



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in  
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Valorizzazione dei resti di lavorazione del cacao:  
produzione di bioetanolo e poliidrossialcanoati

Relatore: Prof.ssa Marina Basaglia  
Correlatore: Prof. Lorenzo Favaro

Laureanda  
Giulia Montesi

Matricola n°  
1242701

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



## RIASSUNTO

Questo lavoro è stato svolto presso il laboratorio di Microbiologia di DAFNAE (Department of Agronomy, Food, Natural resources, Animals and Environment) dell'Università degli studi di Padova. L'obiettivo dello studio è stata la valutazione di un sottoprodotto della lavorazione del cacao, le bucce di baccello, provenienti dalla Colombia, in prodotti di valore aggiunto come bioetanolo e polioidrossialcanoati.

L'industria del cacao presenta livelli di produzione massicci che comportano la generazione di una grande quantità di sottoprodotti e l'accumulo di rifiuti agroindustriali che possono rappresentare anche un rischio ambientale.

Il bioetanolo rappresenta una promettente alternativa dei carburanti di origine fossile. In particolare, il bioetanolo prodotto dalle biomasse lignocellulosiche risulta essere una risorsa interessante per le future applicazioni industriali.

I polioidrossialcanoati (PHA), biopolimeri di origine microbica, sono impiegati in alternativa alle plastiche ottenute dal petrolio perché compostabili/biodegradabili.

Questo studio è mirato all'analisi della composizione chimica delle bucce di cacao e alla valutazione di possibili metodi di pretrattamento ai fini di ottenere un substrato idoneo alla crescita di *Saccharomyces cerevisiae* Fm17 e *Cupriavidus necator* DSM545, due tra i microrganismi più efficienti nella produzione, rispettivamente, di bioetanolo e PHA.

## ABSTRACT

This thesis was carried out at the Microbiology laboratory of DAFNAE (Department of Agronomy, Food, Natural resources, Animals and Environment) of the University of Padova. The aim of the study was to evaluate of a by-product of cocoa industry, the cocoa pod husk, from Colombia, for its conversion into value-added products such as bioethanol and PHAs.

Cocoa industry has massive production levels that cause the generation of many by-products and the accumulation of agro-industrial wastes posing serious environmental concerns.

Bioethanol represents an alternative source to replace fossil fuels. Bioethanol produced from lignocellulosic biomasses appears to be an interesting fuel for future industrial applications.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), biopolymers produced by microorganisms, are used as an alternative to plastics obtained by petroleum because they are compostable/biodegradable.

This work focused at the chemical composition of cocoa pod husks and the development of pre-treatment methods for obtaining a suitable substrate for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Fm17 and *Cupriavidus necator* DSM545, two of the most efficient microorganisms in the production of bioethanol and PHAs, respectively.

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>LISTA ABBREVIAZIONI</b> .....	7
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	8
1.1 Le differenti varietà della bacca di cacao e le produzioni annuali.....	8
1.2 Le fasi di produzione del cacao: dalla raccolta alla lavorazione.....	10
1.3 Composizione chimica e utilizzo dei sottoprodotti di lavorazione del cacao nell'ambito dell'economia circolare.....	12
1.4 Il bioetanolo come energia rinnovabile.....	15
1.5 L'etanolo di prima generazione.....	17
1.6 L'etanolo prodotto da biomasse lignocellulosiche (etanolo di seconda generazione).....	19
1.7 Bioplastiche e l'interesse per la sostenibilità ambientale.....	22
1.8 Polioidrossialcanoati (PHA).....	24
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	29
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	30
3.1 Analisi chimiche delle materie prime.....	30
3.2 Determinazione delle condizioni ottimali per il pretrattamento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
3.2.1 Pretrattamento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	31
3.2.2 Saccharificazione enzimatica dei substrati pretrattati con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	32
3.3 Pretrattamento con NaOH.....	32

3.3.1 Saccarificazione enzimatica dei substrati pretrattati con NaOH.....	33
3.4 Analisi degli zuccheri riducenti con saggio DNS.....	33
3.5 Monitoraggio del D-glucosio tramite kit enzimatico Megazyme e misura del grado di saccarificazione.....	35
3.6 Produzione di bioetanolo a partire da cocoa pod husks pretrattati.....	38
3.6.1 Produzione di PHB a partire da cocoa pod husks pretrattati.....	38
3.6.2 Estrazione del PHB.....	39
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>40</b>
4.1 Composizione di cocoa pod husks e cocoa bean shells.....	40
4.2 Messa a punto del sistema di pretrattamento.....	44
4.3 Crescita di <i>S. cerevisiae</i> FM17 e <i>C. necator</i> DSM545 su CPH pretrattato e idrolizzato.....	51
4.4 Estratto di PHB dal substrato idrolizzato e liofilizzato.....	53
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>55</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>57</b>

## LISTA ABBREVIAZIONI

CBS	Cocoa bean shells, gusci di fave di cacao
CPH	Cocoa pod husks, bucce di baccello di cacao
DNS	Acido dinitro-salicilico
MM	Minimal salt medium
OD	Densità ottica
PHA	Poliidrossialcanoati
PHB	Poli- $\beta$ -idrossibutirrato
PHV	Poliidrossivalerato
PHBV	Poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato
YPD	Yeast extract peptone destrose

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Le differenti varietà della bacca di cacao e le produzioni annuali

Il cacao viene ottenuto esclusivamente dalle bacche di *Theobroma cacao*, una pianta appartenente alla famiglia delle *Sterculiaceae* (Soares & Oliveira, 2022).

Esistono quattro principali varietà di cacao che differiscono in base alla zona di produzione e alle caratteristiche organolettiche:

- Nacional. Viene coltivata in Ecuador e si caratterizza per il suo gusto più raffinato, essendo meno amaro e più aromatico e per questo possiede un maggior valore economico.
- Criollo. È raramente coltivata perché ha una maggiore suscettibilità ad alcune malattie delle piante (Afoakwa et al., 2008). L'interno delle fave si presenta bianco, e non viola come nelle altre varietà. È limitatamente diffuso in Venezuela, Colombia e Perù.
- Forastero. La produzione annua copre l'80% del mercato grazie alla sua resistenza alle malattie ed è diffusa principalmente in Ghana e Costa d'Avorio.
- Trinitario. È un incrocio tra Forastero e Criollo. Il nome deriva dall'isola Trinidad, al largo della costa venezuelana. Copre circa l'8% del mercato e viene considerato un prodotto di qualità.

Il frutto del cacao è un baccello il cui colore varia dal verde al viola per i frutti acerbi, e dal giallo al rosso per i frutti maturi. I frutti (fave o baccelli) possono pesare da 200 g a più di 1 kg. La loro forma dipende dalla varietà e le dimensioni vanno da 10 a 35 cm. Come si può vedere dalla Figura 1.1, i baccelli sono costituiti da una parte esterna: la buccia, e una mucillagine interna: la polpa, che circonda il seme (30–45 semi per baccello) (Soares & Oliveira, 2022). Le bucce di cacao rappresentano circa il 75-80% del frutto intero e sono composte da quattro strati: epicarpo (o buccia),

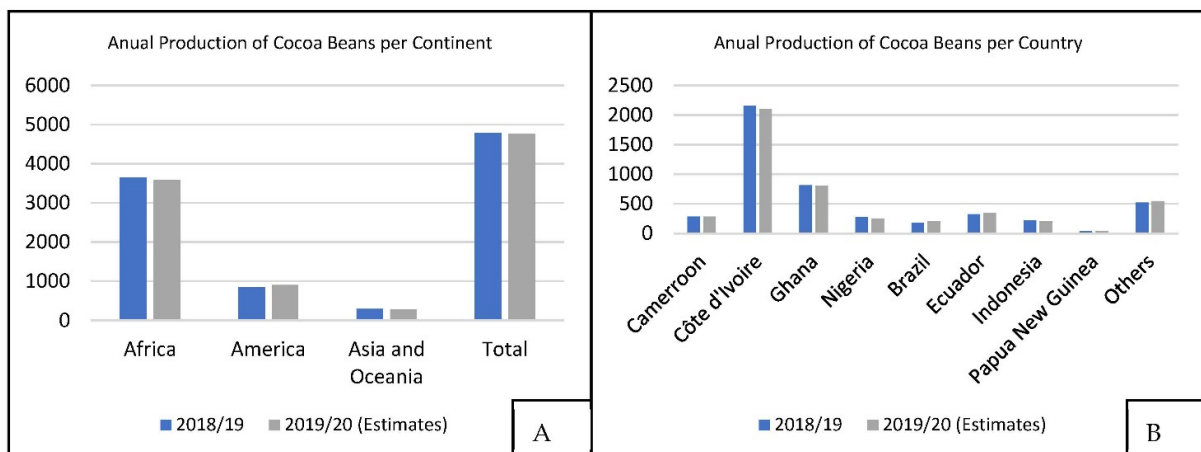


mesocarpo, parte sclerotica ed endocarpo. Le fave di cacao rappresentano il 15-20% del frutto intero, e sono composte da un guscio esterno, due cotiledoni ed il germe.



**Figura 1.1** Composizione della fava di cacao (Soares & Oliveira, 2022).

La produzione annuale dell'industria del cacao (nel 2019/20 di circa 4,7 milioni di tonnellate di semi) è riportata in Figura 1.2. Secondo i dati dell'Organizzazione Internazionale del Cacao (ICCO), la Costa d'Avorio è stato il maggiore produttore durante il biennio 2018/2019 con 2154 mila tonnellate, seguita dal Ghana (812 mila tonnellate) e Ecuador (322 mila tonnellate).



**Figura 1.2** Produzione mondiale di cacao (in milioni di tonnellate) per i raccolti 2018/2019 e 2019/2020. (A) Produzione annua di fave di cacao suddivisa per continente. (B) Produzione annua di fave di cacao suddivisa per paese (Soares & Oliveira, 2022).

## 1.2 Le fasi di produzione del cacao: dalla raccolta alla lavorazione

Generalmente la raccolta ha luogo in due periodi durante l'arco di un anno: ottobre-marzo (raccolto principale) e maggio-agosto (raccolto intermedio). La raccolta viene effettuata ogni 3-4 settimane quando i frutti sono maturi e di colore giallo (Baah et al., 2010). Le fasi della pre-lavorazione e lavorazione per la trasformazione del frutto del cacao in polvere di cacao sono riassunte in Figura 1.3.

Dopo la raccolta, i frutti vengono lavati, aperti manualmente e la polpa separata dai semi. Questo passaggio permette una fermentazione più adeguata, generando semi con migliori caratteristiche sensoriali. Dopo aver rimosso la polpa, i semi hanno circa il 65% di umidità. Per evitare reazioni chimiche indesiderate e lo sviluppo di microrganismi deterioranti, l'intervallo tra l'apertura del frutto e la successiva fase di fermentazione non deve superare le 24 ore.

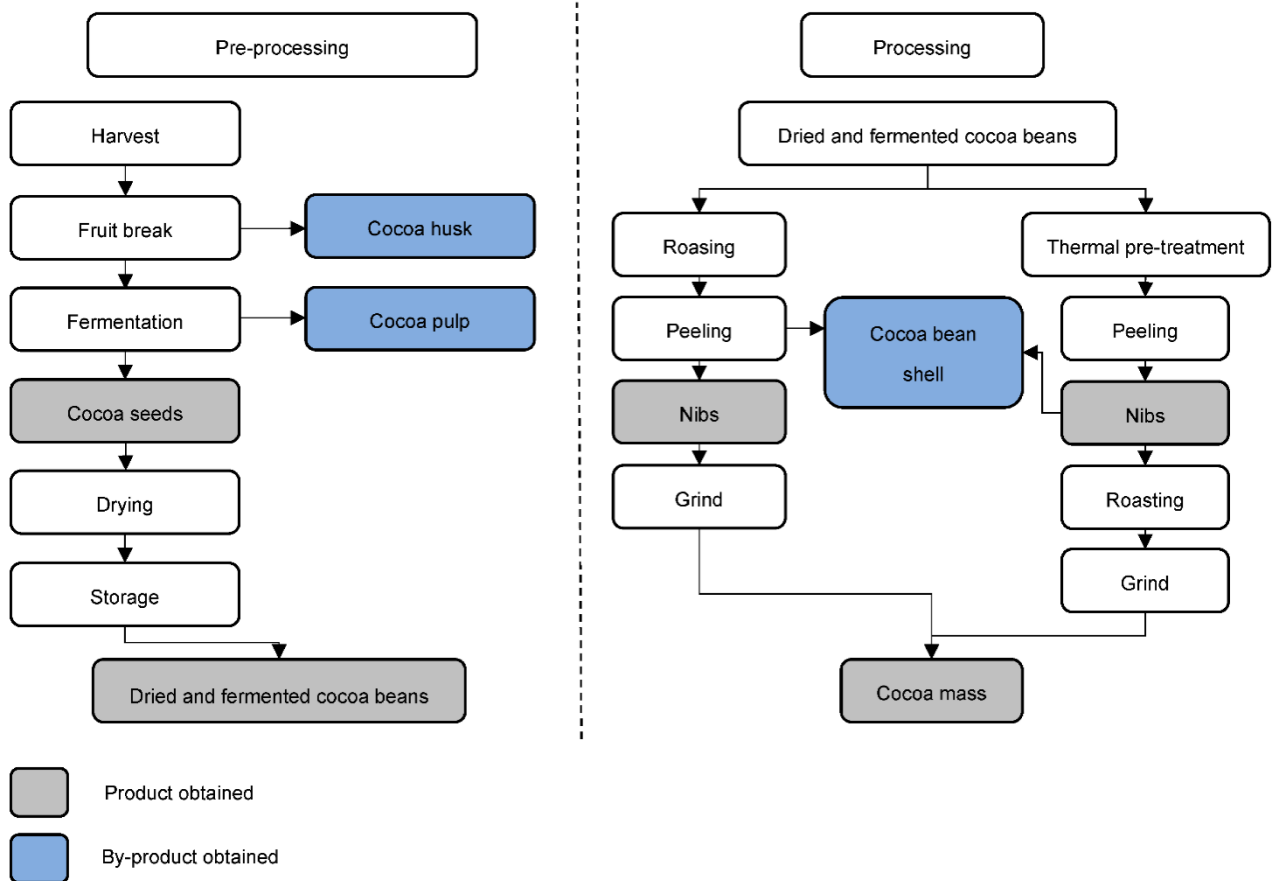
La fermentazione dura dai 2 agli 8 giorni, a seconda del tipo di cacao e delle caratteristiche ambientali. Durante questo processo, i semi vengono mescolati frequentemente per ottimizzare la penetrazione dell'aria e migliorare l'omogeneità del prodotto. Il pH basso della polpa (3.6) e il basso livello di ossigeno disponibile creano le condizioni ideali per la fermentazione alcolica dei lieviti. Man mano che l'ambiente diviene più ossigenato, i batteri acetici convertono l'alcol in acido acetico, riducendo ulteriormente il pH mentre si osserva un aumento di temperatura fino a 45–50 °C. La diffusione degli acidi nel seme e l'aumento della temperatura uccidono il germe. Infine, le fave di cacao vengono essiccate e conservate. Esistono due diverse tecniche per questo processo: la naturale e l'artificiale. La tecnica naturale richiede solamente lo spazio per eseguirla, mentre quella artificiale utilizza degli essiccatoi in specifici magazzini.

