CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ

BIOCHIMICA APPLICATA (6 CFU)

LEZIONE FINALE 2022

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Stanza 520, V piano lato NORD
Tel. 081 547 6625
E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

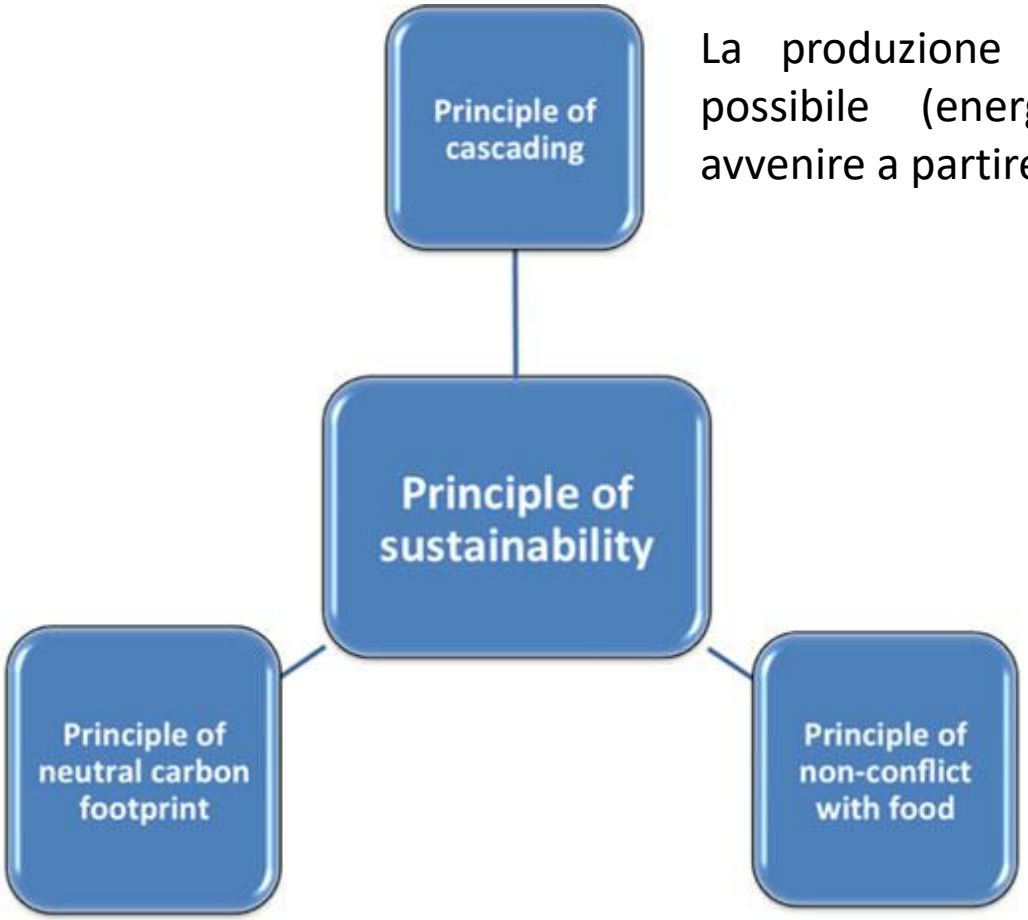
SOSTENIBILITÀ

"Nelle scienze ambientali ed economiche, condizione di uno sviluppo in grado di assicurare il soddisfacimento dei bisogni della generazione presente senza compromettere la possibilità delle generazioni future di realizzare i propri.

Il concetto di sostenibilità è stato introdotto nel corso della prima conferenza ONU sull'ambiente nel 1972, anche se soltanto nel 1987, con la pubblicazione del cosiddetto rapporto Brundtland, venne definito con chiarezza l'obiettivo dello sviluppo sostenibile che, dopo la conferenza ONU su ambiente e sviluppo del 1992, è divenuto il nuovo paradigma dello sviluppo stesso. "

