

E' possibile produrre lipidi per biolubrificanti e biocarburanti dalla canna comune?

Stefania Galletti, Stefano Cianchetta, Enrico Ceotto

CREA – Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente
Sede di Bologna

Task 4.1 Idrolizzati enzimatici a basso tenore di azoto e di inibitori da
biomassa lignocellulosica per la filiera del biodiesel di II generazione

Contenuti

1. introduzione
2. obiettivi della ricerca
3. schema metodologico
4. risultati ottenuti con lieviti
5. risultati ottenuti con funghi
6. conclusioni
7. pubblicazioni
8. ringraziamenti



La ricerca è incentrata sull'ottenimento di **lipidi da lignocellulosa tramite fermentazione con microrganismi oleaginosi** per il settore dei biolubrificanti e dei biocarburanti

Perché l'olio microbico?

La produzione di olio microbico è un'alternativa interessante all'olio vegetale

- è indipendente dai fattori climatici, stagionali o geografici
- annulla il conflitto "food vs energy"
- ha brevi cicli di produzione e alta efficienza

(I microrganismi oleaginosi possono accumulare lipidi intracellulari fino al 70% della loro biomassa, per conversione di zuccheri semplici, quando si trovano in condizioni sub-ottimali di crescita, ovvero con substrati ad alto C/N)

Perché olio da lignocellulosa?

La lignocellulosa (residui agricoli, colture dedicate) è il materiale polimerico più abbondante sul pianeta e può essere trasformata in carboidrati fermentescibili per le bioraffinerie (bioetanolo, biogas, bioidrogeno) in quanto formata da microfibrille di cellulosa (catene di glucosio), emicellulosa (zuccheri pentosi), oltre che da pectina e lignina.

Perché la canna comune (*Arundo donax* L.)?

La canna comune è considerata specie da energia di elezione nell'Europa del sud per la sua elevata produttività, durata di impianto e adattabilità a terreni marginali.

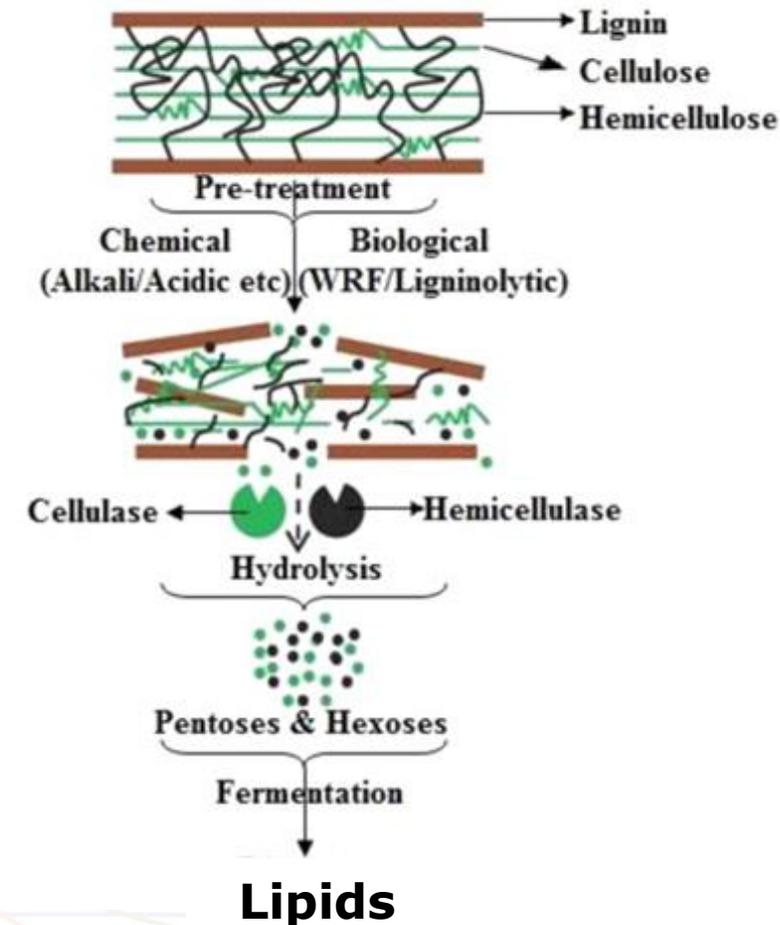


Lignocellulosa: microfibrille di cellulosa (catene di glucosio) immerse in una matrice di emicellulosa (pentosi), pectina e lignina, strettamente connesse in una complessa struttura cristallina, che la rendono molto resistente e **recalcitrante alla bioconversione**.