Uno dei parametri più importanti da controllare è il tasso di rimozione dell'acqua. Se alto, l'interno delle fave di cacao rimarrà umido, favorendo la proliferazione di

funghi/microrganismi e riducendo la qualità del prodotto. Se lento, il prodotto perderà peso, aumentando la fragilità delle fave di cacao. La fase di appassimento ha lo scopo non solo di eliminare l'acqua in eccesso (umidità finale si aggira attorno al 7%), ma anche di ridurre l'acidità delle fave di cacao, a seguito dei cambiamenti biochimici avviati nella fermentazione, che contribuiscono a conferire al prodotto finito le caratteristiche di sapore e aroma di cioccolato. L'intero processo si svolge vicino al sito di raccolta dei frutti.

La fase di lavorazione avviene già presso l'azienda che acquista la materia prima dai coltivatori. Il primo passo di questo processo è la pulizia delle fave di cacao essiccate, con lo scopo di separare i materiali estranei (pietre, metalli e pezzi di piante) utilizzando setacci e magneti. In seguito nell'industria alimentare si procede con il pretrattamento termico e la tostatura delle fave di cacao con successiva sgucciatura. Il vantaggio del pretrattamento termico prima della tostatura è la produzione di fave di cacao di dimensioni simili. In questa fase possono essere utilizzate apparecchiature come essiccatori a letto fluido, torrefattori a infrarossi o ad aria continua. Le fave di cacao si rompono solitamente a causa dell'impatto ad alta velocità contro gli ostacoli. Dopo la rottura, il prodotto viene trasferito su vibrovagli per separare i gusci con l'ausilio di un soffio d'aria, a causa della differenza di peso.

La fase finale della lavorazione è la macinatura da cui si ottiene la polvere di cacao. Dai processi di pre-lavorazione e lavorazione si formano i seguenti sottoprodotti: polpa di cacao (cocoa pulp), bucce di baccello (cocoa pod husks) e gusci di cacao (cocoa bean shells).



**Figura 1.3** Fase di pre-lavorazione e lavorazione per la trasformazione del frutto del cacao in polvere di cacao (Soares & Oliveira, 2022).

### [1.3 Composizione chimica e utilizzo dei sottoprodotti di lavorazione del cacao nell'ambito dell'economia circolare](#)

Il mercato in continua crescita ha portato l'industria del cacao a livelli di produzione massicci, causando così l'accumulo eccessivo di rifiuti e la generazione di sottoprodotti. I gusci di fava di cacao (cocoa bean shells) e le bucce di baccello (cocoa pod husks) sono i principali sottoprodotti dell'industria del cacao. Si stima che circa 10 tonnellate di residui vengano smaltiti per ogni tonnellata di semi (Acosta et al., 2018).

La grande quantità di biomassa generata viene dispersa nel suolo o bruciata dagli agricoltori. In natura, la decomposizione delle bucce di cacao dipende da fattori

fisici, chimici e biologici. I fattori fisici sono solitamente la temperatura e l'esposizione al sole. Un importante fattore chimico è l'umidità della biomassa. I fattori biologici sono microrganismi presenti, batteri e funghi. I funghi hanno grande capacità di decomporre le complesse strutture della buccia di cacao utilizzandole come fonte di nutrienti. In determinate condizioni climatiche, questa biomassa può causare la eccessiva proliferazione di funghi indesiderati, inclusi potenziali patogeni (Soares & Oliveira, 2022).

In realtà i residui della lavorazione del cacao, anche se considerati rifiuti, sono estremamente ricchi in composti biologicamente attivi e spesso con proprietà nutraceutiche. Nel contesto dell'economia circolare stanno pertanto destando una attenzione crescente per un possibile utilizzo al fine di ottenere prodotti di valore aggiunto sia in campo alimentare che in altri contesti.

La composizione chimica del guscio e delle bucce di cacao è variabile e dipende dalla loro origine e dal trattamento a cui sono stati sottoposti.

La buccia di cacao che costituisce l'80% del frutto, è il principale residuo dell'industria del cacao, mentre il guscio di cacao rappresenta il 15-20% della fava tostata. Questi sottoprodotti hanno una composizione ricca di lignina e polisaccaridi non amilacei (cellulosa, emicellulosa e pectina), hanno un alto contenuto di fibre e un contenuto di proteine accettabile (Tabella 1.1).

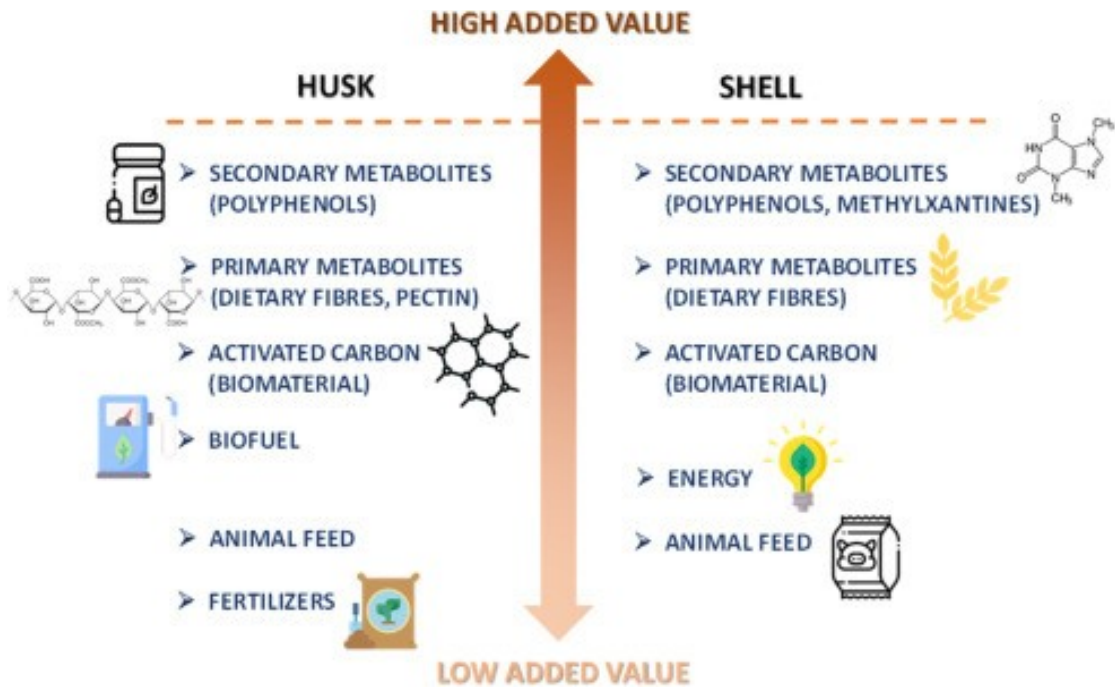
**Tabella 1.1** Composizione chimica dei sottoprodotti del cacao (g/100 g di peso secco) (Soares & Oliveira, 2022).

Compounds	Cocoa Husk	Cocoa Pulp	Cocoa Bean Shell
Carbohydrates	29.04–32.30	10.70–68.35	17.80–23.17
Cellulose	24.24–35.00	20.80–57.50	15.10
Hemicellulose	8.72–11.00	7.00–17.00	-
Lignin	14.60–26.38	12.00–14.60	32.41
Pectin	6.10–9.20	0.57–1.50	0.57–1.50
Total dietary fibre	36.60–56.10	16.89	18.60–60.60
Total proteins	4.21–10.74	0.41–5.56	15.79–18.10
Lipids	1.50–2.24	1.91–3.54	2.02–6.87
Ash	6.70–10.02	3.70–7.68	5.96–11.42

L'uso dei gusci di fave di cacao (cocoa bean shells) e delle bucce di baccello (cocoa pod husks) come additivi alimentari o integratori ha destato un notevole interesse perché si tratta di prodotti ad alto valore aggiunto ed il loro recupero può essere economicamente interessante. Il settore alimentare, in particolare, è infatti in continua crescita e ricerca nuovi ingredienti da fonti naturali.

Grazie alle loro caratteristiche chimiche, diversi studi hanno proposto strategie di valorizzazione: dal semplice utilizzo a basso valore delle bucce di baccello come fertilizzanti del suolo, allo sfruttamento di alto valore dei gusci di cacao come fonti di pectina e polifenoli (Figura 1.4).

Attualmente, le applicazioni alternative delle bucce e dei gusci di fava di cacao includono il loro utilizzo come mangimi per animali, materiale di partenza per la produzione di sapone e carbone attivo (Acosta et al, 2018). Altri possibili potenziali utilizzi per le bucce di baccello e le sue frazioni, includono la produzione di biocarburanti e biomateriali di interesse medico, farmaceutico, agricolo o alimentare (Lu et al, 2018).



**Figura 1.4** Cocoa pod husks (bucce di baccello, CPH) e cocoa bean shells (gusci di fava di cacao, CBS): possibili strategie di valorizzazione (Mariatti et al., 2021).

L'opportunità di valorizzare questi sottoprodotti verso altre applicazioni è enorme, data la loro elevata abbondanza e il fatto che il cacao è coltivato principalmente nei paesi in via di sviluppo (Lu et al., 2018).

#### 1.4 Il bioetanolo come energia rinnovabile

Negli ultimi dieci anni, le preoccupazioni relative al riscaldamento globale, all'esaurimento dei combustibili fossili e alla sicurezza energetica hanno portato a un ampio interesse per i combustibili ottenibili da fonti rinnovabili e più rispettosi dell'ambiente (Lennartsson et al., 2014).

Il bioetanolo è un carburante alternativo sempre più importante da usare in sostituzione della benzina; nel 2016 la produzione mondiale di bioetanolo è stata di

25 miliardi di galloni (1 gallone=3,78 litri) (Bertrand et al., 2016). In Figura 1.5 ne sono riportate le crescenti produzioni dal 2007 al 2015 in diversi paesi.

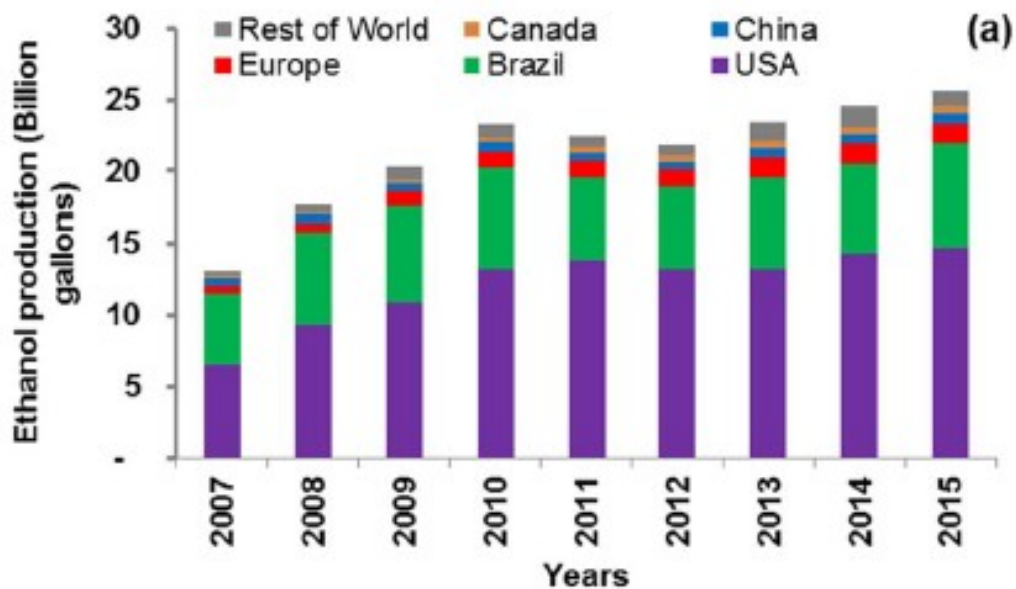
Il bioetanolo è l'etanolo ottenuto da fonti rinnovabili quali le biomasse, specificatamente prodotte o di scarto e può essere utilizzato come combustibile, materia prima chimica o solvente in vari settori. Come sostituto del petrolio ha alcuni vantaggi:

- è biodegradabile e quindi riduce l'inquinamento da idrocarburi fossili
- è meno tossico dei combustibili fossili
- può essere facilmente integrato nel sistema di alimentazione del carburante esistente, infatti fino al 5% di bioetanolo può essere miscelato con carburante convenzionale senza la necessità di apporre modifiche
- rispetto alla benzina, l'etanolo contiene una quantità trascurabile di zolfo e la miscelazione di questi due combustibili aiuta a ridurre il contenuto di zolfo nel carburante e l'emissione di ossido di zolfo, cancerogeno e può contribuire alle piogge acide (Zabed et al., 2017)

Ad oggi, il bioetanolo può essere ottenuto a partire da varie biomasse che contengono zuccheri semplici, amido e/o lignocellulosa. La conversione della biomassa in etanolo può variare considerevolmente a seconda della natura della materia prima, principalmente a causa della sua diversa composizione chimica, per questo solo poche materie prime sono state sfruttate commercialmente. Negli ultimi anni, il processo di conversione della biomassa è stato notevolmente migliorato, anche se molti dei risultati ottenuti non hanno ancora trovato una implementazione commerciale piena. Nei processi di conversione le prime fasi sono quelle dell'idrolisi delle componenti polimeriche vegetali in zuccheri semplici che nella successiva fase comune vengono fermentati dai lieviti. *Saccharomyces*



*cerevisiae* è il lievito più ampiamente utilizzato nella tecnologia di produzione dell'etanolo.