fonte: Treccani

SOSTENIBILITÀ



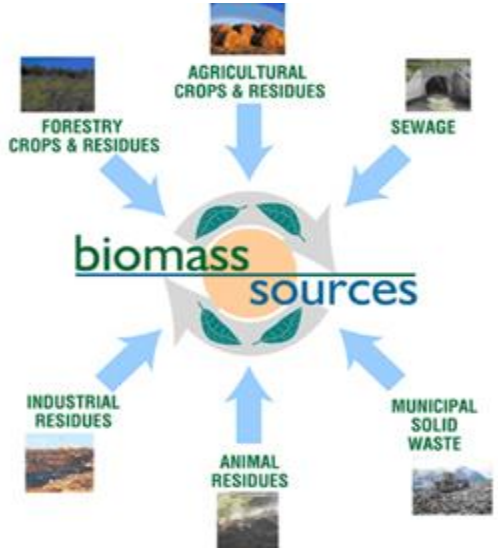
La produzione di quanti più beni è possibile (energia, bioprodotti) deve avvenire a partire dalla biomassa

La produzione di energia e bioprodotti a partire da biomassa, non deve entrare in conflitto con la catena alimentare

La produzione di energia e bioprodotti non deve comportare aumento dell'impronta di carbonio (la quantità di emissioni di gas a effetto serra generate nell'intero ciclo di vita di un prodotto o servizio).

BIOMASSA

According the Directive 2001/77/EC of the European Community biomass is "the biodegradable fraction of products, waste and residues from agriculture (including vegetal and animal substances), forestry and related industries, as well as the biodegradable fraction of industrial and municipal waste"



Source: http://www.ecomena.org/biomass-resources-in-middle-east/

Residual biomass: yearly production in Italy

BIOMASS	QUANTITY
Animal residues	150.000.000 t/y
Agro-industrial wastes	12.000.000 t/y
Slaughter wastes	1.000.000 t/y
Sewage sludges	3.000.000 t/y
Municipal wastes (organic fraction)	9.000.000 t/y
Forestry and crop residues	10.000.000 t/y

(source: C.R.P.A., Animal Production Research Centre, Italy)

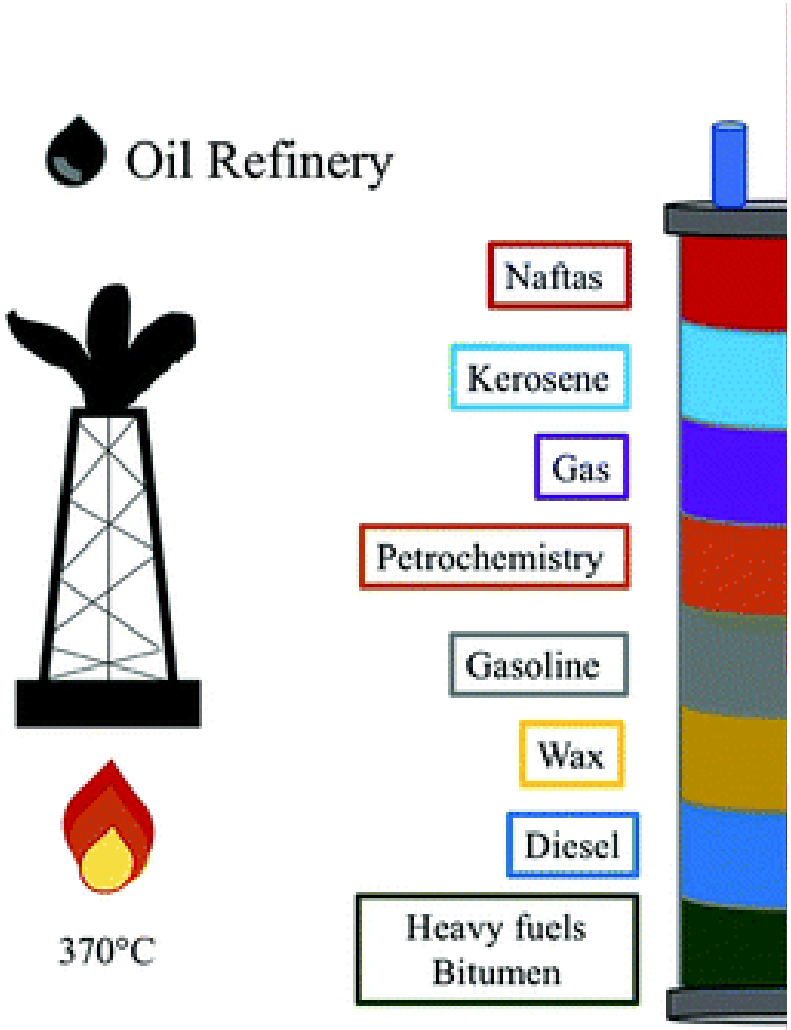
Agro-industry residual biomass in Italy: yearly amounts