Necessità di un **pretrattamento** (fisico, chimico, fisico-chimico, biologico) che indebolisca la struttura ed esponga la cellulosa al fine di facilitare la liberazione dei carboidrati fermentescibili.

In esperienze precedenti la biomassa di canna comune è risultata essere generalmente più recalcitrante alla bioconversione in monosaccaridi rispetto ad altre specie da energia (panico, miscanto).

Poche ricerche hanno riguardato la produzione di olio microbico da lignocellulosa, prevalentemente ottenuto previa idrolisi con acidi concentrati, che determinano problemi di corrosione e formazione di inibitori, con necessità di detossificazione della biomassa delignificata prima della fermentazione microbica.

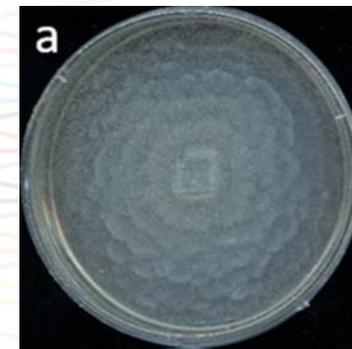
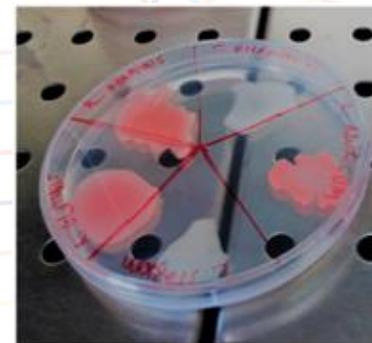


Obiettivo generale

Definizione di un **processo** di trattamento della biomassa lignocellulosica di arundo che fosse efficace nel liberare carboidrati fermentescibili, ma che riducesse nel contempo l'accumulo di inibitori ed il contenuto di azoto, per favorire la fermentazione microbica e la resa in lipidi

Obiettivi specifici

1) messa a punto di protocolli di **pretrattamento** della biomassa di canna comune e di **idrolisi enzimatica**, per l'ottenimento di idrolizzati zuccherini a basso tenore di azoto e di inibitori



2) verifica dell'idoneità degli idrolizzati di arundo per la produzione di **olio** con microrganismi oleaginosi selezionati (**lieviti e funghi**).

1.PRETRATTAMENTO TERMO-ALCALINO DELIGNIFICANTE



NaOH/KOH
1,2%/1.7%
w/w
120 °C, 20
min



Fibra
delignificata



Liquor alcalino
di scarto

2.IDROLISI ENZIMATICA

Cellic CTec 2 (25 FPU/g)
50 °C, 120 h, pH 4,9-5,1

3.FERMENTAZIONE CON LIEVITI E FUNGHI OLEAGINOSI



(30 g/L glucosio eq., 28°C)

- Arundo autunno-invernale = alto C/N
- Vantaggi pretrattamento alcalino vs acido: trattiene anche l'emicellulosa e produce meno inibitori
- Enzimi ad alta attività specifica

Single cell oil production from hydrolysates of alkali pre-treated giant reed: High biomass-to-lipid yields with selected yeasts

Stefano Gianchetta^{a,*}, Nakia Polidori^{a,b}, Ciro Vasmara^c, Enrico Ceotto^a, Rosa Marchetti^c,
Stefania Galletti^a

^a Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Agriculture and Environment, Via di Corticella 133, 40128 Bologna, Italy

^b Institute of Molecular Biosciences - University of Graz, Humboldtstraße 50, 8010 Graz, Austria

^c Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Animal Production and Aquaculture, Via Beccastecca 345, 41018 San Cesario s/P, Modena, Italy

5 lieviti oleaginosi
2 idrolizzati enzimatici (da biomassa lavata/non lavata dopo
il pretrattamento termo-alcantino)
fermentazione in beute con concentrazione finale di
carboidrati pari a 30 g/L
3 livelli di azoto