**Figura 1. 5 (a)** Produzione globale di etanolo dal 2007 al 2015 (Zabed et al., 2017).

### 1.5 L'etanolo di prima generazione

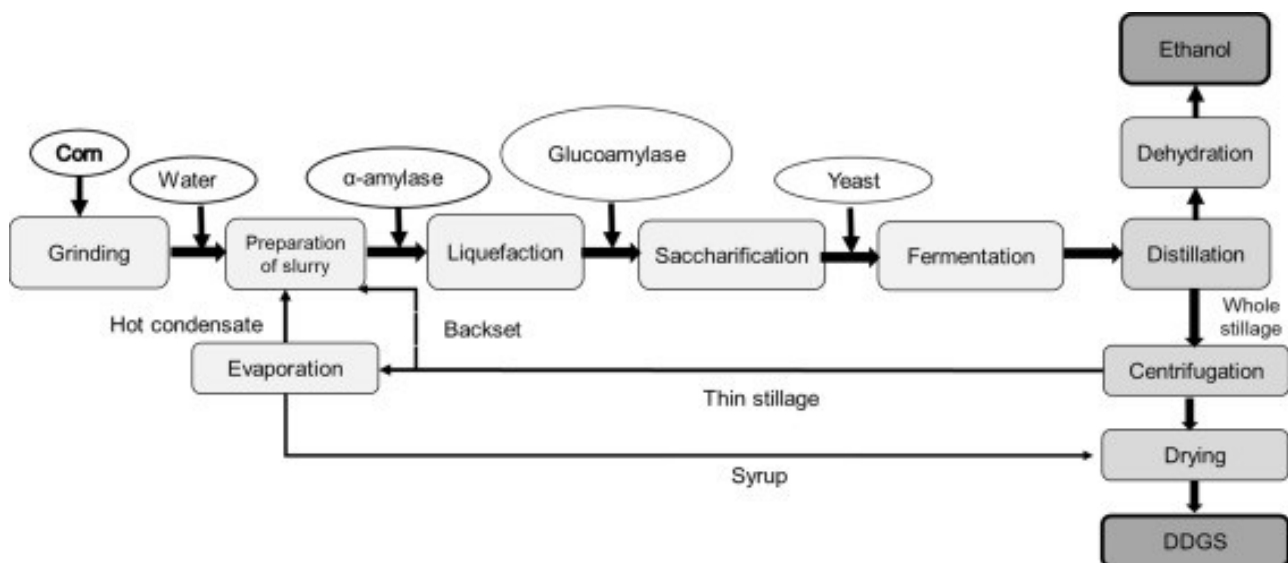
L'etanolo di prima generazione è generalmente prodotto dalla fermentazione di zuccheri (principalmente glucosio), ad opera di ceppi selezionati di *S. cerevisiae*. Le materie prime utilizzate sono il succo di canna da zucchero o il mais dopo l'idrolisi dell'amido in glucosio. Altre materie prime più marginali che sono state prese in considerazione sono: siero di latte (in cui viene fermentato il lattosio contenuto), orzo, scarti di patate (che contengono amido) e barbabietola da zucchero (che contiene saccarosio).

La canna da zucchero è una materia prima comune per la produzione di biocarburanti, specialmente in Brasile, leader mondiale per il suo utilizzo. Il processo

che consente la produzione di etanolo dalla canna da zucchero è semplice: la canna da zucchero viene schiacciata in acqua per rimuovere il saccarosio, che viene quindi fermentato dai lieviti in etanolo senza alcun trattamento.

Il mais è l'altra principale fonte di carboidrati sebbene, a differenza della canna da zucchero, richieda l'idrolisi dell'amido per liberare gli zuccheri semplici che possono quindi essere fermentati in etanolo da *S. cerevisiae* (Figura 1.6). I cocktail enzimatici utilizzati per l'idrolisi dell'amido contengono l' $\alpha$ -amilasi e la gluco-amilasi.

In relazione alla sostenibilità del bioetanolo di prima generazione sono sorte preoccupazioni a lungo termine legate in particolare all'uso del suolo, al consumo di risorse idriche, alla potenziale contaminazione dei suoli con i residui della distillazione e alla sottrazione della granella alla produzione di alimenti e mangimi. Uno dei principali costi (e problemi) per la produzione di bioetanolo è infatti quello del substrato a causa della concorrenza con il settore alimentare e dell'elevata spesa di approvvigionamento. La stessa IEA (International Energy Agency, 2010) riferisce che nei prossimi anni sarà necessario produrre etanolo da substrati economici come ad esempio scarti dell'industria alimentare e residui agroforestali.



**Figura 1.6** Diagramma per la produzione di etanolo dall'amido (Zabed et al., 2017).

## 1.6 L'etanolo prodotto da biomasse lignocellulosiche (etanolo di seconda generazione)

La produzione di etanolo da biomasse lignocellulosiche (bioetanolo di seconda generazione) è un processo più complesso e comprende le seguenti fasi principali: a) l'idrolisi di cellulosa ed emicellulosa, b) la fermentazione degli zuccheri, c) la separazione del residuo di lignina, d) il recupero e la purificazione dell'etanolo (Alvira et al., 2010).

Il processo per la produzione di etanolo da lignocellulosa inizia dalla macinazione della biomassa per ridurre la dimensione delle particelle. La biomassa macinata viene quindi miscelata con acqua per ottenere un impasto liquido, con un peso secco iniziale compreso tra il 10% e il 15%. Lo step successivo ha come fine la degradazione della complessa rete lignocellulosica nelle sue frazioni che includono i singoli polimeri di cellulosa, emicellulosa e lignina, rendendoli più accessibili ai trattamenti idrolitici nella fase successiva.

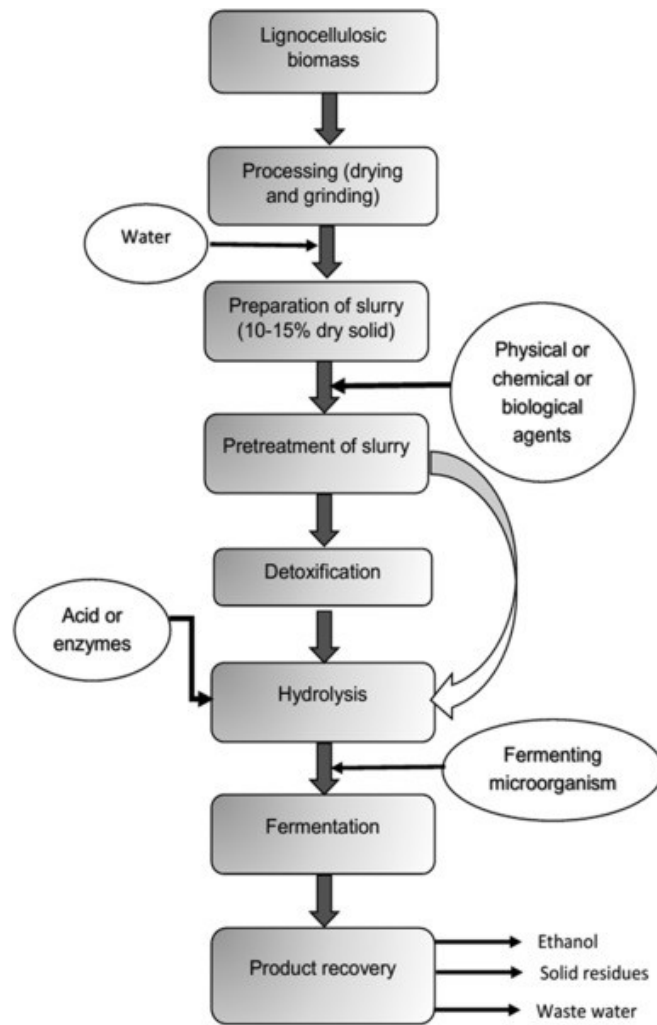
I pretrattamenti possibili possono essere fisici, chimici o biologici (Gupte et al., 2022):

- Pretrattamenti fisici. Funzionano grazie alla riduzione della dimensione delle particelle mediante sollecitazione meccanica. Sebbene non siano sufficienti per aumentare drasticamente la successiva conversione dei polisaccaridi in zuccheri, la maggior parte degli altri pretrattamenti richiedono una riduzione minima delle dimensioni delle particelle per essere efficaci. È anche importante notare che oltre una certa granulometria questo tipo di pretrattamento diventa economicamente impraticabile.
- Pretrattamenti chimici. Comprendono l'utilizzo di sostanze acide, alcaline o ossidanti. Differiscono per i meccanismi responsabili delle modifiche chimiche

e ultrastrutturali della parete cellulare che si traducono in una migliore accessibilità agli enzimi e in una maggiore resa di zucchero.

- Pretrattamenti biologici. Prevedono l'utilizzo di funghi come basidiomiceti e alcuni attinomiceti. Durante il pretrattamento, questi microorganismi secernono enzimi extracellulari che aiutano a rimuovere una notevole quantità di lignina dalla biomassa. Tuttavia, i processi biologici richiedono tempi più lunghi (da alcune ore a pochi giorni). Inoltre, la maggior parte dei microbi in genere consuma una parte dei carboidrati disponibili dalla biomassa durante la crescita, il che avrà un impatto negativo sulla resa in zuccheri alla fine del processo (Sousa et al., 2009).

Le molecole di cellulosa ed emicellulosa rilasciate, vengono quindi idrolizzate in zuccheri semplici tramite metodi chimici o enzimatici ed infine convertite in etanolo tramite la fermentazione microbica. L'etanolo prodotto nel brodo di fermentazione viene recuperato e purificato per ottenere un etanolo di grado combustibile. L'etanolo viene quindi distillato generando come sottoprodotti residui solidi contenenti anche lignina e acque reflue (Figura 1.7). La lignina ottenuta può essere bruciata e convertita in elettricità e calore (Zabed et al., 2017). L'idrolisi della lignocellulosa in monosaccaridi fermentescibili è ancora tecnicamente problematica perché la digeribilità della cellulosa è ostacolata da molti fattori fisico-chimici e strutturali. A causa di queste caratteristiche, il pretrattamento prima dell'idrolisi è una fase critica essenziale perché ha lo scopo di migliorare l'accessibilità degli enzimi alla cellulosa durante la fase di idrolisi.



**Figura 1.7** Diagramma della produzione di etanolo a partire da biomassa lignocellulosica (Zabed et al., 2017).

## 1.7 Bioplastiche e l'interesse per la sostenibilità ambientale

L'interesse per lo sviluppo di sistemi polimerici rispettosi dell'ambiente è aumentato nell'ultimo decennio a causa delle crescenti preoccupazioni ambientali per gli attuali materiali a base di petrolio (Tsang et al., 2019). Ogni anno, vengono infatti generati 34 milioni di tonnellate di rifiuti di plastica in tutto il mondo e il 93% di essi vengono smaltiti nelle discariche o finiscono negli oceani (Pathak et al., 2014). Anche se alcuni membri dell'Unione Europea (UE) hanno vietato l'utilizzo delle discariche, circa il 50% dei rifiuti di plastica vengono ancora smaltiti in questo modo. Paesi come Germania, Paesi Bassi, Svezia, Danimarca e Austria hanno raggiunto l'80-100% nel recupero dei rifiuti di plastica, ma sono in grado di riciclare in media solo il 28%.

Anche se l'UE ha cercato di migliorare lo smaltimento dei rifiuti di plastica attraverso il riutilizzo ed il riciclaggio dei prodotti, i paesi in via di sviluppo sono ancora dipendenti dalla discarica convenzionale (Emadian et al., 2017).

Le risorse lignocellulosiche presentano un grande potenziale per sostituire plastica e materiali basati su risorse fossili e lo sviluppo di materiali a base biologica e rinnovabili ad alte prestazioni contribuirebbe alla sostenibilità ambientale (Brodin et al., 2017).

Le bioplastiche vengono ottenute interamente o parzialmente da materie prime rinnovabili, che possono essere biodegradabili/compostabili o meno, ma le cui proprietà non differiscono necessariamente dalle plastiche convenzionali. Vengono tuttavia definite bioplastiche anche tutte quelle materie con proprietà di biodegradabilità/compostabilità, per le quali è irrilevante la materia prima da cui provengono.

Le bioplastiche quindi si dividono essenzialmente in tre categorie:

- bio-based non biodegradabili

- bio-based biodegradabili
- biodegradabili ottenute a partire da fonti fossili

Il termine “bio-based” descrive quindi il materiale di partenza che proviene da biomasse, come ad esempio l’amido, la canna da zucchero o la cellulosa. Le plastiche bio-based sono ottenute parzialmente o completamente da biomasse. Ci sono sia plastiche bio-based biodegradabili, come PLA, Bio-Flex e Ceroflex, sia plastiche bio-based che non sono biodegradabili. Queste ultime, conosciute anche come drop-in, presentano una struttura chimica identica a quella delle equivalenti fossili. Ne sono alcuni esempi il Bio-PE (I’m green Polytehylen), il Bio-PET (Eastlon), il Terralene, il Terraprene (Roijen & Miller, 2022).

Una bioplastica viene definita biodegradabile quando tramite un processo naturale viene convertita dalla flora microbica in anidride carbonica, acqua e biomassa, senza lasciare residui nocivi o tossici.

Per le bioplastiche compostabili, invece, il processo di degradazione deve avvenire entro un determinato periodo di tempo in condizioni ambientali che corrispondono a quelle di un impianto di compostaggio industriale. Tali bioplastiche devono soddisfare le specifiche e i criteri di valutazione degli standard internazionali (EN 13432, EN 14995 e ASTM D6400) per materie plastiche/prodotti biodegradabili.

La norma di riferimento dell’Unione Europea, “Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione” (EN 13432/2000), determina i criteri in base ai quali un materiale è definito compostabile:

1) biodegradabilità: determinata misurando l’effettiva conversione metabolica del materiale compostabile in anidride carbonica. Il livello di accettazione della degradazione è pari al 90% di conversione metabolica da raggiungere in meno di 6 mesi, in ambiente aerobico; tali valori vanno testati con il metodo standard EN 14046;

- 2) disintegrabilità: cioè la frammentazione e la perdita di visibilità nel compost finale (assenza di contaminazione visiva). Il materiale viene biodegradato insieme con rifiuti organici per 3 mesi e almeno il 90% della massa del materiale deve ridursi in frammenti con dimensioni inferiori a 2 mm (tali valori vanno testati con il metodo standard EN 14045);
- 3) assenza di effetti negativi sul processo di compostaggio: il requisito va verificato con una prova di compostaggio su scala pilota;
- 4) bassi livelli di metalli pesanti e assenza di effetti negativi sulla qualità del compost (quali la riduzione del valore agronomico e la presenza di effetti ecotossicologici sulla crescita delle piante). La concentrazione di alcuni metalli pesanti, pH, contenuto salino, solidi volatili, azoto, fosforo, magnesio e potassio deve collocarsi entro i limiti consentiti.

### 1.8 Polioidrossialcanoati (PHA)

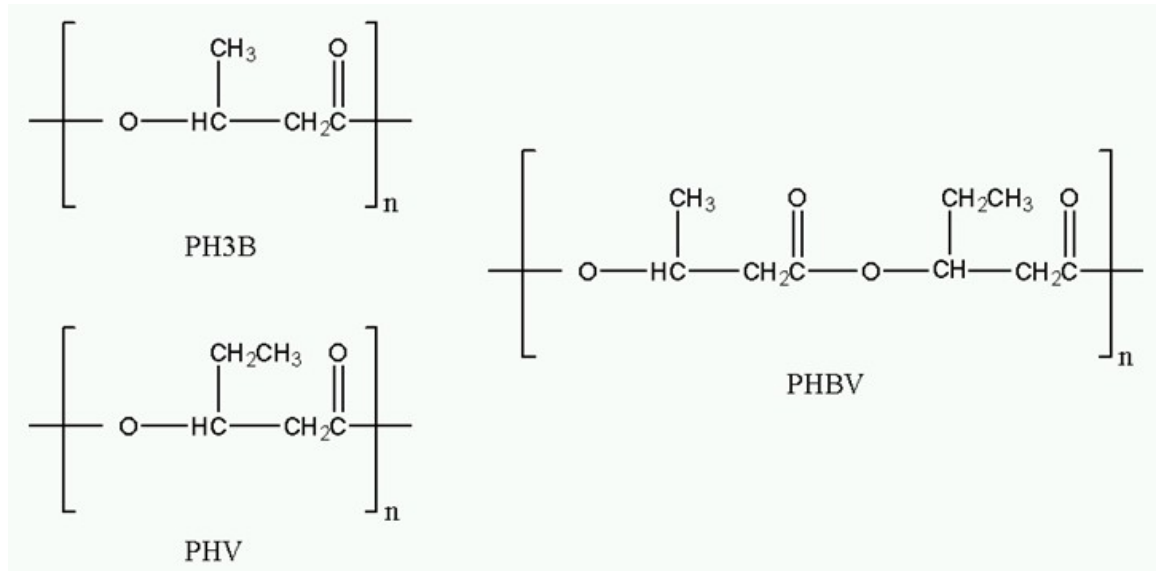
I PHA sono poliesteri prodotti in natura da numerosi microrganismi e combinano un'elevata funzionalità, dovuta alle proprietà meccaniche e fisiche, con un basso impatto ambientale (biodegradabilità e non tossicità).