Industry	Biomass available (thousand tons/year)	Actual re-use strategy
Wood transformation	4.400	Energy production
Wood recycling	8.000	Energy production
Paper Industry	270	Energy production
Food Oil	450	Energy, composting
Winery	450	Energy, composting
Canning and market packaging	340	Energy, composting
Rice transformation	330	Energy, composting

(source: Itabia)

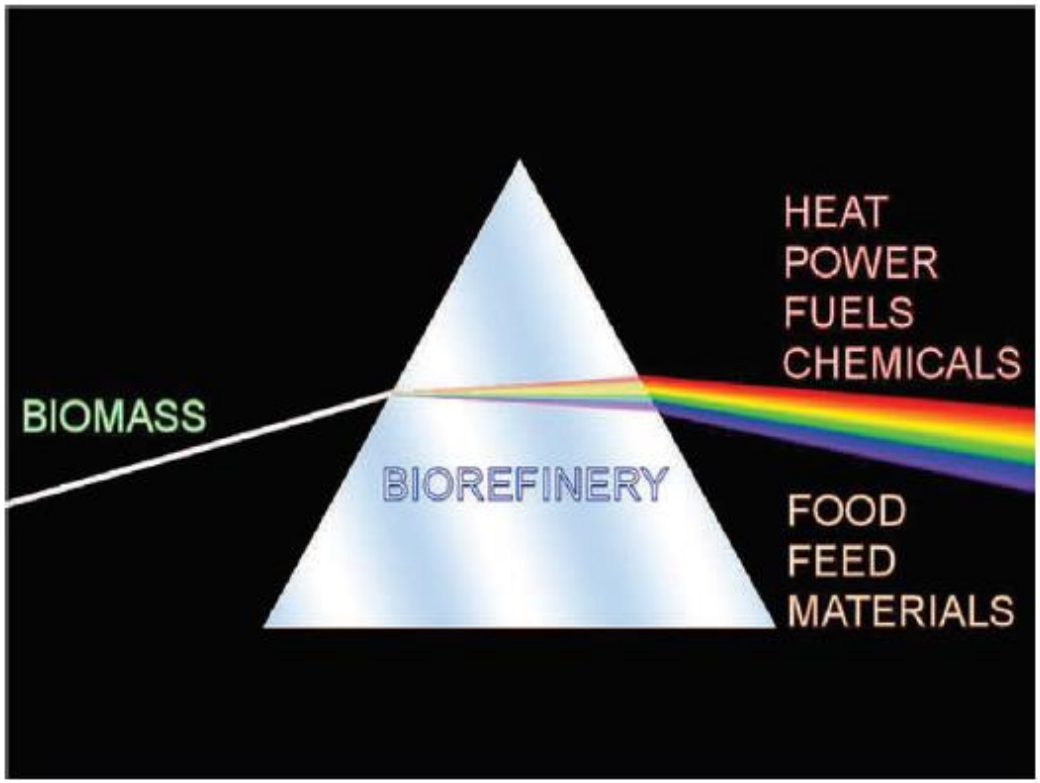
ITABIA
Italian Biomass Association

RAFFINERIA


Oil Refinery
Naftas
Kerosene
Gas
Petrochemistry
Gasoline
Wax
Diesel
Heavy fuels
Bitumen
370°C