Valutazione delle rese in olio e della composizione acidica



Il lavaggio della fibra delignificata non è risultato determinante

L. starkeyi, *R. azoricus* e *C. oleaginosum* hanno mostrato, nelle condizioni ottimali di N:

- le concentrazioni di lipidi più alte nelle colture (4,8-5,6 g per litro)
- i contenuti cellulari di lipidi più elevati (54-68%)
- le rese di conversione a olio più alte: (20% rispetto ai monosaccaridi consumati e 9-10 % rispetto alla biomassa secca iniziale)

Lievito	Medium ottimale (mg/L N)	Concentrazioni di lipidi nelle colture (g/L)	Contenuto cellulare di lipidi %	Rese di conversione rispetto ai carboidrati consumati %	Rese di conversione biomassa arundo %
<i>Lipomyces starkeyi</i>	N1 (70)*	4.8 a	68 a	19.5 a	8.9 a
<i>Rhodosporidiobolus azoricus</i>	N2 (200)	5.2 a	60 ab	19.4 a	9.5 a
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosum</i>	N2 (200)	5.6 a	54 b	20.5 a	10.2 a
<i>Rhodotorula glutinis</i>	N2 (200)	3.4 b	52 bc	17.1 b	6.2 b
<i>Rhodotorula graminis</i>	N2 (200)	3.3 b	42 c	13.9 c	6.0 b

*Nessuna aggiunta di N

4. Risultati - Lieviti (Composizione oli)

I profili degli oli confermano i dati di letteratura, ritenuti compatibili con la produzione di biodiesel

In particolare notiamo predominanza di acido oleico (42-51%) e palmitico (25-43%), seguiti da linoleico e stearico (simili a olio di palma/arachide)

R. azoricus ha mostrato il più alto contenuto di acido linoleico, (21%), che invece è stato solo del 3% nelle colture di *L. starkeyi*.

Lievito	Acido miristico %	Acido palmitico %	Acido palmitoleico %	Acido stearico %	Acido oleico %	Acido linoleico %	Acido linolenico %
<i>Lipomyces starkeyi</i>	0.5 d	43 a	5.1 a	6.4 b	42 b	3 d	0.1 c
<i>Rhodospiridiobolus azoricus</i>	0.9 c	25 c	1.5 bc	4.1 c	43 b	21 a	4.0 a
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosum</i>	0.7 d	31 b	0.5 d	10 a	43 b	12 c	2.3 b
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2.1 a	25 b	2.1 b	2.5 d	49 a	15 b	3.0 b
<i>Rhodotorula graminis</i>	1.5 b	25 c	1.3 c	4.0 c	51 a	14 b	2.8 b



Article

Microbial Oil Production from Alkali Pre-Treated Giant Reed (*Arundo donax* L.) by Selected Fungi

Stefano Cianchetta ¹, Enrico Ceotto ² and Stefania Galletti ^{1,*}

¹ Research Centre for Agriculture and Environment, Council for Agricultural Research and Economics, Via di Corticella 133, 40128 Bologna, Italy; stefano.cianchetta@crea.gov.it

² Research Centre for Animal Production and Aquaculture, Council for Agricultural Research and Economics, Via Beccastecca 345, 41018 San Cesario sul Panaro, Italy; enrico.ceotto@crea.gov.it

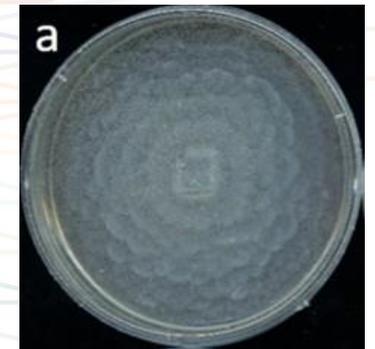
* Correspondence: stefania.galletti@crea.gov.it; Tel.: +39-051-631-6842

3 funghi oleaginosi

1 idrolizzato enzimatico (biomassa delignificata non lavata dopo pretrattamento termo-alcalino) vs. controllo (substrato semisintetico) in beute con concentrazione finale di carboidrati pari a 30 g/L e