Gli acidi polioidrossialcanoici rappresentano una classe complessa di poliesteri sintetizzati dagli Eubatteri, da membri della famiglia delle *Halobacteriaceae* degli *Archaea*, da Cianobatteri e da diverse alghe e piante.

Un'ampia varietà di batteri è in grado di accumulare PHA sotto forma di granuli intracellulari, come riserve di carbonio ed energia. L'accumulo di PHA è solitamente promosso quando un nutriente essenziale per la crescita è presente in quantità limitata nel terreno di coltura, mentre il carbonio è in eccesso. Tuttavia, alcuni batteri sono in grado di produrre PHA durante la crescita anche in assenza di fattori



limitanti. A seconda del microrganismo e delle condizioni di coltivazione, vengono generati omo o co-poliesteri con diversi acidi idrossialcanoici (un esempio in Figura 1.8)



**Figura 1.8** Struttura chimica di due PHA, il poli-3-idrossibutirrato (PHB) e poli-idrossivalerato (PHV) del copolimero PHBV.

I poliesteri si depositano nelle cellule sotto forma di granuli altamente rifrangenti e vengono quindi recuperati distruggendo le cellule.

Il PHA risultante è essenzialmente di due tipi sulla base del numero di atomi di carbonio che compongono i monomeri:

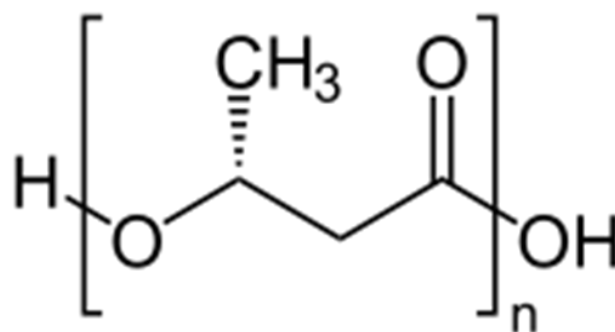
- Poly (HA SCL) costituiti da idrossi-acidi grassi a catena corta (*scl*-PHA) che includono monomeri da tre a cinque atomi di carbonio. Sono sintetizzati da numerosi batteri, tra cui *Cupriavidus necator* e *Alcaligenes latus*.
- Poly (HA MCL) costituiti da idrossi-acidi grassi a catene media (*mcl*-PHA) che includono monomeri da sei a 14 atomi di carbonio. Sono sintetizzati ad esempio da *Pseudomonas putida*.

Gli *scl*-PHA sono utilizzati principalmente per la produzione di articoli usa e getta e materiali per l'imballaggio alimentare. Gli *mcl*-PHA sono invece più elastici e sono

adatti per applicazioni ad alto valore aggiunto, come suture chirurgiche, impianti, matrici biodegradabili per la somministrazione di farmaci (Kourmentza et al., 2017). Nei PHA possono essere combinati più di 150 diversi monomeri ottenendo materiali con proprietà estremamente diverse (Emadian et al., 2017). Sono biocompatibili e possono essere materiali termoplastici o elastomerici, con punti di fusione compresi tra 40 e 180 °C.

Le proprietà meccaniche e di biocompatibilità dei PHA possono essere modificate anche miscelandoli con altri polimeri, enzimi e materiali inorganici, rendendo così possibile una più ampia gamma di applicazioni (Povolo et al., 2012). Queste caratteristiche rendono i PHA candidati promettenti per la produzione sostenibile di polimeri. Grazie alle loro proprietà, i PHA possono potenzialmente sostituire vari materiali plastici tra cui polipropilene, polietilene e polistirene, che sono i tre principali polimeri presenti nel mercato globale (Dietrich et al., 2017).

La forma più semplice e più comune di PHA prodotto anche industrialmente è il poli-beta-idrossibutirrato (poli-3-idrossibutirrato, P3HB) (Figura 1.9), il più noto membro dei *sc/-PHA*, che consiste da 1000 a 30000 monomeri di acidi grassi idrossilici.



**Figura 1.9** Struttura del poli-3-idrossibutirrato, P3HB.

Il PHB si caratterizza come un materiale rigido e fragile ed è difficile da lavorare a causa della sua natura cristallina.

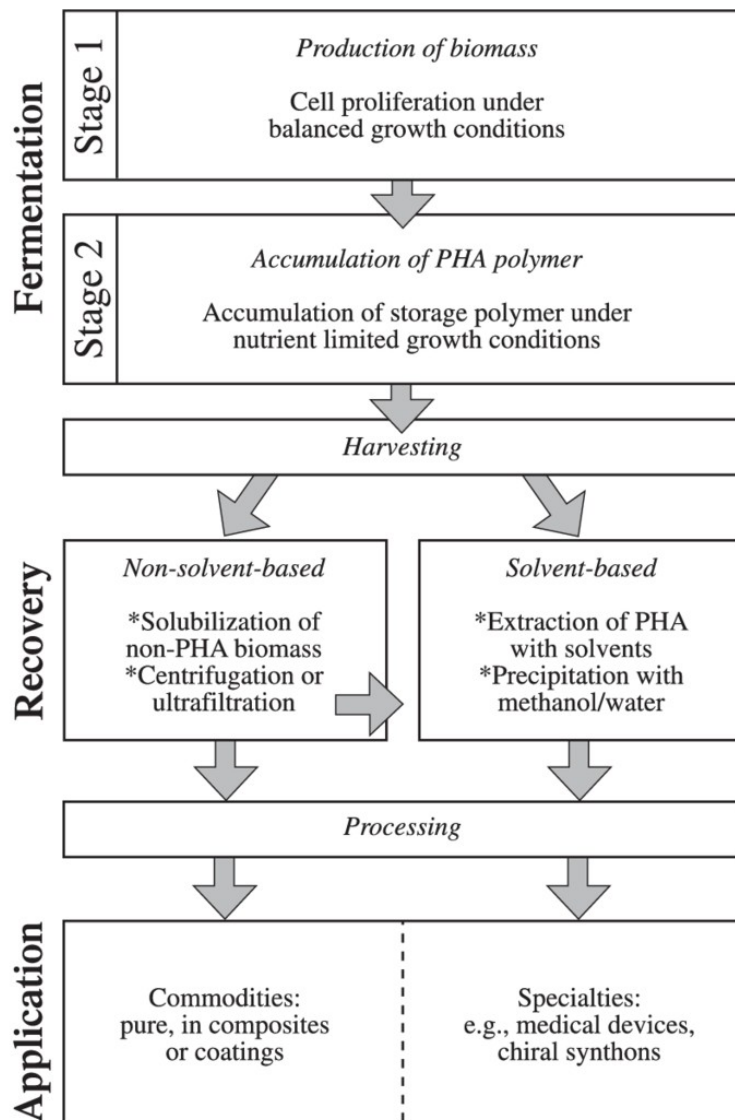
*Cupriavidus. necator* è il microrganismo forse più conosciuto e studiato per la produzione di poliidrossialcanoati: è un  $\beta$ -proteobatterio Gram-negativo, abitante del suolo, non patogeno chemiolitoautotrofo. In assenza di substrati organici,  $H_2$  e  $CO_2$  possono essere infatti utilizzati come sole fonti di energia e carbonio. *C. necator* DSM545 è noto principalmente per la capacità di accumulare il poli-3-idrossibutirrato (PHB), fino all'80% e più della sua massa secca.

Tutti i processi di produzione del PHA consistono in una fase di fermentazione e recupero, seguita dalla lavorazione del polimero per applicazioni specifiche. In molti casi la fermentazione è suddivisa in due fasi, una di produzione di biomassa e una di accumulo di PHA (Figura 2).

L'ampia commercializzazione e industrializzazione dei PHA è ancora difficile a causa del loro elevato costo di produzione, che si traduce in prezzi più elevati rispetto ai polimeri convenzionali. Le ragioni principali del loro costo elevato sono l'alto prezzo dei substrati di elevata purezza, come il glucosio, l'intero processo produttivo, le modalità di coltivazione fed-batch e la grande quantità di solventi e/o manodopera per la lavorazione downstream. D'altro canto, la crescente disponibilità di materie prime rinnovabili e la domanda in aumento per l'uso di polimeri biodegradabili per applicazioni biomediche, di imballaggio e alimentari ha favorito la crescita del mercato di PHA riducendone i prezzi.

La fonte carboniosa normalmente impiegata nel processo di produzione di PHA è il glucosio che rappresenta un costo considerevole per le imprese; di conseguenza i prodotti "PHA-based" risultano competitivi rispetto a quelli derivati da fonti non rinnovabili, solo per una piccola frazione dell'intera economia di mercato, generalmente associata a costosi prodotti biomedicali dove biocompatibilità e

biodegradazione sono caratteristiche fondamentali (Anjum et al., 2016). Pertanto la ricerca di fonti di substrato alternative e a basso costo è uno degli aspetti più rilevanti per l'ottimizzazione del processo (Favaro et al, 2019). Purtroppo in natura non sono noti microrganismi forti accumulatori e capaci di utilizzare fonti carboniose a basso costo contenenti polimeri lignocellulosici ed è quindi spesso necessario l'utilizzo di pretrattamenti mirati all'idrolisi di questi.



**Figura 2** Panoramica generale di un processo di produzione di PHA (Kessler et al., 2001).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro, svolto presso il laboratorio di Microbiologia di DAFNAE (Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment), è mirato alla valutazione di un sottoprodotto della lavorazione del cacao (cocoa pod husk, CPH) provenienti da una zona di produzione del cacao (Colombia), al fine di verificarne le potenzialità per una futura produzione di bioetanolo e poliidrossialcanoati.

La materia prima è stata trattata per via chimica ed enzimatica ottenendo dei substrati carboniosi adatti alla crescita di due ceppi microbici: *S. cerevisiae* Fm17 per la produzione di bioetanolo e *C. necator* DSM545 per la produzione di PHA.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Analisi chimiche delle materie prime

I sottoprodotti di lavorazione del cacao (cocoa pod husks e cocoa bean shells) provenivano dalla Colombia (Area de Agroindustria, Servicio Nacional de Aprendizaje-SENA, Espinal) già liofilizzati e sono stati conservati presso il laboratorio di Microbiologia (DAFNAE) in frigorifero a +4°C, in due contenitori sigillati ed etichettati. Le composizioni chimiche in termini di ceneri, cellulosa, emicellulosa, proteine e lipidi, sono state determinate presso il laboratorio chimico La-Chi del dipartimento DAFNAE, secondo i metodi standard internazionali (Association of Official Analytical Chemists, 2010).

#### 3.2 Determinazione delle condizioni ottimali per il pretrattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Per poter eseguire il pretrattamento delle bucce dei baccelli con perossido di idrogeno, sono state eseguite alcune prove preliminari mirate ad identificare la corretta quantità di bucce da risospendere in acqua. Con questo scopo, sono state usate beute da 100 mL contenenti sospensioni del 5, 10, 15 e 20% p/v in acqua di CPH (cocoa pod husks).

Le sospensioni sono state poste in un bagnetto Julabo a 55°C per 4 ore a 150 rpm, al termine delle quali è stata valutata la densità del sistema e la possibilità di agitazione.

### 3.2.1 Pretrattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tale pretrattamento ha lo scopo di rompere la struttura della lignina, allontanare l'emicellulosa e separare la struttura della cellulosa al fine di aumentare l'esposizione agli enzimi nella fase di idrolisi.

Sono state utilizzate beute da 100 mL, riempite ciascuna con il 10% p/v di CPH (tale dose era risultata la migliore nelle prove preliminari).

L'esperimento è stato eseguito in duplicato utilizzando concentrazioni di perossido di idrogeno del: 0; 2,5; 5 e 7,5% (v/v). È quindi stata aggiunta acqua in modo che il volume totale fosse di 25 mL (Tabella 3.1). Il pH di ciascuna soluzione è stato misurato utilizzando il pH-metro Hanna Instruments HI5000.

**Tabella 3.1** Concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0; 2,5; 5 e 7,5% e rispettivi mL riportati.

Concentrazione finale di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> % (v/v)	mL di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aggiunti	mL di H <sub>2</sub> O aggiunti
0	0	25
2,5	5,8	19,2
5	11,6	13,4
7,5	17,4	7,6

In seguito, le beute sono state incubate in un bagnetto agitato (Julabo SW22) a 55°C. Dopo 4 ore il pH è stato misurato nuovamente e portato a 5 con HCl (2M) prima dell'aggiunta dell'enzima per la fase successiva di saccarificazione.

### 3.2.2 Saccharificazione enzimatica dei substrati pretrattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Per la fase di saccharificazione è stato utilizzato l'enzima Cellic® CTec2 (Novozymes). Si tratta di un cocktail enzimatico contenente prevalentemente cellulasi,  $\beta$ -glucosidasi e hemicellulasi, efficace su un'ampia varietà di materiali lignocellulosici pretrattati per la conversione dei carboidrati in zuccheri semplici, prima della fase successiva di fermentazione. L'esperimento è stato condotto utilizzando una concentrazione di enzima al 12%.

Le diluizioni sono state incubate nuovamente nel bagnetto Julabo SW22 a 50°C. A tempi definiti, sono stati eseguiti dei prelievi per monitorare l'andamento della saccharificazione. Ad ogni prelievo, sono stati prelevati 4 mL di soluzione da ciascuna beuta e posti in tubi Falcon da 15 mL, poi centrifugati a 5500 rpm per 10 minuti.

I surnatanti sono stati travasati in provette di vetro Pyrex e bolliti a 100°C per 10 minuti per inattivare le cellulasi. 2 mL da ciascuna provetta sono stati prelevati e trasferiti in Eppendorf da 2 mL e poi congelati a -21°C per le successive analisi.

### 3.3 Pretrattamento con NaOH

In alternativa al perossido di idrogeno, è stato saggiato un altro pretrattamento con lo stesso scopo di rendere la cellulosa più esposta agli enzimi nella fase di idrolisi. L'esperimento è stato condotto in duplicato. Sono state utilizzate beute da 100 mL, contenenti ciascuna il 10% p/v di CPH. Sono stati aggiunti 25 mL di NaOH al 4% in due beute, mentre le rimanenti sono state riempite con 25 mL di acqua demineralizzata (bianco di riferimento).

Il tutto è stato fatto bollire a 100°C per 30 minuti.



La soluzione è stata trasferita in Falcon da 15 mL e centrifugata per 15 minuti a 5500 rpm. Il surnatante è stato scartato, lasciando il pellet.

Il pH è stato misurato (con il pH-metro Hanna Instruments HI5000) e portato ad un valore di 6.5-7 con HCl 2M.