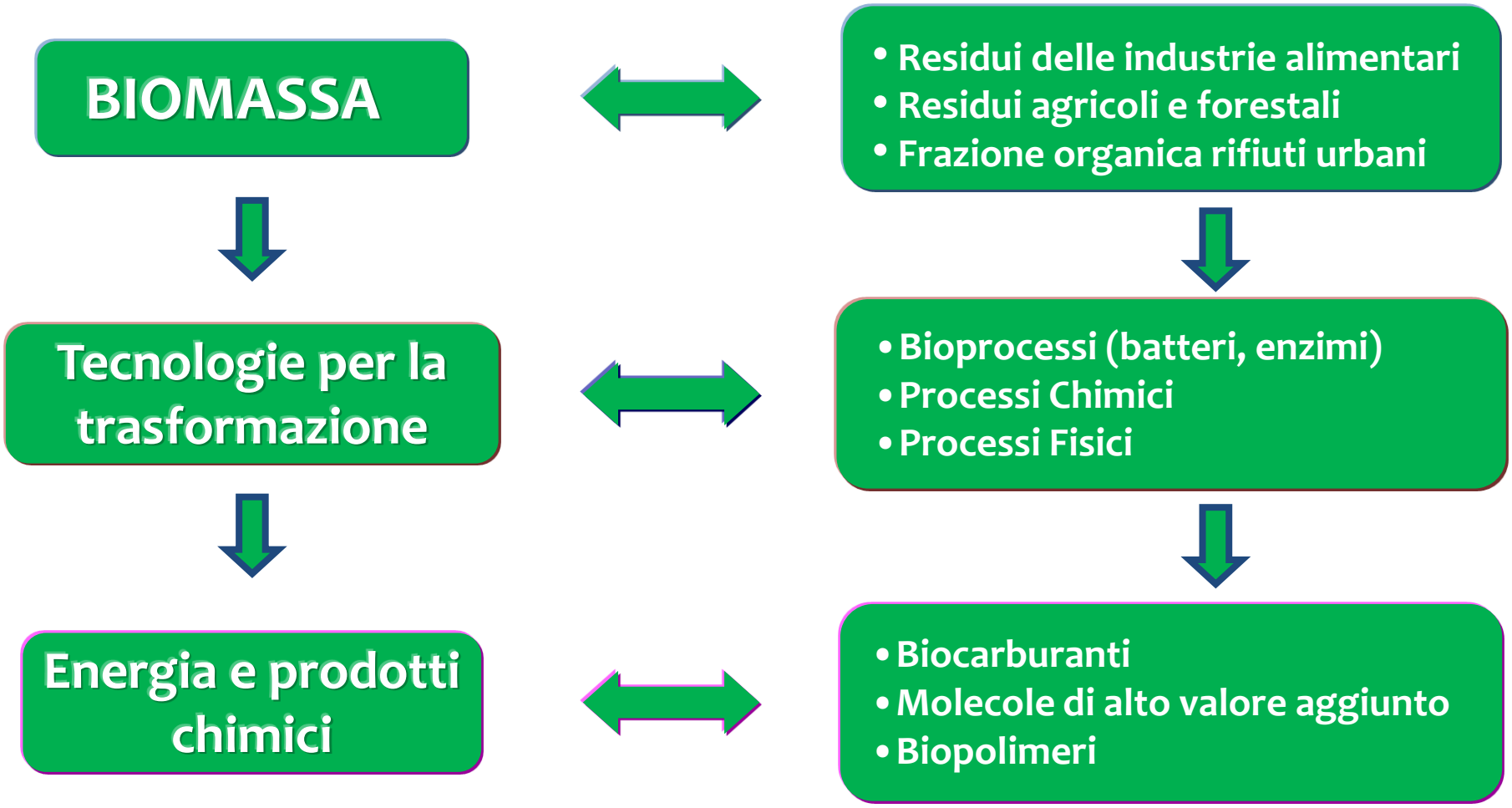
La BIORAFFINERIA

Biorefinery is the sustainable processing of biomass into a spectrum of marketable products and energy.



Fonte: IEA Bioenergy Task 42 (https://task42.ieabioenergy.com/)

BIORAFFINERIA



Fonte: Kamm, B.; Kamm, M. (2004). Principles of Biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (AMB), 64: 137-145.