3 livelli di azoto

Valutazione della resa in olio e della composizione acidica



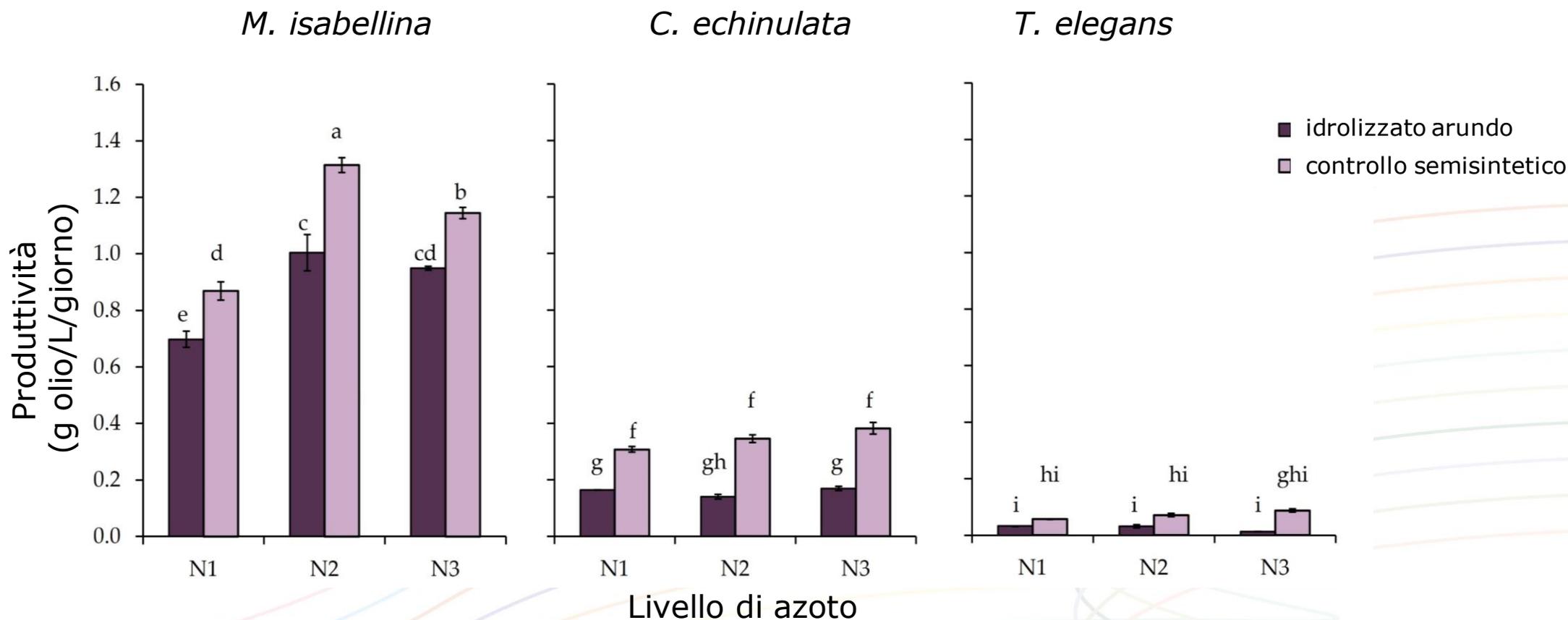
5. Risultati - Funghi (Rese)

Fungo	Medium ottimale (mg/L N)	Concentrazioni di lipidi nelle colture (g/L)	Contenuto cellulare di lipidi %	Rese di conversione rispetto ai carboidrati consumati %	Rese di conversione biomassa arundo %
<i>Thamnidium elegans</i>	N1 (140)	0.5 c	13.7 c	5.9 c	0.7 c
<i>Cunninghamella echinulata</i>	N1 (140)	2.3 b	40.9 b	11.8 b	3.7 b
<i>Mortierella isabellina</i>	N1 (140)	5.6 a	63.4 a	19.2 a	9.1 a

Nel medium ottimale (N1), *M. Isabellina* ha raggiunto :

- le concentrazioni di lipidi più alte nelle colture (5,6 g per litro)
- i contenuti cellulari di lipidi più elevati (63%)
- rese di conversione a olio più alte (19% rispetto ai carboidrati consumati e 9% rispetto alla biomassa secca iniziale)