Il pellet rimasto è stato fatto essiccare in stufa alla temperatura di 98°C per 16 ore.

### 3.3.1 Saccharificazione enzimatica dei substrati pretrattati con NaOH

Dopo il pretrattamento con NaOH, il substrato è stato risospeso in 25 mL in una soluzione tampone di citrato di sodio 50 mM.

Come in precedenza, è stato aggiunto l'enzima Cellic® CTec2 ad una concentrazione del 12%. I campioni sono stati posti nuovamente nel bagnetto Julabo SW22 a 50°C con prelievo a tempo 0, 24, 48 e 72 ore.

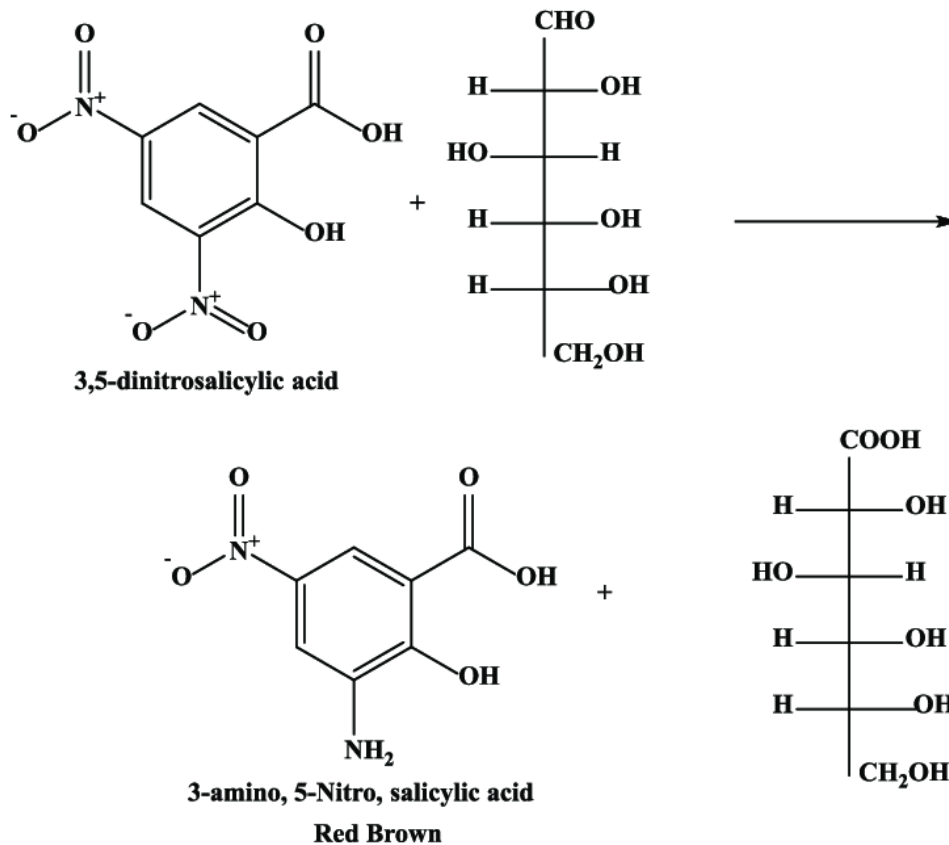
Ad ogni prelievo, sono stati prelevati 4 mL e inseriti in Falcon da 15 mL. I tubi Falcon sono stati poi centrifugati a 5500 rpm per 10 minuti.

Il surnatante di ciascuna soluzione è stato travasato in provette di vetro Pyrex e bollito a 100°C per 10 minuti per inattivare le cellulasi. 2 mL da ciascuna provetta sono stati prelevati e trasferiti in Eppendorf da 2 mL e poi congelati a -21°C per le analisi seguenti.

### 3.4 Analisi degli zuccheri riducenti con saggio DNS

Per verificare la quantità di zuccheri riducenti presenti nei campioni con il pretrattamento con perossido di idrogeno a diverse concentrazioni, è stato utilizzato il saggio enzimatico con DNS (3,5 acido dinitrosalicilico) e successiva lettura allo spettrofotometro UV/visibile Ultrospech 2000, Pharmacia Biotech. Il saggio del DNS

sfrutta l'ossidazione del gruppo aldeidico o chetonico degli zuccheri e la contemporanea riduzione del DNS, in condizioni alcaline, ad acido 3-amino-5-nitrosalicilico, un composto che assorbe a 540 nm (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Riduzione del DNS e contemporanea ossidazione del glucosio ottenendo acido 3-amino-5-nitrosalicilico e acido glucuronico.

Per il saggio è stata preparata una soluzione di DNS composta da:

- 3,5 Acido dinitrosalicilico, 10 g/L
- Tartrato di sodio e potassio, 200 g/L
- NaOH, 10 g/L
- Fenolo, 2 g/L
- Solfato di sodio, 0,5 g/L

Per l'ottenimento della curva standard, sono state preparate le diluizioni stock di glucosio. Sono state utilizzate provette di vetro per ciascuna diluizione (1:10, 1:20; 1:40, 1:60, 1:80, 1:100) da una soluzione di partenza di 10 g/L. Sono stati aggiunti 450  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{L}$  di soluzione di glucosio e 750  $\mu\text{L}$  di soluzione DNS; il tutto è stato incubato a 99°C per 15 minuti. Infine è stata misurata l'assorbanza a 540 nm per ciascuna diluizione di glucosio. Al termine dell'esperimento, è stata riportata la retta di taratura che è stata utilizzata per risalire alla concentrazione degli zuccheri riducenti presenti nei campioni con CPH.

Per i campioni, sono state utilizzate due provette di vetro per ogni campione: una per l'analisi e l'altra per il bianco.

Sono stati aggiunti 450  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{L}$  di campione e 750  $\mu\text{L}$  di soluzione DNS a tutte le provette. Il tutto è stato incubato a 99°C per 5 min. Infine è stata misurata l'assorbanza a 540 nm.

Per il calcolo, sono state sottratte le due assorbanze ottenute dai campioni ed è stata calcolata  $y = \text{assorbanza } (A_{540\text{nm}})$ , poi è stata riportata su un grafico la retta di regressione lineare e le deviazioni standard. Il test è stato condotto in triplicato.

### [3.5 Monitoraggio del D-glucosio tramite kit enzimatico Megazyme e misura del grado di saccharificazione](#)

Il kit enzimatico Megazyme D-glucosio è l'alternativa al DNS per il monitoraggio della quantità di glucosio presente all'interno dei campioni. Il kit di analisi utilizza glucosio ossidasi e perossidasi di elevata purezza e può essere utilizzato per la misurazione specifica del D-glucosio in estratti di materiali vegetali o alimenti. Il kit contiene:

- Flacone 1: tampone reagente. Tampone acido p-idrossibenzoico e sodio azide (0,095% p/v).

- Flacone 2: Glucosio ossidasi, perossidasi e 4-aminoantipirina.
- Flacone 3: soluzione standard D-glucosio (5mL, 1.0 mg/mL) in 0,2% (p/v) di acido benzoico.

Le quantità e le diverse soluzioni utilizzate nei test sono riportate in Tabella 3.2

**Tabella 3.2** Monitoraggio del D-glucosio tramite kit enzimatico Megazyme: soluzioni e quantità utilizzate nei test.

	Acqua	Campione	Soluzione tamponata	Enzima
<b>Standard (50µL)</b>	1000 µL	/	50 µL	10 µL
<b>Bianco</b>	1050 µL	/	50 µL	10 µL
<b>Campione 0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1000 µL	50 µL	50 µL	10 µL
<b>Campione 2,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1000 µL	50 µL	50 µL	10 µL
<b>Campione 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1000 µL	50 µL	50 µL	10 µL
<b>Campione 7,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1000 µL	50 µL	50 µL	10 µL

Ciascun campione è stato incubato per 5 minuti ed è stata misurata l'assorbanza a 340 nm allo spettrofotometro.

Il test è stato condotto in triplicato.

Per calcolare la concentrazione di D-glucosio, inizialmente è stata sottratta l'assorbanza del campione con quella del bianco di riferimento. In questo modo è stato ottenuto  $\Delta$ D-glucosio. In seguito, è stata utilizzata la formula:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta D_{glucosio}$$

Dove:

- c: concentrazione di D-glucosio [g/L]
- V: volume finale [mL]
- MW: peso molecolare del glucosio [g/mol]
- $\epsilon$ : coefficiente di estinzione del NADPH a 340 nm = 6300 [L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]
- d: cammino ottico [cm]
- v: volume del campione [mL]

Segue che,

$$c = \frac{2,32 \times 180,16}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta D_{glucosio}$$

Il kit enzimatico è stato utilizzato anche per i campioni con pretrattamento con idrossido di sodio, usando le stesse condizioni.

La concentrazione di glucosio rilasciata dalle cellulasi è stata usata per calcolare il grado di saccharificazione (GS) secondo la seguente equazione:

$$GS = \frac{[\text{glucosio g/L}] \times 0,9}{[\text{cellulosa g/L}]} \times 100$$

Il fattore di conversione 0,9 viene applicato a causa della differenza di massa tra l'anello di glucosio anidro e il glucosio, dal momento che una molecola di acqua viene aggiunta durante l'idrolisi della cellulosa (Cripwell et al., 2015).

### 3.6 Produzione di bioetanolo a partire da cocoa pod husks pretrattati

Per la preparazione del pre-inoculo, il ceppo di lievito *S. cerevisiae* FM17 è stato inoculato in 15 mL di YPD ed è stato incubato overnight a 30°C su un agitatore basculante a 150 rpm. La pre-coltura è stata centrifugata a 5500 rpm per 2 min ed il pellet ottenuto è stato lavato per due volte in H<sub>2</sub>O demineralizzata sterile e risospeso in 5 mL (inoculo).

50 mL di substrato idrolizzato tal quale, precedentemente sterilizzato in autoclave, è stato posto in bottigliette di fermentazione dalla capacità di 60 mL. L'inoculo è stato aggiunto in modo da avere concentrazione iniziale di lievito pari a  $5 \times 10^8$  CFU/mL. Ampicillina e streptomina (ognuna 100 µg/mL) sono state aggiunte al fine di prevenire possibili contaminazioni batteriche. Le bottigliette, dotate di un'uscita per la CO<sub>2</sub>, sono state incubate a 30 °C per 72 ore in un sistema multistirrer e in condizioni di ossigeno limitato.

Parallelamente, nelle stesse condizioni sperimentali, è stata eseguita una fermentazione di controllo utilizzando come substrato una concentrazione di glucosio 15 g/L in YPD. L'esperimento è stato svolto in duplicato e l'OD è stata monitorata a 600 nm per un totale di 72 ore.

#### 3.6.1 Produzione di PHB a partire da cocoa pod husks pretrattati

Per la preparazione del pre-inoculo, *C. necator* DSM545 è stato seminato in una beuta da 250 mL contenente glucosio 30 g/L. La beuta è stata poi incubata in agitazione a 120 rpm per 24 ore a 30°C. (è stato utilizzato l'agitatore Heidolph Unimax 2010, Germania). La sospensione batterica è stata poi utilizzata per gli esperimenti di produzione del PHB. *C. necator* è stato inoculato in beute da 125 mL

contenenti 30 mL di idrolizzato di cacao tal quale (sterilizzato tramite l'utilizzo di filtri Whatman 0,22  $\mu\text{m}$ ) e 30 mL di idrolizzato in cui sono stati disciolti i seguenti sali: 0,469 g di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,105 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,07 g di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,014 g di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$  e 4,2  $\mu\text{g}$  di  $(\text{NH}_4) \text{Fe} (\text{SO}_4)_2$  (MM medium). Le beute sono state incubate a 30 °C, in agitazione a 150 rpm, per 72 ore al termine delle quali, sono state determinate la biomassa ottenuta e la quantità di PHB prodotta.

Come controllo, sono state utilizzate due soluzioni di 30 mL glucosio 15 g/L e 20 g/L in cui sono stati disciolti i sali precedenti (MM medium + glucosio). L'esperimento è stato svolto in duplicato e l'OD è stata monitorata a 600 nm per un totale di 72 ore.

### 3.6.2 Estrazione del PHB

Dopo 72 ore di crescita, le sospensioni batteriche sono state centrifugate a 4°C a 5500 rpm per 15 minuti. Il pellet è stato recuperato e congelato a -80°C per una notte e successivamente liofilizzato (con liofilizzatore EDWARDS Lifesciences Italia S.P.A.). Il pellet liofilizzato è stato pesato per determinare la quantità di biomassa ottenuta e omogenizzato mediante un pestello in ceramica. Campioni di 10 mg sono stati prelevati ed analizzati per determinare il PHB secondo il protocollo descritto da Braunegg et al. Le cellule liofilizzate sono state utilizzate per la quantificazione del PHB mediante gascromatografia. Le prove sono state effettuate in duplicato. Il gas cromatografo (Thermo Finnigan Trace GC, Mundelein, Illinois USA) ha una colonna capillare in silice fusa AT-WAX (Alltech Italia s.r.l., Milano, Italia) ed un rilevatore a ionizzazione di fiamma. Il gas di trasporto è stato l'elio (He) e le temperature operative durante l'analisi sono state: 250°C per la camera di iniezione, 270 °C per il rilevatore e 150 °C per il forno. Lo standard interno è stato l'acido benzoico (2,5 g/L), mentre lo standard esterno l'acido 3-idrossibutirrico. I risultati ottenuti sono stati espressi come percentuale di PHB sulla biomassa secca.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Composizione di cocoa pod husks e cocoa bean shells

Per poter valutare l'effettiva potenzialità di conversione in etanolo e polioidrossialcanoati degli scarti di lavorazione del cacao, è stata determinata inizialmente la composizione chimica di cocoa pod husks e cocoa bean shells.

Le analisi sono state condotte presso il laboratorio chimico La-Chi di DAFNAE e i risultati ottenuti sono riportati nelle Tabelle 4.1; 4.2 e 4.3.

I cocoa pod husks presentano una percentuale di cellulosa del 22%, nettamente maggiore rispetto ai cocoa bean shells nei quali è solo del 12%.

Sulla base di queste analisi, la quantità di zuccheri rilasciabili a partire dall'idrolisi della cellulosa nei cocoa bean shells e utilizzabile dai microrganismi risulterebbe quindi troppo poca. Per questo motivo, è stato deciso di usare solo esclusivamente i cocoa pod husks per condurre le successive sperimentazioni.

**Tabella 4.1** Composizione chimica di Cocoa pod husks e Cocoa shells utilizzati nelle prove.

Campione	Sostanza secca (%)	Ceneri*	Proteine*	Lipidi*	Cellulosa*	Emicellulosa*
Cocoa Husk	91,84	10,41	4,79	0,53	22,32	10,10
Shell	94,88	7,28	17,98	16,24	12,30	10,07

\*: I dati sono espressi in g/100 g di peso secco

Le analisi chimiche svolte dal laboratorio rispecchiano le percentuali riscontrate in bibliografia. Infatti nella Tabella 1.1 del capitolo introduttivo, sono state riportate le quantità di emicellulosa, ceneri, proteine e lipidi e risultano essere simili a quelle



riportate in Tabella 4.1. Come è emerso dalle analisi, questi sottoprodotti presentano una composizione ricca di polisaccaridi non amilacei e proteine.