Enzimi e biomassa

- Gli enzimi consentono di realizzare la conversione di diversi tipi di biomassa in un ampio spettro di prodotti
- Processi industriali sostenibili si basano su biomasse residuali
- L'uso degli enzimi per la bioconversione di biomasse residuali può giocare un ruolo centrale nel sistema della bioraffineria

Enzimi e biomassa

L'esempio di

1. Enzimi amilasi
2. Enzimi cellulasi

CLASSIFICAZIONE DEGLI ENZIMI SULLA BASE DELLA REAZIONE CATALIZZATA

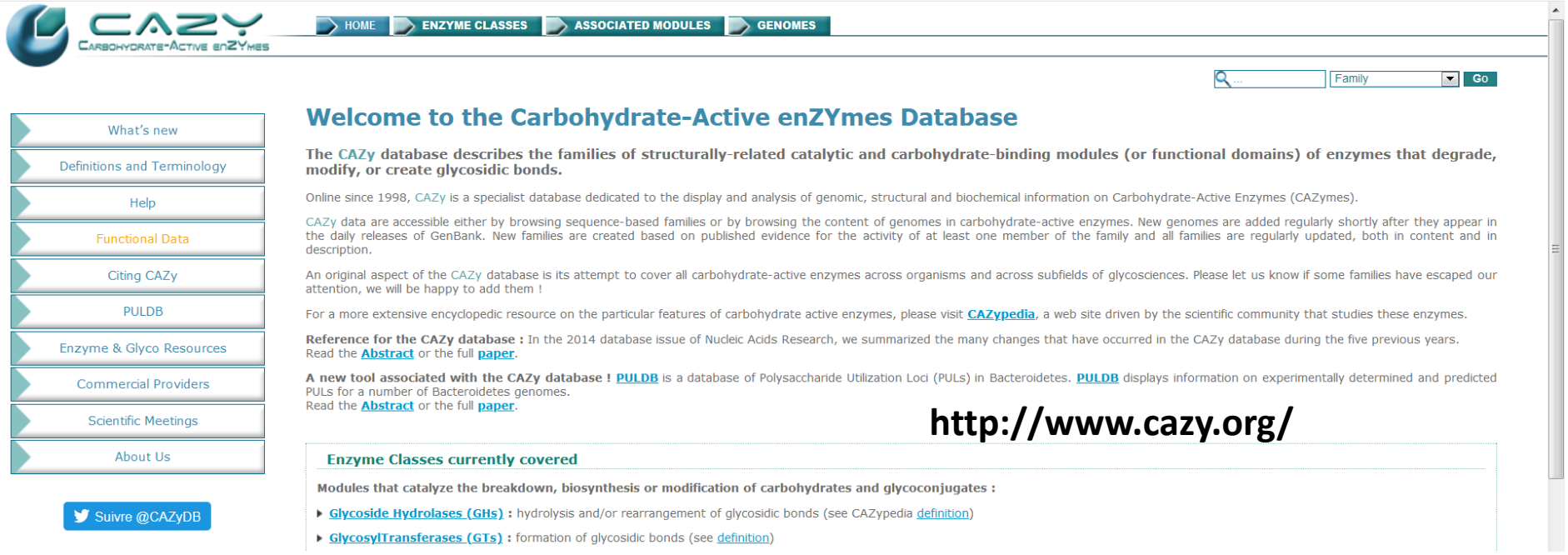
1. Ossidoreduttasi	**Trasferimento di elettroni (ioni idruro H^- , atomi di idrogeno)**
2. Trasferasi	**Trasferimento di gruppi funzionali da molecole che fungono da donatore ad altre che fungono da accettore**
3. Idrolasi	**Idrolisi: aggiunta di acqua ad un legame con contestuale rottura**
4. Liasi	**Addizione di gruppi a legami doppi o formazione di legami doppi per rimozione di gruppi (rottura di legami C-C, C-O, C-N ed altri con modalità differenti dall'idrolisi o ossidazione)**
5. Isomerasi	**Isomerizzazione cis-trans, cheto-enolica, aldoso-chetoso (isomerasi). Epimerizzazione (epimerasi e racemasi).**
6. Ligasi	**Formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N mediante condensazione accoppiata alla scissione di ATP**

CLASSIFICAZIONE DEGLI ENZIMI SULLA BASE DELLA REAZIONE CATALIZZATA

3. Idrolasi — **Idrolisi: aggiunta di acqua ad un legame con contestuale rottura**

Glicoside Idrolasi — **Enzimi che catalizzano l'idrolisi di legami glicosidici**

Classificate nel database CAZy: Carbohydrate Active enZymes



Enzimi e biomassa: le amilasi

CLASSIFICAZIONE DELLE GLICOSIDE IDROLASI

- **Sequenza aminoacidica**

Il database CAZy individua famiglie (circa 168) di moduli catalitici e domini funzionali strutturalmente relazionati degli enzimi che degradano, modificano o creano legami glicosidici.