5. Risultati - Funghi (Produttività)



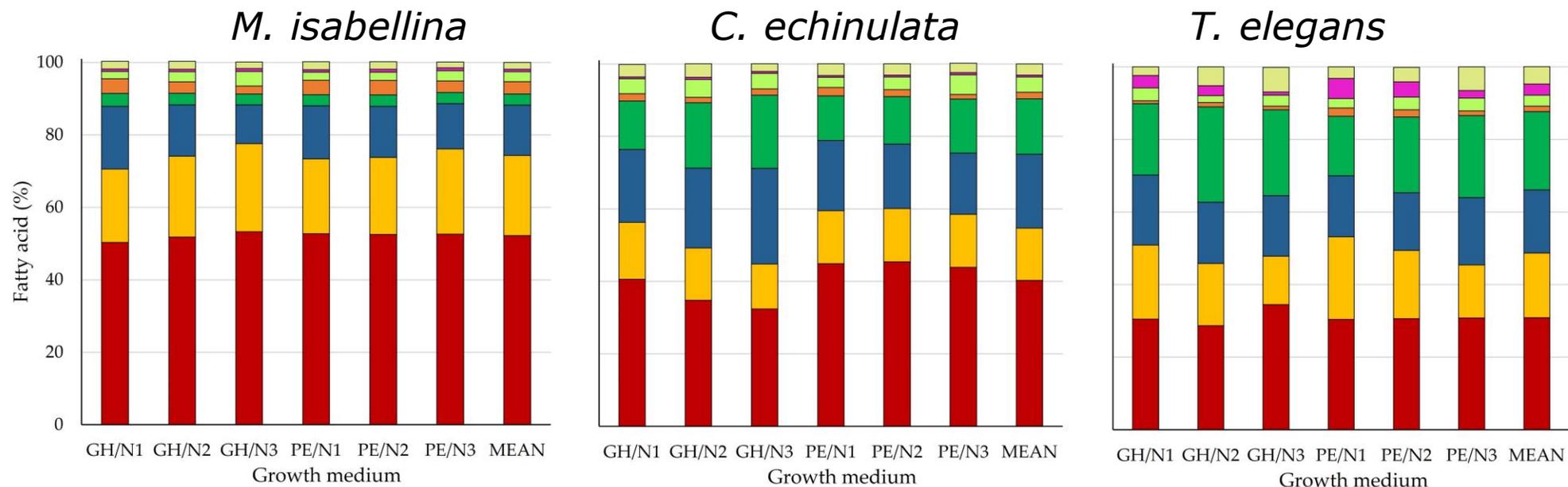
In tutte le condizioni testate (substrato/azoto), *M. isabellina* ha mostrato valori - superiori a *C. echinulata* e *T. elegans*, e confrontabili con i lieviti (1 g/L/giorno) - superiori a quanto riportato in letteratura per arundo (pretrattamento acido) e altre biomasse

5. Risultati - Funghi (Composizione oli)

Fungo	Medium ottimale (mg/L N)	Acido miristico %	Acido palmitico %	Acido palmitoleico %	Acido stearico %	Acido oleico %	Acido linoleico %	Acido linolenico %
<i>Thamnidium elegans</i>	N1 (140)	3.4 a	20.4 a	0.8 c	3.5 ab	30.5 c	19.3 abc	19.7 a
<i>Cunninghamella echinulata</i>	N1 (140)	0.5 b	15.7 b	2.0 b	4.1 ab	40.6 b	20.1 ab	13.4 b
<i>Mortierella isabellina</i>	N1 (140)	0.7 b	20.3 a	4.1 a	2.0 b	50.3 a	17.3 bcd	3.5 c

- Composizione acidica degli oli microbici da arundo simile a quella di un olio vegetale, più insaturo di quello dei lieviti, con predominanza di acido oleico (30-50%), palmitico (16-20%), linoleico (17-20%) seguiti da γ -linolenico (3-20%) e stearico (2-4%),
- *C. echinulata* e *T. elegans* mostrano un alto contenuto di γ -linolenico (13-20%), che invece è stato solo del 3% nelle colture di *M. isabellina*.