Il contenuto proteico più elevato è stato rilevato nel guscio di fava di cacao (18%), che rappresenta quindi una potenziale risorsa come fonte di proteine. Riguardo alla composizione amminoacidica (Tabella 4.2) si può osservare che la buccia di cacao, rispetto al guscio di fava di cacao, possiede una quantità minore di amminoacidi con caratteristiche acide (acido aspartico e glutammico) e di base (arginina e lisina). Viceversa, prolina e valina sono maggiormente presenti nei gusci di cacao così come anche fenilalanina, tirosina, istidina e triptofano (amminoacidi aromatici).

Si rileva anche una notevole differenza riguardo gli amminoacidi essenziali (fenilalanina, treonina, triptofano, metionina, lisina, leucina, isoleucina e valina). Infatti il guscio di fava di cacao presenta quantità più elevate rispetto alle bucce di cui invece la presenza non è stata rilevata per tutti gli amminoacidi (metionina).

Per la componente lipidica (Tabella 4.3), gli acidi grassi predominanti in entrambi i sottoprodotti sono rispettivamente: acido palmitico, stearico, oleico e linoleico.

La quantità di acidi grassi saturi (miristico, palmitico e stearico) è simile per entrambi, mentre per quanto riguarda gli acidi grassi insaturi, il guscio di fave di cacao presenta un contenuto più elevato di acido oleico mentre la buccia di cacao ha un contenuto maggiore di acido linoleico.

Alcune differenze nel contenuto di ceneri, proteine e lipidi, sono principalmente dovute alla variabilità del frutto del cacao, la cui composizione è fortemente influenzata dalla cultivar, dalle condizioni di coltivazione, dal clima, dalla composizione del suolo e dalla regione geografica (Vásquez et al., 2019).

**Tabella 4.2** Composizione amminoacidica di Cocoa pod husks e Cocoa shells dei substrati utilizzati.

Amminoacido	Totali		Liberi	
	Husk	Shell	Husk	Shell
Istidina	35,23	149,69	0,90	0,32
Arginina	147,07	626,84	2,08	73,45
Serina	225,37	700,08	5,06	8,44
Glicina	169,36	678,14	8,17	11,15
Aspartico	434,15	1529,94	40,03	33,79
Glutammico	495,33	2011,19	27,14	66,80
Treonina	150,86	590,27	1,22	11,54
Alanina	206,16	805,64	11,63	38,60
Prolina	214,71	744,13	9,56	17,74
Lisina	261,35	1015,78	0,49	24,42
Metionina	nr	182,85	nr	Nr
Tirosina	78,61	519,92	nr	Nr
Valina	141,88	578,51	0,24	16,55
Cisteina	32,33	118,17	0,92	15,24
Isoleucina	101,75	428,40	0,60	18,02
Leucina	243,17	870,03	1,50	46,06
Fenilalanina	146,14	540,99	0,88	33,34
Triptofano	55,02	128,90	nr	Nr

nr: non rilevato

\*: I dati sono espressi in g/100 g di peso secco

**Tabella 4.3** Composizione lipidica di Cocoa pod husks e Cocoa shells utilizzati.

<b>Acidi grassi</b>	<b>Cocoa Pod Husks</b>	<b>Cocoa Shells</b>
C10:0	0,027	n.r
C12:0	0,484	0,029
C14:0 miristico	1,732	0,140
C15:0	0,258	0,057
C16:0 palmitico	29,921	31,112
C16:1n7	0,134	n.r
C16:1n9	n.r	0,314
C17:0	0,293	0,258
C17:1n7	0,102	0,036
C17:1n8	n.r	0,082
C18:0 stearico	25,213	27,184
C18:1n9 oleico	22,991	34,327
C18:2n6 linoleico	15,031	4,674
C18:2n6t	0,072	n.r
C18:3n6	0,053	0,023
C19:0	0,058	0,014
C18:3n3	0,972	0,253
C20:0	1,026	0,855
C20:1n9	0,070	0,058
C20:2n6	0,048	0,009
C21:0	0,017	0,015
C20:3n3	0,104	0,019
C20:4n6 arachidonico	0,036	n.r
C20:5n3 EPA	0,046	n.r
C22:0	0,448	0,212
C22:1n9	0,069	n.r
C22:2n6	0,025	n.r
C23:0	0,204	n.r
C24:0	0,567	0,331
Somma	100,00	100,00

\*: I dati sono espressi in g/100 g di peso secco

## 4.2 Messa a punto del sistema di pretrattamento

Il pretrattamento è un passaggio preliminare e necessario all'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche in zuccheri fermentescibili per il fatto che l'idrolisi chimica o biologica della cellulosa è ostacolata dalla natura chimico-fisica e strutturale dei reticoli di lignina ed emicellulosa (Alvira et al., 2010). La scelta del tipo di pretrattamento ha un grande impatto su tutte le fasi successive per la conversione in etanolo e PHA. Può infatti determinare la generazione di composti tossici potenzialmente inibitori per i ceppi poi utilizzati nelle fasi successive di fermentazione (Favaro et al, 2013). Molto spesso, inoltre, i pretrattamenti richiedono l'ausilio di strumentazioni per provvedere all'agitazione meccanica del materiale durante il pretrattamento (Galbe et al., 2007; Sun and Cheng, 2002).

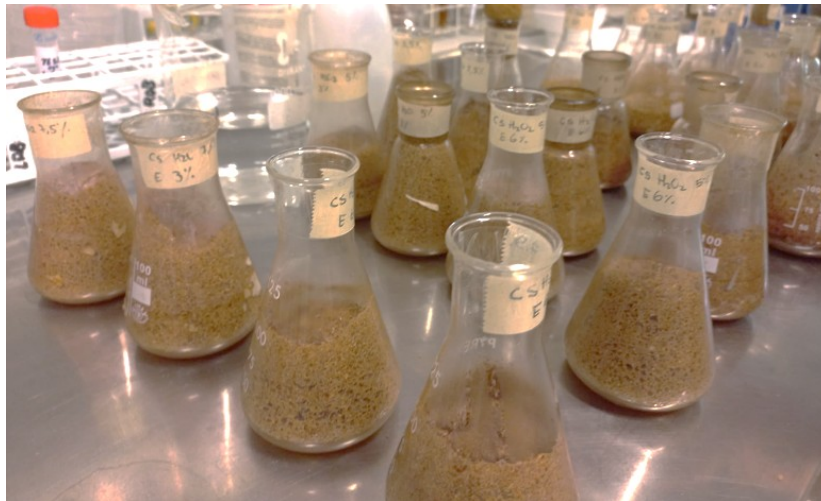
In questo studio è stato scelto di adoperare due tipologie di pretrattamento chimico: con  $H_2O_2$  e con NaOH.

Inizialmente sono state effettuate diverse prove per determinare il migliore rapporto tra CPH e acqua, ed è risultato del 10% p/v. Utilizzando rapporti più bassi come il 5%, gli zuccheri rilasciati non sarebbero stati sufficienti a sostenere la crescita microbica nelle successive fasi; rapporti più alti come il 15% ed il 20% davano origine a sospensioni troppo viscosi e difficilmente agitabili.

Sospensioni al 10% p/v sono state incubate con concentrazioni crescenti di  $H_2O_2$  (Figura 4.1) e successivamente saccharificate con Cellic® CTec2 (Figura 4.2) come descritto nel capitolo Materiali e Metodi. Dopo incubazione, sono stati quindi analizzati gli zuccheri riducenti rilasciati tramite due metodiche: DNS e con metodo enzimatico.

Il pretrattamento con  $H_2O_2$ , la saccharificazione e la successiva analisi degli zuccheri riducenti con il saggio DNS non ha portato risultati soddisfacenti. In primo luogo, il pretrattamento non è risultato abbastanza efficace nel rompere la struttura della

lignina e aumentare l'esposizione della cellulosa agli enzimi nella fase di idrolisi. Per quanto riguarda poi l'analisi degli zuccheri, il saggio DNS non è risultato idoneo nella determinazione degli zuccheri semplici, a differenza del kit enzimatico Megazyme che si è dimostrato efficiente e veloce.

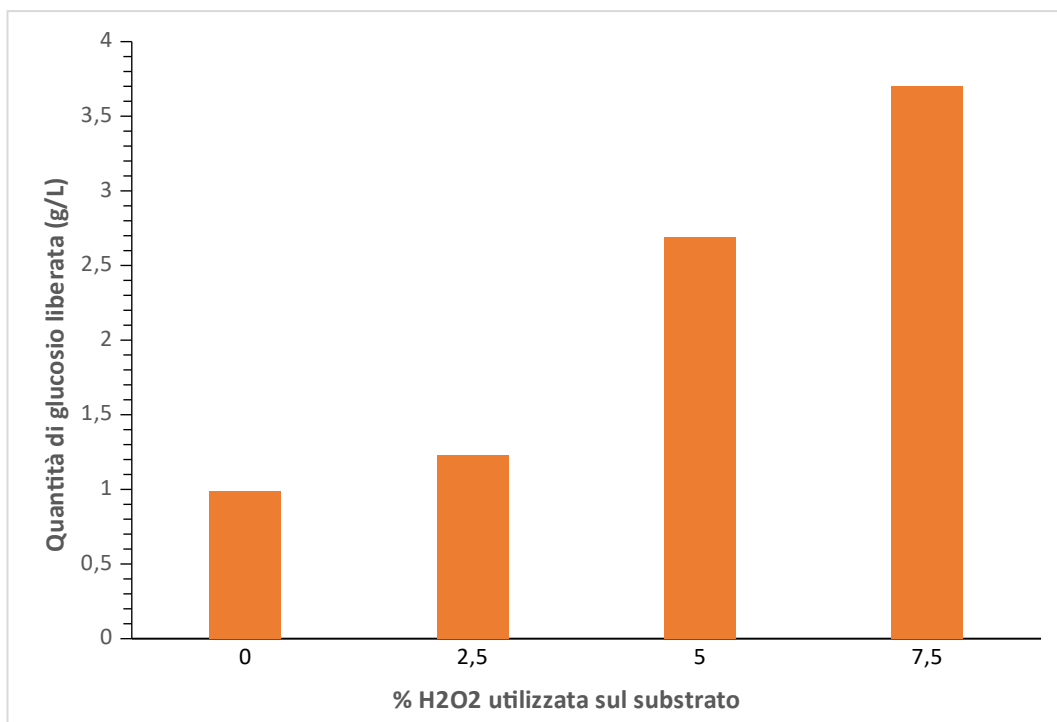
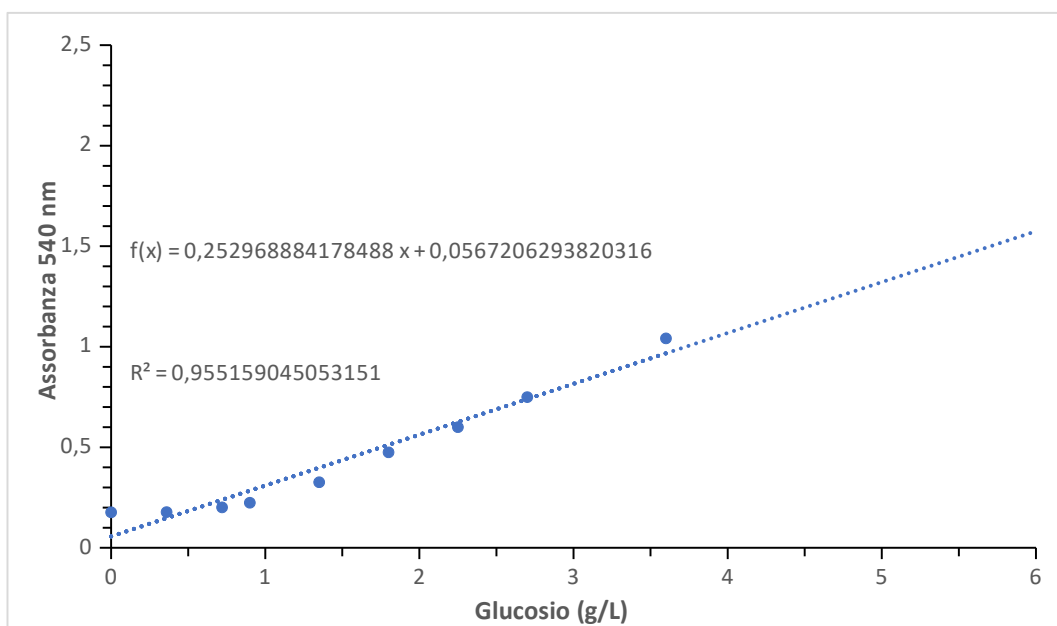


**Figura 4.1** Cocoa pod husks incubati con diverse concentrazioni di  $H_2O_2$ .



**Figura 4.2** Incubazione dei campioni a  $50^{\circ}C$ .

Il principio di base del saggio DNS include la riduzione dell'acido 3,5-dinitrosalicilico ad acido 3-amino-5-nitrosalicilico e la successiva ossidazione dei gruppi aldeidici degli zuccheri riducenti. Poiché i materiali lignocellulosici sono di natura eterogenea, durante il precedente processo di saccharificazione è possibile che si siano liberati dei composti chimici che abbiano interferito con il metodo DNS (Deshavath et al., 2020). La Figura 4.3 (a) mostra la quantità di glucosio liberata da CPH a seconda della diversa concentrazione di perossido di idrogeno utilizzata, facendo riferimento alla retta di taratura del glucosio tramite metodo con DNS (Figura 4.3 (b)). La Figura 4.3 (a) evidenzia come ad una concentrazione del 7,5% di perossido di idrogeno corrisponda una quantità di glucosio pari a circa 4 g/L. Tale quantità risulta essere molto bassa e per questo motivo, durante lo svolgimento dell'esperimento, è stata ipotizzata la probabilità di formazione di composti interferenti con la metodica utilizzata.