[Henrissat B (1991) Biochem. J. 280:309-316; Henrissat B, Bairoch A (1993) Biochem. J. 293:781-788; Henrissat B, Bairoch A (1996) Biochem. J. 316:695-696 ; Davies G, Henrissat B (1995) Structure 3:853-859]

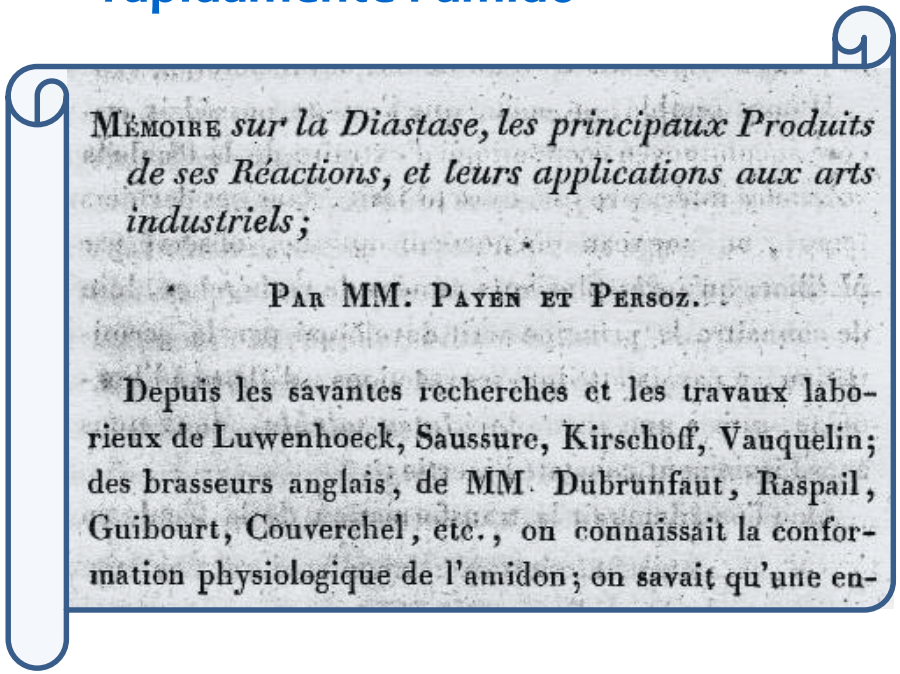
http://www.cazy.org

1. Enzimi amilasi

Storia

•1811: K.S. Kirchoff, chimico e direttore della Farmacia Imperiale a San Pietroburgo, evidenzia l'azione amilasica di estratti di malto

•1833: A. Payen e J.F. Persoz isolano la “diastasi” (dal greco διαστασις, "separazione") dal malto trattandone l'estratto con alcool ed ottengono un precipitato amorfo, bianco e solubile in acqua, in grado di liquefare rapidamente l'amido



MÉMOIRE *sur la Diastase, les principaux Produits de ses Réactions, et leurs applications aux arts industriels;*

PAR MM. PAYEN ET PERSOZ.

Depuis les savantes recherches et les travaux laborieux de Luwenhoeck, Saussure, Kirschoff, Vauquelin; des brasseurs anglais, de MM. Dubrunfaut, Raspail, Guibourt, Couverchel, etc., on connaissait la conformation physiologique de l'amidon; on savait qu'une en-

Payen et Persoz, 1833
Mémoire sur la Diastase, les principaux Produits de ses Réactions, et leurs applications aux arts industriels.
Annales de Chimie et de Physique, 2me série 53, pp. 73-92.

