrolysates. *Appl Energy*, doi , 20.1016/j.apenergy.2012.05.059.
- Favaro, L., Jooste, T., Basaglia, M., Rose, S., Saayman, M., Gorgens, J., *et al.* (2012b). Codon-optimized glucoamylase sGAI of *Aspergillus awamori* improves starch utilization in an industrial yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 95: 957-968.
- Fernández, T., Marcet, M., Olivera, W., and Martín, C. (2008). Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardiente y ron. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 16: 64-70.
- Geddes, C., Nieves, I., and O Ingram, L. (2011). *Current Opinion in Biotechnology: Advances in ethanol production*. *El Sevier*, 22 (3): 312-319.
- Guillamon, J., Sabatè, J., Barrio, E., Cano, J., and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol*, 169: 387-392.
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M., Lidèn, G., and Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol-fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*, 44: 549-556.
- Hasunuma, T., and Kondo, A. (2012). Consolidates bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*, 15: 1-8.
- IEA. (2008). "International Energy Agency". Events.
- International Energy Agency. (2008). *New Energy Realities - WEO Call for Global Energy Revolution Despite Economic Crisis*.
- Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., Albermann, K., André, B., Ansorge, W., *et al.* (1997). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*, 387: 87-90.
- Kang, H., Kim, S., and Choi, G. (2012). Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612. *Bioprocess Biosyst Eng*, 35:115-22.

- Kim, J., Lee, Y., and Torget, R. (2001). Cellulose hydrolysis under extremely low sulphuric acid and high-temperature condition. *Appl Biochem Biotechnol*, 33: 331-340.
- Kitagawa, T., Tokuhira, K., Sugiyama, H., Kohda, K., Isono, N., Hisamitsu, M., *et al.* (2010). Construction of B-glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:1841-53.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., *et al.* (1998). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol*, 24, 151-159.
- Liao, W., Liu, Y., Wen, Z., and Chen, S. (2006). Acid hydrolysis of fibers from dairy manure. *Bioresour Technol*, 51: 87-95.
- Lynd, L. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and the polizy. *Annual Review of Energy and the Enviroment*, 21:402-465.
- Lynd, L., Weimer, P., Van Zyl, W., and Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol*, 66: 506-577.
- Maiorella, B., Blanch, H., and Wilke, C. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 25: 103-121.
- Mamma, D., Koullas, D., Fountoukidis, G., Kekos, D., Macris, B., and Koukios, E. (1996). Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation to carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process Biochem*, 1: 377-381.
- Menon, V., Prakash, G., Prabhune, A., and Rao, M. (2010). Biocatalytic approach for the utilization of hemicellulose for ethanol production from agricultural residue using thermstable xylanase and thermotolerant yeast. *Bioresour Technol*, 101:5366-73.
- Modig, T., Lidén, G., and Taherzadeh, M. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *J Biochem*363: 769-776.

- Mohagheghi, A., Ruth, M., and Schell, D. (2006). Conditioning hemicelluloses hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochem*,3: 6-11.
- Monsma, D. (2006). The report of an Aspen institute policy diague, a high growth strategy for ethanol. Washington, EE.UU.
- Morimura S., Zhong Y.L. and Kida K., 1997, Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. *J Ferment Bioeng*83: 271-274.
- Nguyen, Q. (1998). Milestone completion report: evaluation of a two-stage dilute sulphuric acid hydrolysis process, Internal Report, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
- Nilverbrant, N., Persson, P., Reimann, A., De Sousa, F., Gorton, L., and Jonsson, L. (2003). Limits for alkaline detoxification of dilute acid lignocellulose hydrolysates. *Appl Biochem Biotechnol*, 105: 615-628.
- Oberoi, H., Babbar, N., Sandhu, S., Dhaliwal, S., Kaur, U., Chadha, B., *et al.* (2011). Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *J Ind Microbiol Biotechnol*,39(4): 557-66<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-011-1060-2>.
- OECD. (2002). OECD Agricultural Outlook: 2002-2007. Annex II. Glossary of Terms. Paris.
- Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., and Hahn, G. (2006). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn storver at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J Biotechnol*, 126: 488-498.
- Palmarola-Adrados, B., Choteborska, P., Galbe, M., and Zancchi, G. (2005). Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology*, 96(7):843-850.

- Palmqvist, E., and Hahn-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol*, 74: 17-24.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., and Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*, 5: 53-63.
- Pessani, M., Atiyeh, H., Wilkins, M., Bellmer, D., and Banat, I. (2011). Simultaneous saccharification and fermentation of kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and high solid loadings. *Bioresour Technol*, 102:10618-24.
- Pin, M., and Vecchiet, A. (2008). Sviluppo della filiera bioetanolo in Regione Friuli Venezia Giulia. Monografia realizzata dal Centro di Ecologia Teorica ed Applicata-Gorizia (C.E.T.A.), 1-64.
- Prasetyo, J., Naruse, K., Kato, T., Bonchird, C., Harashima, S., and Park, E. (2011). Bioconversion of paper sludge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulase or paper sludge origin and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. *Biotechnol Biofuels*, 4:35.
- Renewable Fuels Assosiation (R.F.A.). (2009). Industry statistics.
- RNCOS. (2006). Abstracts.Biofuel Market Worldwide:
<http://www.marketresearch.com/RNCOS-v3175/Biofuel-Worldwide-1316286/>
- Russel, J. (1992). Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J Appl Bacteriol* (73), 363-370.
- Sánchez, j., and Cardona, C. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* (99), 5270-5295.
- Shapouri, H., Duffield, J., and Wang, M. (2003). The energy balance of corn ethanol revisited. *American Society of Agricultural Engineers*, 46: 959.
- Sheehan, J., and Himmel, M. (1999). Enzymes, energy, and the environmet: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnol Prgr*, 15: 817-827.

- Taherzadeh, M., Gustafsson, L., Niklasson, C., and Lidén, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 701-708.
- Ulbricht, R., Northup, S., and Thomas, J. (1984). A review of 5-hydroxymethylfufural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam Appl Toxicol*, 4: 843-853.
- van Zyl, W., Lynd, L., den Haar, R., and McBride, J. (2007). Cosolidated Bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 108: 205-235.
- Voronovsky, A., Rohuya, O., Abbas, C., and Sibirny, A. (2009). Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. *Metab Eng*, 11:234-42.
- Watanabe, I., Nakamura, T., and Shima, J. (2010). Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. *J Biosci Bioeng*, 110:176-9.
- Wheals, A., Basso, L., Alves, D., and Amorim, H. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol*: 17: 482-487.
- Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., *et al.* (2010). Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88:381-8.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., and Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 3: 56-117.