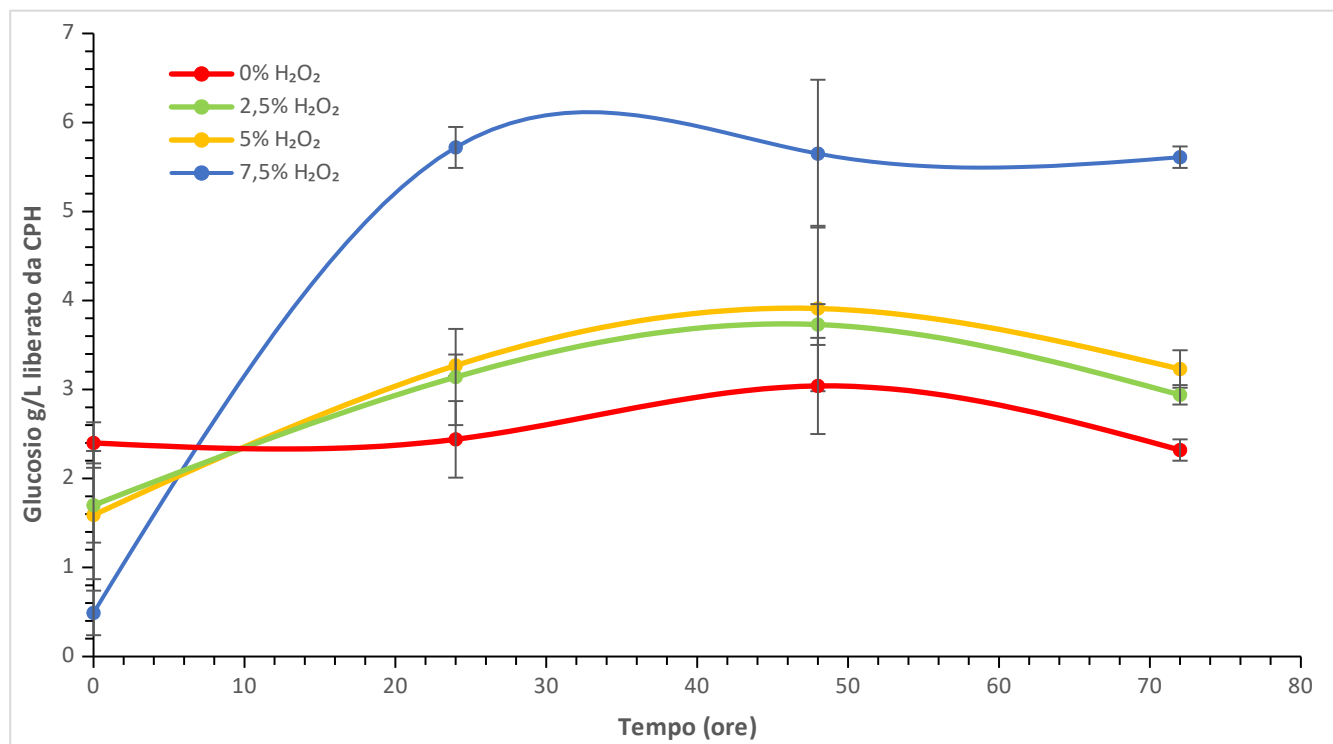
**A****B**

**Figura 4.3** Quantità di glucosio liberato (g/L) da CPH in base alla concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizzata **(A)**. Retta di taratura del glucosio utilizzando il saggio DNS **(B)**.

Poiché il metodo DNS non si è dimostrato efficace nel dosare gli zuccheri rilasciati dopo pretrattamento e successiva idrolisi enzimatica di una matrice complessa come il CPH, si è optato per l'utilizzo del più costoso ma più efficace kit enzimatico Megazyme. Il kit enzimatico si era dimostrato in precedenza altamente specifico e

senza interferenze sostanziali nel dosaggio del glucosio rilasciato da matrici complesse come i residui vegetali (Hua et al., 2009).

In Figura 4.4 sono riportati gli zuccheri rilasciati nel tempo durante le prove di saccarificazione dopo pretrattamento con quantità crescenti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizzando il kit enzimatico.



**Figura 4.4** Concentrazione di glucosio (g/L) liberato dai campioni di CPH pretrattati con 0; 2,5; 5 e 7,5% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la saccarificazione con il 12% di enzima.

Come risulta dalla Figura 4.4, il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 7,5% sembra avere portato ad una maggiore esposizione della cellulosa e quindi un più alto rilascio di glucosio ad opera delle cellulasi contenute in Cellic® CTec2; la concentrazione massima di glucosio rilasciata durante la saccarificazione è stata di circa 6 g/L (corrispondente al pretrattamento con 7,5% di perossido di idrogeno), ottenuta dopo sole 25-30 ore di incubazione con il cocktail enzimatico; il grado di saccarificazione è stato del 24%.



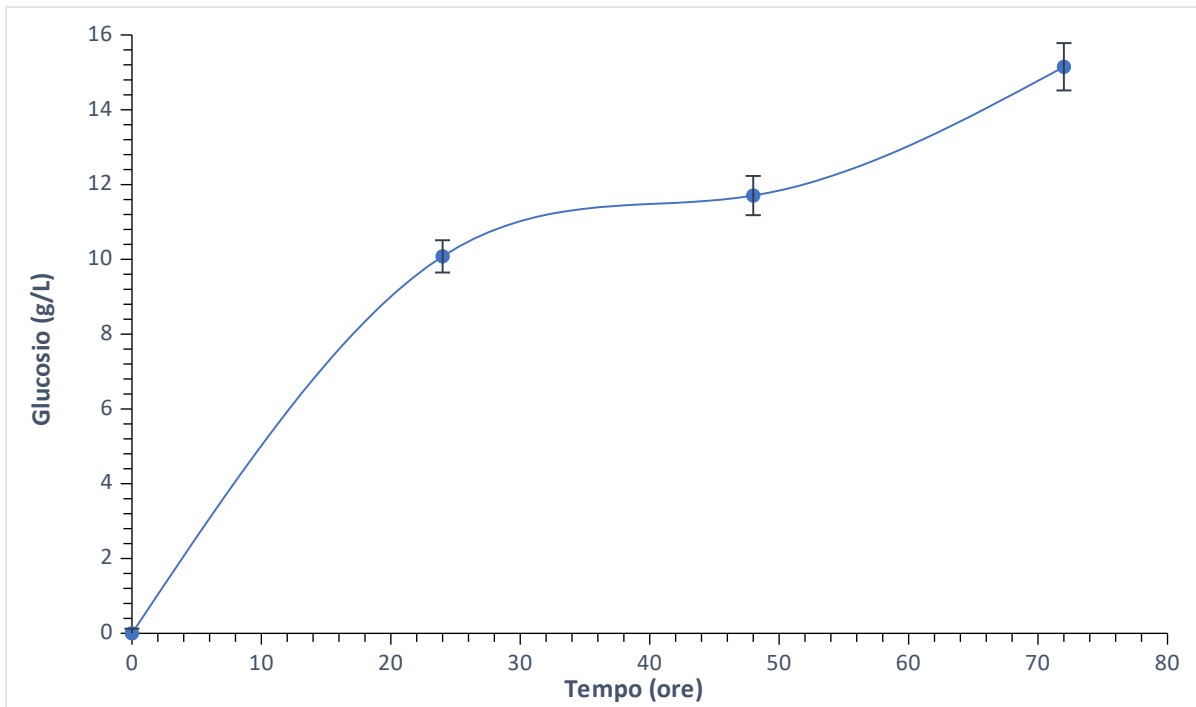
Purtroppo, una concentrazione di glucosio nell'idrolizzato enzimatico, pari a 6 g/L, risultava piuttosto bassa per sostenere la crescita microbica nelle successive fasi di fermentazione di *S. cerevisiae* e *C. necator*.

Per questo è stato deciso di utilizzare un altro tipo di pretrattamento con idrossido di sodio nell'ipotesi che fosse più efficace rispetto al precedente.

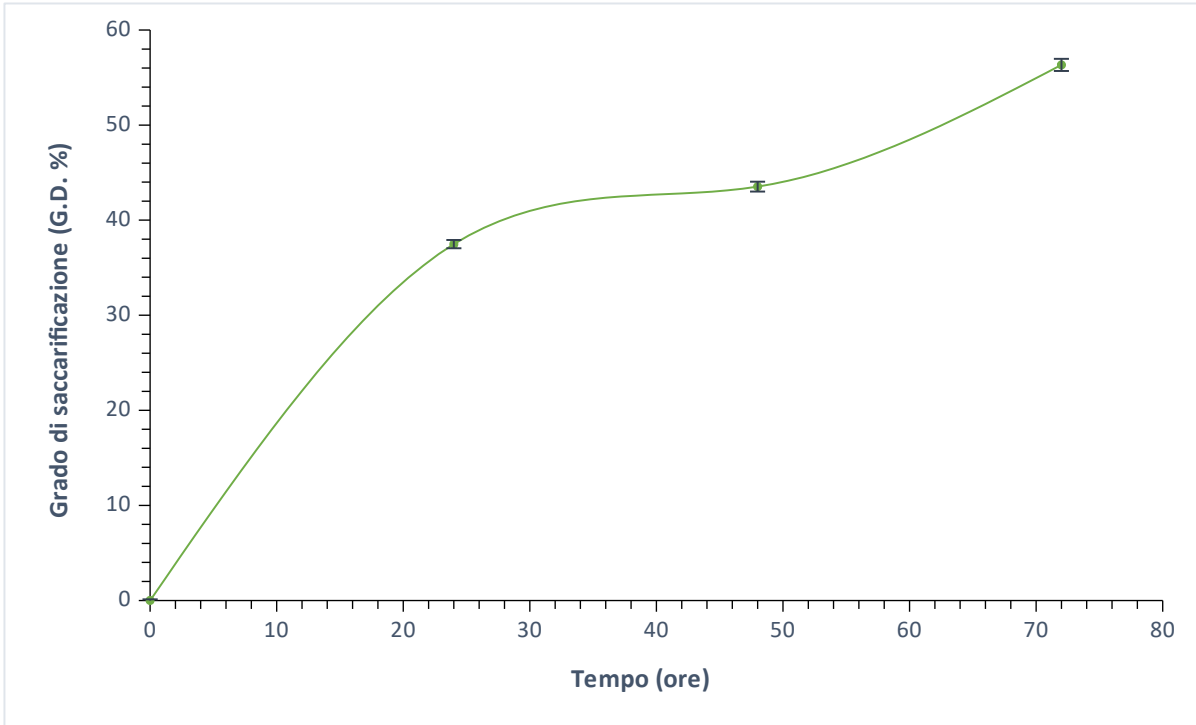
Dall'analisi della Figura 4.5, si osserva che il pretrattamento con idrossido di sodio ha permesso di rilasciare un maggiore contenuto di glucosio, la cui concentrazione dopo 70 ore era pari a circa 15 g/L, valore molto più elevato rispetto ai 6 g/L ottenuti dal pretrattamento precedente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

I risultati mostrano che il pretrattamento termo-alcantino rompe la struttura della lignina, aumenta la superficie interna della cellulosa e aiuta a ridurre la cristallinità, facilitando così l'attacco enzimatico delle cellulasi.

Le concentrazioni di glucosio sono state poi utilizzate per calcolare il grado di saccarificazione (G.D) (Figura 4.6) che rappresenta il glucosio solubile rilasciato dopo l'idrolisi enzimatica, ed è risultato del 56%. Il calcolo è stato effettuato utilizzando la formula presente nel capitolo Materiali e Metodi.



**Figura 4.5.** Concentrazione di glucosio (g/L) liberato da CPH durante la saccharificazione con il 12% di Cellic® CTec2 dopo pretrattamento con NaOH (4%).



**Figura 4.6** Grado di saccharificazione ottenuto nel tempo dopo pretrattamento con NaOH (4%) e incubazione con il 12% di Cellic® CTec2.

### 4.3 Crescita di *S. cerevisiae* FM17 e *C. necator* DSM545 su CPH pretrattato e idrolizzato

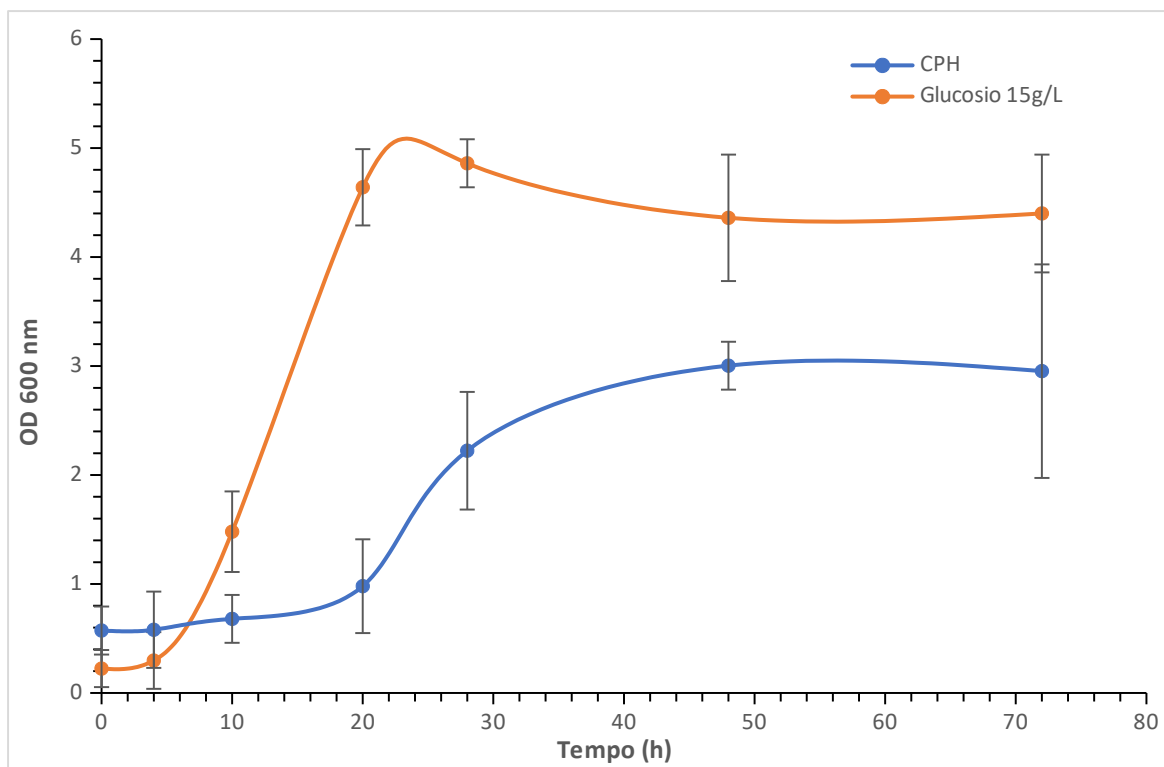
Dopo avere determinato le condizioni ottimali di pretrattamento e idrolisi di CPH, si è valutata la crescita di *S. cerevisiae* FM17 e *C. necator* DSM545 su un terreno colturale contenente l'idrolizzato (Figura 4.7 e 4.8).

Per quanto riguarda la crescita di *S. cerevisiae* FM17, la curva di crescita è stata eseguita in idrolizzato tal quale (contenente glucosio 15 g/L) e monitorata per 72 ore. In parallelo, è stata condotta anche una fermentazione di controllo con un terreno colturale contenente glucosio 15 g/L.

Come si può osservare dalla Figura 4.7, *S. cerevisiae* mostra una fase lag più breve e valori di  $OD_{600nm}$  maggiori nel substrato contenente glucosio rispetto a quello con CPH ( $OD_{600nm} = 0,298$  in glucosio e 0,98 in CPH) e in glucosio raggiunge la fase stazionaria già dopo 24-28 ore rispetto al substrato con CPH, dove questa viene raggiunta dopo 48 ore.

*S. cerevisiae* FM17 ha utilizzato gli zuccheri fermentescibili del substrato di CPH idrolizzato che è risultato quindi capace di sostenere la crescita del lievito.

La resa teorica in bioetanolo, determinata in grammi di etanolo prodotto per grammi di zuccheri fermentescibili consumati, (0,51 g di etanolo per g di glucosio utilizzato) (Cripwell et al., 2015) dovrebbe essere di circa 7,93 g/L di etanolo, se si considera una resa del 100%. Analisi chimiche sono in corso per confermare questi dati teorici.