4. Risultati - Funghi (Composizione oli)



La composizione degli oli varia in primis a seconda dell'isolato e poi a seconda della composizione del substrato

5. Risultati - Funghi (Parametri biodiesel)

Fungo	Medium	IV	SV	DU	OS	LCSF	CFPP	HHV	D	KV	CN	C18:3
		g I ₂ /100 g	mg KOH/g	%	h	%	°C	MJ/kg	g/cm ³	mm ² /s	-	%
<i>M. isabellina</i>	N1	88	194	98	8.1	3.7	- 3.8	39.8	0.88	4.3	59	4
<i>C. echinulata</i>	N1	109	192	112	6.1	6.0	3.9	39.8	0.88	4.2	55	14
<i>T. elegans</i>	N1	113	195	111	5.6	6.1	7.2	39.7	0.88	4.1	53	20
U.S. ASTM D6751					>3					1.9-6.0	>47	
E.U. (EN 14214)		<120			>8				0.86-0.9	3.5-5	>51	<12

IV = iodine value; **SV** = saponification value; **DU** = degree of unsaturation; **OS** = oxidative stability; **LCSF** = long chain saturation factor; **CFPP** = cold filter plugging point; **HHV** = higher heating value; **D** = density; **KV** = kinematic viscosity; **CN** = cetane number; **C18:3** = γ and α -linolenic acids. ASTM D6751 and EN 14214 are the biodiesel fuels (B 100) standards for U.S. and E.U. respectively.

Solo l'olio di *M. isabellina* rispetta tutti gli standard EU (EN14214), più severi di US

In particolare osserviamo:

- buona fluidità a basse temperature (CFPP = -3.8 °C)
- buona combustibilità (CN=59, superiore ad altri oli vegetali)

La biomassa di canna comune opportunamente trasformata è idonea per la produzione di olio microbico con alte rese (fino al 10% della biomassa secca)

Questo risultato è stato raggiunto utilizzando:

- Pretrattamento alcalino (che preserva l'emicellulosa e riduce la presenza di inibitori)
- Idrolisi con enzimi ad alta attività specifica
- Dosaggio opportuno dell'azoto

Le rese più alte sono state ottenute con i lieviti *L. starkeyi*, *R. azoricus* e *C. oleaginosum* e con il fungo *M. isabellina* utilizzando i livelli di azoto ottimali per ciascuno (N 70, 200, 200 e 140 mg/L rispettivamente).

A seconda del microrganismo utilizzato, l'olio microbico potrà essere indirizzato all'industria per la produzione di **biodiesel** o di altri prodotti 'biobased' come i **biolubrificanti**, mentre i sottoprodotti del pretrattamento e della fermentazione potranno essere recuperati e valorizzati (**biogas**, **bioidrogeno**, **ammendanti**)

Considerata l'alta produttività di canna comune negli ambienti mediterranei anche in presenza di bassi input agronomici, questa specie lignocellulosica potrebbe dunque rappresentare una vantaggiosa fonte rinnovabile in un'ottica di bioraffineria



Cianchetta S., Bregoli, L., & Galletti, S. (2017). Microplate-Based Evaluation of the Sugar Yield from Giant Reed, Giant Miscanthus and Switchgrass after Mild Chemical Pre-Treatments and Hydrolysis with Tailored Trichoderma Enzymatic Blends. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 183(3), pp. 876-892.

Cianchetta S., Nota M., Polidori N., Galletti S. (2019). Alkali pre-treatment and enzymatic hydrolysis of Arundo donax for single cell oil production. **Environmental Engineering and Management Journal**.18(8), pp. 1693-1701.

Cianchetta, S., Polidori, N., Vasmarà, C., Ceotto, E., Marchetti, R., & Galletti, S. (2022). Single cell oil production from hydrolysates of alkali pre-treated giant reed: High biomass-to-lipid yields with selected yeasts. **Industrial Crops and Products**, 178, 114596.

Cianchetta, S., Ceotto, E., & Galletti, S. (2023). Microbial Oil Production from Alkali Pre-Treated Giant Reed (Arundo donax L.) by Selected Fungi. **Energies**, 16(14), 5398.

SU TEMI COLLEGATI AL TASK

Vasmarà C, Cianchetta S, Marchetti R, Galletti S. (2017). Biogas production from wheat straw pre-treated with hydrolytic enzymes or sodium hydroxide **Environmental Engineering and Management Journal** 16 (8): 1827-1835

Vasmarà, C., Cianchetta, S., Marchetti, R., Ceotto, E., & Galletti, S. (2021). Potassium Hydroxide Pre-Treatment Enhances Methane Yield from Giant Reed (Arundo donax L.). **Energies**, 14(3), 630.

