

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

4.1.1 Breve stato dell'arte e riferimenti alla valenza di innovazione scientifica, economica e sociale dell'azione (max 1 pagina)

Il piano strategico del MiPAAF per l'innovazione e la ricerca nel settore agricolo, alimentare e forestale 2014 -2020 prevede lo sviluppo di tecnologie per l'ottenimento di biocarburanti di nuova generazione. Tra questi rientra il biodiesel di II generazione ottenibile da lignocellulosa, per fermentazione microbica degli idrolizzati. La ricerca in questo settore è in forte crescita anche in considerazione degli obiettivi dell'UE ed in Italia è in fase di ricerca pre-industriale presso ENI. L'interesse nasce dal fatto che la produzione di biodiesel di I generazione, ottenuto per transesterificazione alcalina dei trigliceridi di origine vegetale o animale, comporta alcune criticità, tra cui difficoltà di approvvigionamento su grande scala e conflitto "food vs energy", nel caso di utilizzo di oli alimentari. In alternativa è stato proposto l'uso di olio microbico o "single cell oil" (SCO) ottenibile da microrganismi oleaginosi (MO) (lieviti, funghi, microalghe), che accumulano lipidi (15-70% della biomassa) con composizione simile a quella degli oli vegetali. I vantaggi consistono nella brevità del ciclo produttivo, minore impatto della stagionalità e del clima, possibilità di portare facilmente su scala industriale il processo, alta efficienza, annullamento del conflitto "food vs energy". L'accumulo di lipidi nei MO avviene tipicamente durante la crescita metabolica secondaria, in condizioni limitanti per l'azoto e in presenza di un'elevata quantità di zuccheri¹. I MO sono inoltre in grado di utilizzare fonti di carbonio di diversa natura chimica (glicerolo, esosi, pentosi) provenienti da scarti agroindustriali o da residui agricoli lignocellulosici, previamente idrolizzati a zuccheri semplici, analogamente alla filiera del bioetanolo di II generazione. L'ottenimento di biodiesel da lignocellulosa richiede 1) un pretrattamento per esporre l'olocellulosa; 2) la conversione dell'olocellulosa in zuccheri fermentescibili; 3) la conversione degli zuccheri in lipidi da parte di microrganismi oleaginosi (MO); 4) l'estrazione dell'olio e la trasformazione in biodiesel. Il pretrattamento ha un forte impatto sulla produzione di inibitori delle fasi successive, inoltre il rapporto C/N nel substrato di crescita influenza la capacità dei MO di accumulare lipidi, per cui potrebbe risultare vantaggioso utilizzare substrati molto poveri di azoto (Papanikolaou e Aggelis, 2011) e di inibitori. Ad esempio *Arundo donax* raccolta in autunno-inverno potrebbe rappresentare una matrice interessante per l'alta produttività e perché povera di azoto, traslocato in questo periodo nei rizomi (Nassi o Di Nasso et al., 2011). Ad oggi solo poche ricerche hanno riguardato l'ottenimento di SCO da lignocellulosa (Huang et al., 2012; Yousuf, 2012; Huang et al., 2013). Inoltre in letteratura è prevalentemente riportata la produzione di SCO da idrolizzati ottenuti con acidi concentrati, che comportano su scala industriale problemi di corrosione e formazione di inibitori, con necessità di detossificazione della biomassa prima della fermentazione (Huang et al., 2012; Di girolamo et al., 2013). Un pretrattamento opportuno di biomasse lignocellulosiche seguito da idrolisi di tipo enzimatico, anziché chimico, potrebbe risolvere le criticità sopra descritte.

Bibliografia

- Di Girolamo G, Grigatti M, Barbanti L, Angelidaki I, 2013. Effects of hydrothermal pre-treatments on giant reed (*Arundo donax*) methane yield. *Bioresour Technol*, 147, 152-159.
- Huang C, Chen X, Xiong L, Ma L, 2012. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corn cobs. *Bioresour Technol*, 110, 711-714.
- Huang C, Chen X, Xiong L, Chen X, Ma L, Chen Y, 2013. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnol Adv*, 31, 129-139.

- Nasso Di Nasso N, Roncucci N, Triana F, Tozzini C, Bonari E, 2011. Seasonal nutrient dynamics and biomass quality of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus x giganteus* Greef et Deuter) as energy crops. *Italian J Agron*, 6, 152-158.
- Papanikolaou S, Aggelis G, 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci. Technol*, 113, 1052-1073.
- Yousuf A. Biodiesel from lignocellulosic biomass - prospects and challenges (2012). *Waste Manag*, 32, 2061-2067.