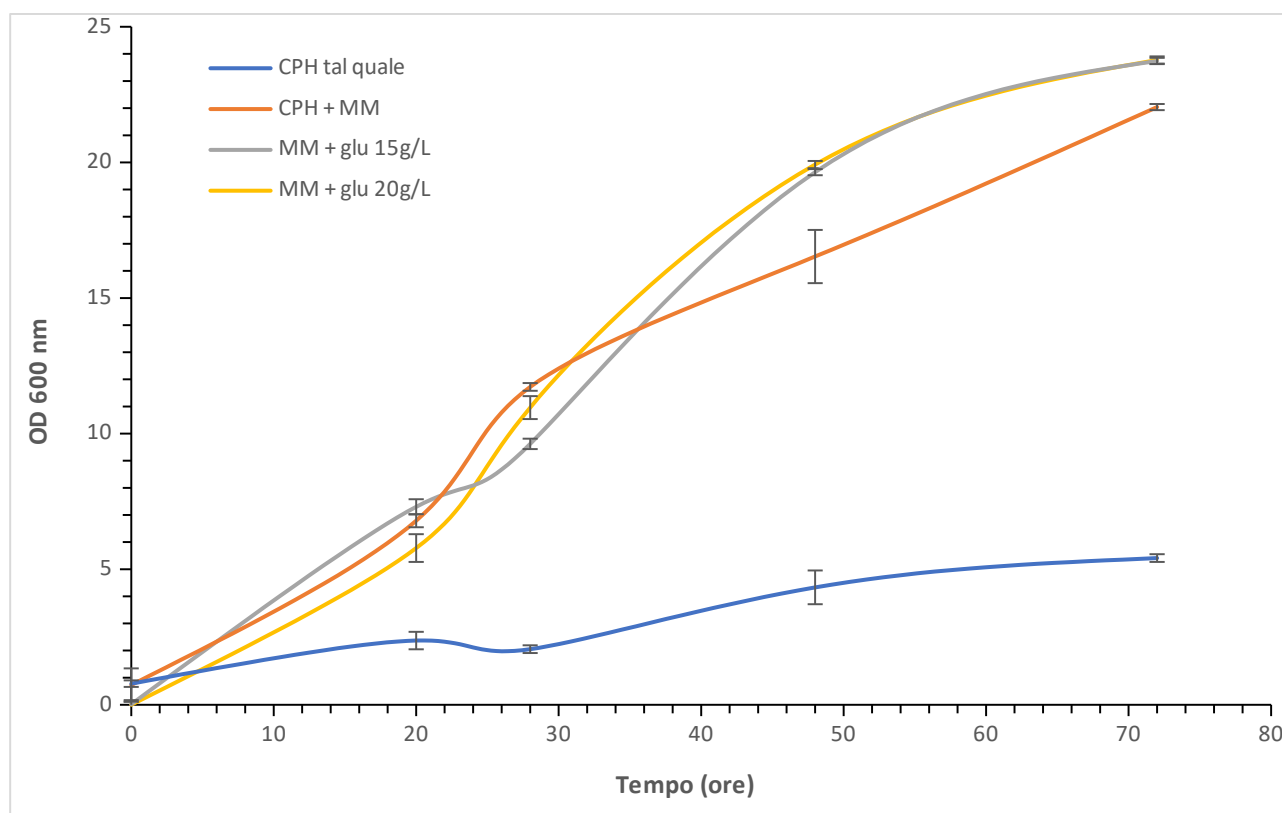


**Figura 4.7** Crescita di *S. cerevisiae* Fm17 in idrolizzato di CPH e glucosio 15 g/L.

Per la crescita di *C. necator* DSM545, sono state condotte diverse prove in modo da valutare l'effettiva potenzialità di CPH come substrato per la produzione di PHB. In particolare sono stati utilizzati due substrati: uno contenente l'idrolizzato di CPH tal quale e l'altro contenente l'idrolizzato di CPH miscelato con i sali MM (contenenti entrambi glucosio 15 g/L proveniente dall'idrolisi enzimatica della cellulosa). Inoltre, sono state condotte due prove di controllo utilizzando MM + glucosio 15 g/L e MM + 20 g/L. La crescita è stata monitorata per un totale di 72 ore.

Nelle due condizioni (idrolizzata CPH tal quale o in MM) l'andamento della crescita mostra differenze significative (Figura 4.8) mentre non si osservano differenze tra le curve di crescita in MM + glucosio 15 g/L e MM + glucosio 20 g/L. Nell'idrolizzato di CPH tal quale, *C. necator* DSM545 mostra una crescita scarsa, probabilmente per la presenza di inibitori microbici o per la assenza di nutrienti essenziali. Quando

l'idrolizzato di cacao viene invece miscelato con MM, la crescita di *C. necator* mostra un andamento simile a quella osservata in MM + 15 g/L di glucosio



**Figura 4.8** Crescita di *C. necator* DSM545 in CPH tal quale, MM + CPH, MM + 15% di glucosio e MM + 20% di glucosio.

#### 4.4 Estratto di PHB dal substrato idrolizzato e liofilizzato

Dopo 72 ore i brodi culturali sono stati centrifugati, i pellet raccolti e la percentuale di PHB misurata come descritto in materiali e metodi. I risultati sono riportati in Tabella 4.4. I valori di PHB rilevati utilizzando come substrato glucosio 15 g/L e 20 g/L sono rispettivamente del 72% e del 75% del peso secco della biomassa

I valori di PHB accumulato da *C. necator* nell'idrolizzato di CPH tal quale o in MM risultano buoni (rispettivamente del 58 e 51% della biomassa secca) nonostante la limitata crescita su substrato tal quale (Figura 4.8) che probabilmente manca di

nutrienti essenziali o contiene inibitori della crescita come sopra riportato. Dai risultati ottenuti, CPH potrebbe quindi essere utilizzato come substrato per la crescita di *C. necator* per la produzione di PHB anche se studi ulteriori sono necessari per ottimizzare la crescita e l'accumulo del polimero ad opera di *Cupriavidus*.

**Tabella 4.4** Percentuali di PHB su peso secco della biomassa microbica ottenuta in CPH pretrattato tal quale, MM + CPH, MM + glucosio 15 g/L e MM + glucosio 20 g/L.

	<b>% PHB su peso secco</b>
CPH non inoculato	0
CPH tal quale	58,6 ±4,97
CPH + MM	51,3±2,81
MM + glucosio 15 g/L	72,0
MM + glucosio 20 g/L	74,6

## 5. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni l'accumulo eccessivo di rifiuti e di sottoprodotti dell'industria alimentare, ha fatto emergere la necessità di valorizzare i residui contenenti lignocellulosa nell'ottica della cosiddetta "economia circolare". Una possibile valorizzazione è la produzione di combustibili rinnovabili e materiali polimerici sostenibili. Le biomasse lignocellulosiche residuali hanno come caratteristiche principali la ricca composizione di polisaccaridi e proteine. All'interno della diversa gamma di colture agroindustriali, la coltivazione del cacao genera enorme interesse. Il cioccolato è il principale prodotto ottenuto dal cacao e, nella sua lavorazione, si generano diversi sottoprodotti come la buccia di cacao (cocoa pod husk, CPH) e il guscio di fava di cacao (cocoa bean shell, CBS). Tuttavia, tra tutti questi sottoprodotti generati nella catena di lavorazione del cacao, CPH è il più abbondante, rappresentando il 75-80% del peso secco del frutto del cacao.

Nel presente studio sono state valutate le capacità del sottoprodotto di lavorazione del cacao (cocoa pod husk) come potenziale substrato per la crescita di *S. cerevisiae* Fm17 e *C. necator* DSM545, ceppi utilizzabili per la produzione di bioetanolo e polioidrossialcanoati.

Dalle sperimentazioni conseguite, è stato verificato che il tipo di pretrattamento che viene scelto è essenziale per permettere una buona idrolisi della cellulosa e un maggiore rilascio di zuccheri per le fasi successive di fermentazione.

Il pretrattamento con idrossido di sodio e la successiva idrolisi enzimatica, si sono dimostrati efficaci nel liberare una quantità di zuccheri sufficiente da sostenere la crescita di *S. cerevisiae* Fm17 e di *C. necator* DSM545.

Mentre *S. cerevisiae* Fm17 su CPH idrolizzato ha mostrato di riuscire ad utilizzare efficacemente gli zuccheri rilasciati, *C. necator* DSM545 ha riscontrato difficoltà di

crescita su substrato tal quale. Grazie all'aggiunta dei sali MM (minimal salt medium), la crescita del microrganismo è risultata soddisfacente.

La quantità di PHB prodotto, misurato tramite l'utilizzo tecniche gas cromatografiche è risultata soddisfacente. Dal substrato idrolizzato tal quale si sono ottenute percentuali di PHB accumulato pari al 58% del peso secco, mentre il substrato liofilizzato con MM ha dato una resa del 51%.

In conclusione, è stato verificato che le bucce di cacao (CPH) sono una potenziale risorsa per la produzione di biocarburanti e materiali polimerici rinnovabili; tali risultati rappresentano un incentivo all'utilizzo di questi scarti nell'ottica dell'economia circolare e la salvaguardia ambientale.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, N., Vrieze, J. D., Sandoval, V., Sinche, D., Wierinck, I., & Rabaey, K. (2018). Cocoa residues as viable biomass for renewable energy production through anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, *265*, 568–572.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *48*, 840–857.
- Álvarez-Castillo, E., Felix, M., Bengoechea, C., & Guerrero, A. (2021). Proteins from Agri-Food Industrial Biowastes or Co-Products and Their Applications as Green Materials. *Foods*, *10*(5).
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4851–4861.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 161–174.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, *26*(1), 89–105.

- Bertrand, E., Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Sigoillot, J.-C., & Faulds, C. (2016). First Generation Bioethanol. In C. R. Soccol, S. K. Brar, C. Faulds, & L. P. Ramos (A c. Di), *Green Fuels Technology: Biofuels* (pp. 175–212). Springer International Publishing.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., & Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 6(1), 29–37.
- Brodin, M., Vallejos, M., Opedal, M. T., Area, M. C., & Chinga-Carrasco, G. (2017). Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review. *Journal of Cleaner Production*, 162, 646–664.
- Brojanigo, S., Gronchi, N., Cazzorla, T., Wong, T. S., Basaglia, M., Favaro, L., & Casella, S. (2022). Engineering *Cupriavidus necator* DSM 545 for the one-step conversion of starchy waste into polyhydroxyalkanoates. *Bioresource Technology*, 347, 126383.
- Capolupo, L., & Faraco, V. (2016). Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), 9451–9467.
- Churakova, E., Peri, K., Vis, J. S., Smith, D. W., Beam, J. M., Vijverberg, M. P., Stor, M. C., & Winter, R. T. (2019). Accurate analysis of residual lactose in low-

- lactose milk: Comparing a variety of analytical techniques. *International Dairy Journal*, 96, 126–131.
- Cripwell, R., Lorenzo, F., Rose, S., Basaglia, M., Cagnin, L., Sergio, C., & van Zyl, W. (2015). Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. *Applied Energy*, 160.
  - Dagnino, E. P., Chamorro, E. R., Romano, S. D., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2013). Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 42, 363–368.
  - Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180–185.
  - Emadian, S. M., Onay, T. T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526–536.
  - Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2012). Processing wheat bran into ethanol using mild treatments and highly fermentative yeasts. *Biomass and Bioenergy*, 46, 605–617.
  - Favaro, L., Jooste, T., Basaglia, M., Rose, S. H., Saayman, M., Görgens, J. F., Casella, S., & Zyl, W. H. van. (2013). Designing industrial yeasts for the

- consolidated bioprocessing of starchy biomass to ethanol. *Bioengineered*, 4(2), 97–102.
- Gupte, A. P., Basaglia, M., Casella, S., & Favaro, L. (2022). Rice waste streams as a promising source of biofuels: Feedstocks, biotechnologies and future perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 167, 112673.
  - Hernández-Mendoza, A. G., Saldaña-Trinidad, S., Martínez-Hernández, S., Pérez-Sariñana, B. Y., & Láinez, M. (2021). Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 154, 106268.
  - Kessler, B., Weusthuis, R., Witholt, B., & Eggink, G. (2001). Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 71, 159–182.
  - Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, 4(2).
  - Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, 165, 3–8.

- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467.
- Lu, F., Rodriguez-Garcia, J., Damme, I. V., Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., Warren, G., Chatzifragkou, A., Mason, S. M., Gomez, L., Faas, L., Balcombe, K., Srinivasan, C., Picchioni, F., Hadley, P., & Charalampopoulos, D. (2018b). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80–88.
- Mariatti, F., Gunjević, V., Boffa, L., & Cravotto, G. (2021). Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68.
- Pathak, S., Sneha, C. L. R., & Mathew, B. B. (2014). Bioplastics: Its timeline based scenario & challenges. *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem.*, 2(4), 84–90.
- Povolo, S., Romanelli, M. G., Fontana, F., Basaglia, M., & Casella, S. (2012a). Production of Polyhydroxyalkanoates from Fatty Wastes. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(4), 944–949.
- Roijen, E. C. V., & Miller, S. A. (2022). A review of bioplastics at end-of-life: Linking experimental biodegradation studies and life cycle impact assessments. *Resources, Conservation and Recycling*, 181, 106236.
- Ryan, P. G. (1988). Effects of ingested plastic on seabird feeding: Evidence from chickens. *Marine Pollution Bulletin*, 19(3), 125–128.

- Soares, T. F., & Oliveira, M. B. P. P. (2022). Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules*, 27(5).
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Foglia, T. A., & Marmer, W. N. (2006). Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6).
- Sousa, L. da C., Chundawat, S. P., Balan, V., & Dale, B. E. (2009). 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 339–347.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002a). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002b). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—A review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148–175.
- Syamsiro, M., Saptoadi, H., Tambunan, B. H., & Pambudi, N. A. (2012). A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. *Energy for Sustainable Development*, 16(1), 74–77.

- Titz, M., Kettl, K.-H., Shahzad, K., Koller, M., Schnitzer, H., & Narodoslowsky, M. (2012). Process optimization for efficient biomediated PHA production from animal-based waste streams. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *14*(3), 495–503.
- Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., Song, H., Kim, K.-H., Kwon, E. E., & Jeon, Y. J. (2019). Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*, *127*, 625–644.
- Valladares-Diestra, K. K., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2022). A biorefinery approach for pectin extraction and second-generation bioethanol production from cocoa pod husk. *Bioresource Technology*, *346*, 126635.
- van Zyl, W. H., Lynd, L. R., den Haan, R., & McBride, J. E. (2007). Consolidated Bioprocessing for Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae*. In L. Olsson (A c. Di), *Biofuels* (pp. 205–235). Springer Berlin Heidelberg.
- Vandenberghe, L. P. de S., Valladares-Diestra, K. K., Bittencourt, G. A., Mello, A. F. M. de, Vásquez, Z. S., Oliveira, P. Z. de, Pereira, G. V. de M., & Soccol, C. R. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*, *344*, 126252.
- Vásquez, Z. S., Neto, D. P. de C., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., Oliveira, P. Z. de, Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Neto, A. G., & Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, *90*, 72–83.

- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475–501.