Enzimi e biomassa: le amilasi

- 1894: J. Takamine isola da *Aspergillus oryzae* un'amilasi in seguito commercializzata dalla Parke-Davis Company (Detroit, Michigan) con il nome "Taka-diastase" come adiuvante farmaceutico nel trattamento di disordini alimentari (dispepsia)

- 1907: utilizzo di amilasi batterica da *Bacillus subtilis* nel campo del "desizing" o sbozzimatura dei tessuti

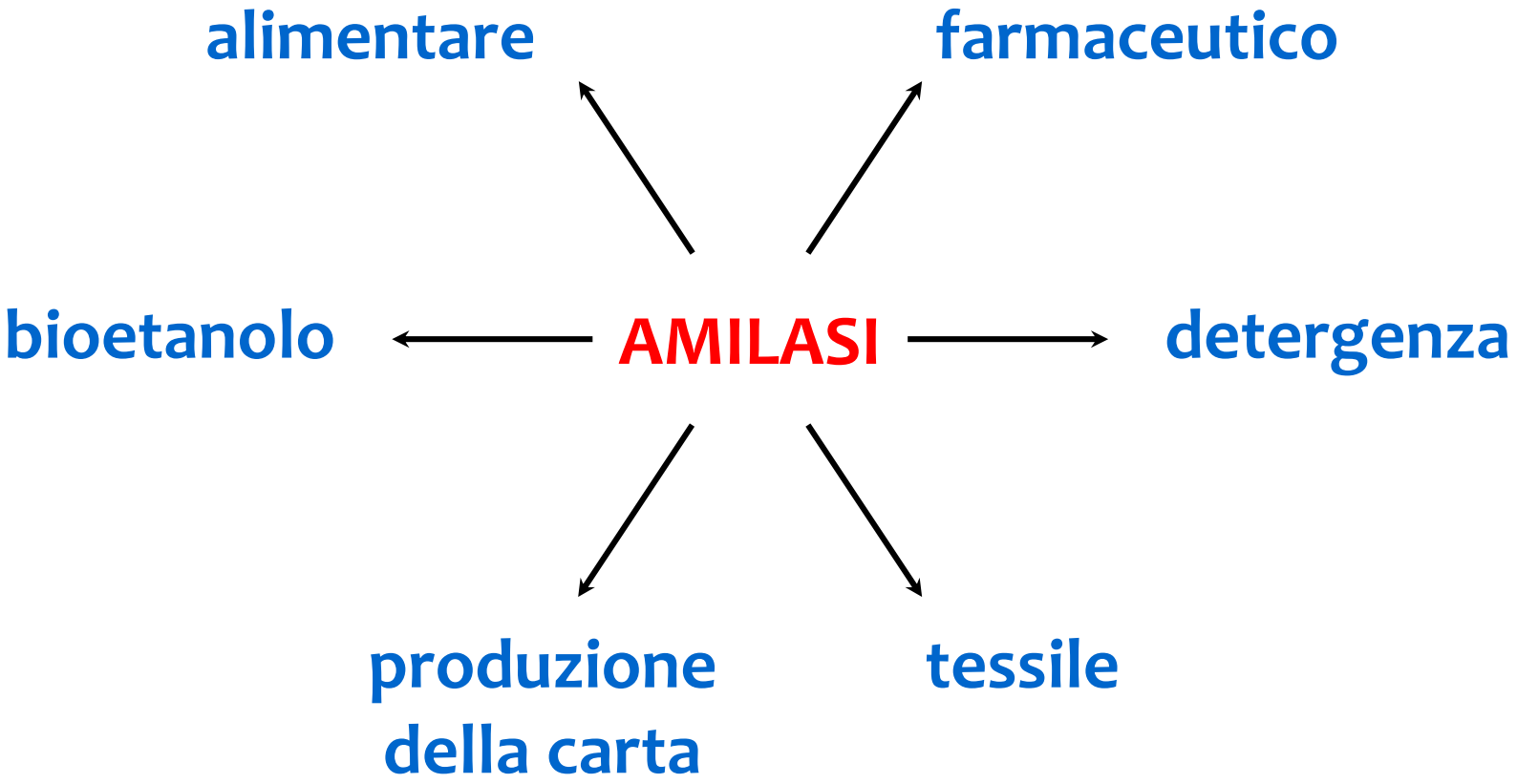
- 1930: E. Ohlsson propone la classificazione degli enzimi amilolitici in α- e β-amilasi in base al tipo di zucchero anomerico prodotto dalla reazione enzimatica