4.1.2 Profilo ed esperienza dei proponenti e partecipanti in relazione all'attività (riportare anche max 5 pubblicazioni in totale) (max 1 pagina)

Task leader:

Stefania Galletti - UO CREA-CIN, è ricercatrice III livello nei ruoli del CREA dal 1998. Profilo: Laurea con lode in Scienze agrarie, indirizzo produzione vegetale (Bologna, 1989). Abilitazione all'esercizio della libera professione di dottore agronomo (Bologna, 1990). Dottorato di Ricerca in "Scienza e Tecnologia delle sementi" (Viterbo, 1996). Diploma di Master in Biostatistica (Bologna, 2006). Esperienza dei proponenti e partecipanti in relazione all'attività: Ha sviluppato nel corso degli ultimi anni competenze relative all'utilizzo di enzimi e microrganismi fungini per usi agro-energetici (progetti MiPAAF "Bioenergie" e "Filiera innovative per la produzione di biocarburanti di seconda generazione da residui agricoli ed agroindustriali e colture da biomassa - BIOSEGEN"). Le attività hanno riguardato la messa a punto di biotecnologie per la produzione ed il saggio in microscala di enzimi cellulolitici fungini, e per l'idrolisi di materiali lignocellulosici (panico, arundo, miscanto). Inoltre è stato indagato il pretrattamento biologico di biomasse lignocellulosiche per mezzo di funghi lignicoli al fine di migliorarne la digestibilità enzimatica. Tali competenze saranno impiegate per studiare pretrattamenti e idrolisi delle biomasse per la produzione di oli microbici per la filiera del biodiesel da lignocellulosa. Il Centro dispone inoltre di laboratori e strumentazioni appropriate per allevare, conservare e trattare microrganismi e per effettuare trattamenti biologici, chimici, fisici, idrolisi e saggi enzimatici e di saccarificazione sui materiali lignocellulosici e relative analisi biochimiche. Inoltre sono presenti strumentazioni e competenze per l'estrazione e l'analisi dei lipidi.

Partecipanti:

Enrico Ceotto - UO CREA-CIN, (vedi Paragrafo 1.8, pag. 18).

Pubblicazioni

- Cianchetta S, Galletti S, Burzi PL, Cerato C, 2010. A Novel Microplate-Based Screening Strategy to Assess the Cellulolytic Potential of Trichoderma Strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 461-468.
- Cianchetta S, Galletti S, Bregoli L, Burzi PL, Cerato C, 2012. Microplate-based evaluation of different fungal enzyme preparations for the hydrolysis of pretreated lignocellulosic grasses. *Proc XIX ISAF*, pp 445-446.
- Cianchetta S, Galletti S, Burzi PL, Cerato C, 2012. Hydrolytic potential of Trichoderma sp. strains evaluated by microplate-based screening followed by switchgrass saccharification. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 304-310.
- Cianchetta S, Burzi PL, Galletti S, 2013. Metodo per la determinazione del profilo di temperatura di attività enzimatiche in microscala: il caso dell'attività xilanasi fungina. *Micologia Italiana XLII*, n.1-2-3:33-39.
- Cianchetta S, Di Maggio B, Vasmara C, Marchetti R, Burzi PL, Galletti S, 2014. Funghi lignicoli per il trattamento di biomasse lignocellulosiche a fini energetici. *Micologia Italiana, XLIII*, n. 1-2-3: 99-107.

4.1.3 Obiettivi della task

L'obiettivo generale è verificare la possibilità di produrre SCO da biomasse lignocellulosiche opportunamente pretrattate e idrolizzate.

Gli obiettivi specifici riguardano 1) la messa a punto di protocolli di pretrattamento e idrolisi di biomasse lignocellulosiche, per l'ottenimento di idrolizzati a basso tenore di azoto e di inibitori; 2) la verifica dell'idoneità degli idrolizzati per la produzione di SCO attraverso valutazione delle rese in olio con MO selezionati (funghi e lieviti).

4.1.4 Descrizione delle attività che saranno sviluppate nella task

La task prevede le seguenti linee di attività:

Linea 1: Saranno realizzati pretrattamenti a $t^{\circ} < 120$ °C con calce, o etanolo/acido acetico, di biomasse triturate derivanti dal progetto, in particolare *Arundo* invernale, che dovrebbe presentare un rapporto C/N favorevole alla produzione di SCO.