Ceotto, E., Vasmarà, C., Marchetti, R., Cianchetta, S., & Galletti, S. (2021). Biomass and methane yield of giant reed (Arundo donax L.) as affected by single and double annual harvest. **GCB Bioenergy**, 13(3), 393-407.

Galletti, S., Cianchetta, S., Righini, H., Roberti, R. A Lignin-Rich Extract of Giant Reed (Arundo donax L.) as a Possible Tool to Manage Soilborne Pathogens in Horticulture: A Preliminary Study on a Model Pathosystem. **Horticulturae**, 2022, 8(7), 589

Vasmarà, C., Cianchetta, S., Marchetti, R., Ceotto, E., Galletti, S. Hydrogen Production from Enzymatic Hydrolysates of Alkali Pre-Treated Giant Reed (Arundo donax L.). **Energies**, 2022, 15(13), 4876

Vasmarà, C., Galletti, S., Cianchetta, S., & Ceotto, E. (2023). Advancements in Giant Reed (Arundo donax L.) Biomass Pre-Treatments for Biogas Production: A Review. **Energies**, 16(2), 949.

Vasmarà, C., Cianchetta, S., Marchetti, R., Ceotto, E., & Galletti, S. (2023). Co-digestion of pig slurry and KOH pre-treated giant reed (Arundo donax L.) enhances methane yield and digestate characteristics. **Environmental Technology & Innovation**, 31, 103204.

Stefano Cianchetta, CREA-AA

Enrico Ceotto, CREA-AA/ZA

Laura Bardi, CREA IT

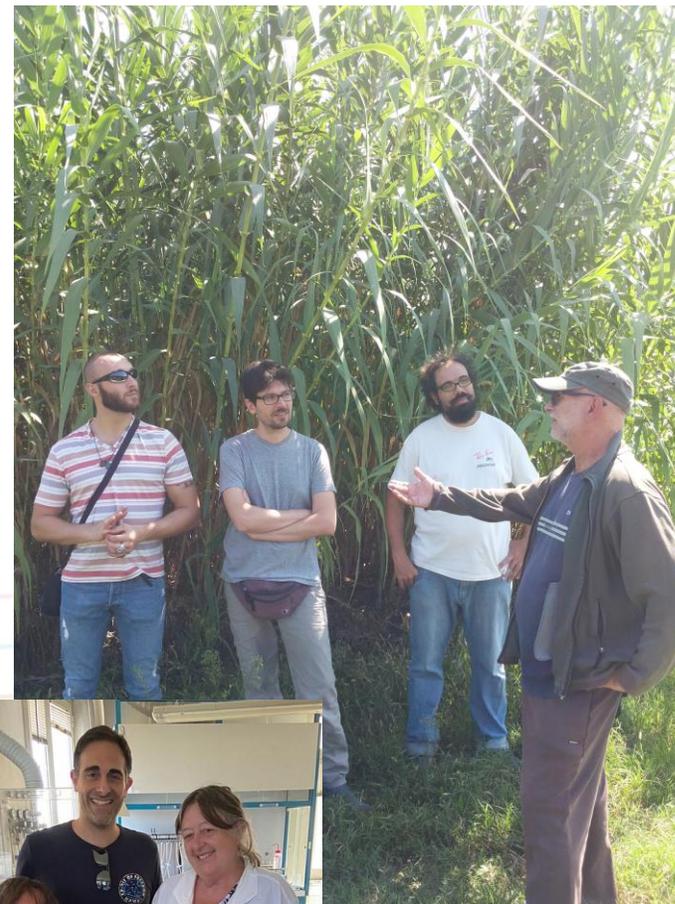
Ciro Vasmara, Rosa Marchetti, Anna Orsi, CREA-ZA

Lorena Malaguti, CREA CI

Prof. Alejandro Hochkoeppler, FABIT-UNIBO

Prof.ssa Roberta Roberti, DISTAL-UNIBO

Monica Nota, Luca Bregoli, e Nakia Polidori
(studenti)



Grazie per l'attenzione!