Linea 2: Le biomasse così pretrattate saranno sottoposte a saccarificazione con enzimi ad alta attività specifica (basso input azoto), con ottimizzazione del mix enzimatico (cellulasi, xilanasi) e del pH di reazione, in modo da ottenere una matrice zuccherina idonea alla produzione di SCO. Gli zuccheri prodotti saranno quantificati per via spettrofotometrica.

Linea 3: Infine gli idrolizzati saranno convertiti in lipidi tramite fermentazione con MO selezionati (ad es. *T. fermentans*, *M. isabellina*). L'olio microbico sarà estratto e quantificato per valutare le rese. Gli esperimenti saranno condotti in confronto ad un substrato zuccherino standard.

Linea 4: I dati saranno elaborati e divulgati attraverso partecipazione a convegni e pubblicazioni scientifiche.

La fornitura e caratterizzazione delle biomasse lignocellulosiche (*Arundo*) deriverà dall'attività prevista nella task 2.B.1 (Ceotto-CREA-CIN).

Per la realizzazione delle attività si prevede l'acquisto di attrezzature tecniche (biotrituratore) per la preparazione dei campioni e informatiche (pc) per la gestione e analisi dei dati sperimentali.

4.1.5 Descrizione degli output della task (deliverable)

D.4.1.1: Protocolli per il pretrattamento di biomasse lignocellulosiche idonei alla filiera del biodiesel da lignocellulosa.

D.4.1.2: Protocolli per l'ottenimento di idrolizzati zuccherini da biomasse lignocellulosiche idonei alla fermentazione con MO oleaginosi.

D.4.1.3: Protocolli per l'ottenimento di lipidi dai MO selezionati a partire dagli idrolizzati prodotti.

D.4.1.4: Una o più pubblicazioni scientifiche relative ai risultati ottenuti.

4.1.6. Articolazione temporale delle attività e dei deliverable previsti nella task (Gantt)

		Attività	Deliverable
Quadrimestri	1	Linea 1	
	2	Linea 1	
	3	Linea 1	
	4	Linea 1; Linea 2	D.4.1.1
	5	Linea 2	
	6	Linea 2	

	7	Linea 2	
	8	Linea 2; Linea 3	D.4.1.2
	9	Linea 3	
	10	Linea 3	
	11	Linea 3; Linea 4	
	12	Linea3; Linea 4	D.4.1.3
	13	Linea 4	
	14	Linea 4	
	15	Linea 4	D.4.1.4

4.1.7 Risultati attesi, ricadute e benefici, ostacoli prevedibili ed azioni correttive

Con l'azione ci si attende di arrivare a definire protocolli di pretrattamento e idrolisi di biomasse lignocellulosiche, per l'ottenimento di idrolizzati a basso tenore di azoto e di inibitori, idonei alla produzione di SCO. Saranno individuati anche i MO in grado di fornire le rese migliori dalle biomasse così idrolizzate.

La ricaduta dell'azione consiste nell'ottenimento di un avanzamento della ricerca nel settore del biodiesel da lignocellulosa, ancora in fase pre-industriale.

Gli ostacoli alla realizzazione dell'azione potrebbero consistere nel non ottenimento di bassi tenori di azoto negli idrolizzati, cui si potrebbe ovviare tramite utilizzo di biomasse a basso tenore di azoto in origine (es. arundo invernale), oppure tramite aggiunta di substrati a basso tenore di azoto, scelta di enzimi con maggiore attività specifica, modifiche dei protocolli di pre-trattamento. Nel caso dell'ottenimento di rese in olio non soddisfacenti, si potrà intervenire modificando le condizioni di crescita dei microrganismi, scegliendo altri microrganismi, riducendo eventuali inibitori fenolici mediante laccasi fungine o modificando i protocolli di pretrattamento.

4.1.8 Piano di sfruttamento e divulgazione dei risultati

I risultati saranno oggetto di divulgazione tramite presentazione a convegni di settore e pubblicazioni scientifiche.

4.1.9 Tabelle delle richieste finanziarie per singola azione

Tabella 4.1.9.1: Attrezzature tecnico-scientifiche di cui si richiede il finanziamento.

Tabella 4.1.9.2: Richiesta complessiva di finanziamento per la task.