- 1970-80: primi esempi di applicazione di amilasi nella produzione alimentare

- Oggi ……

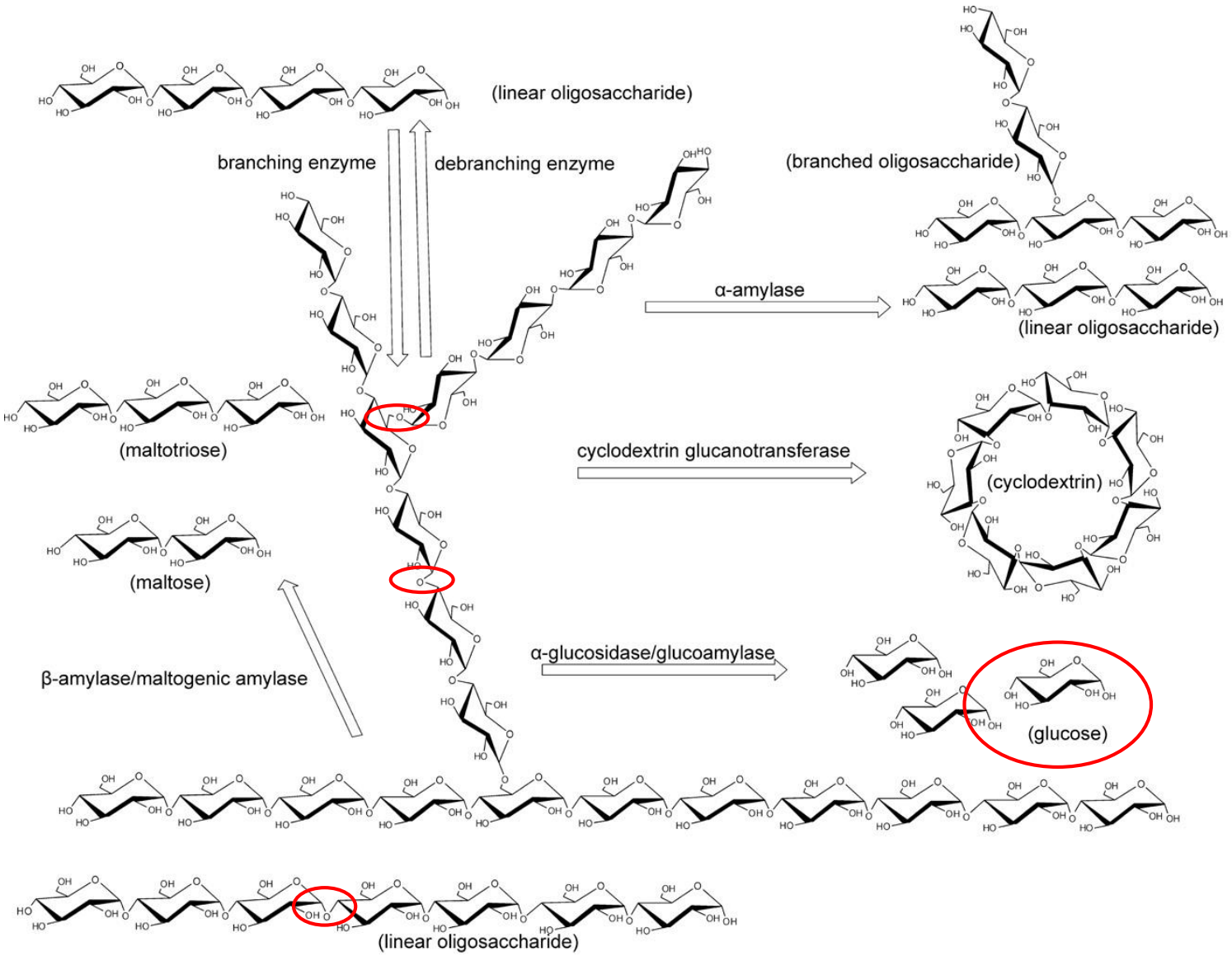
Enzimi e biomassa: le amilasi

- Oggi ……



Enzimi e biomassa: le amilasi

gruppo di enzimi in grado di trasformare l'amido



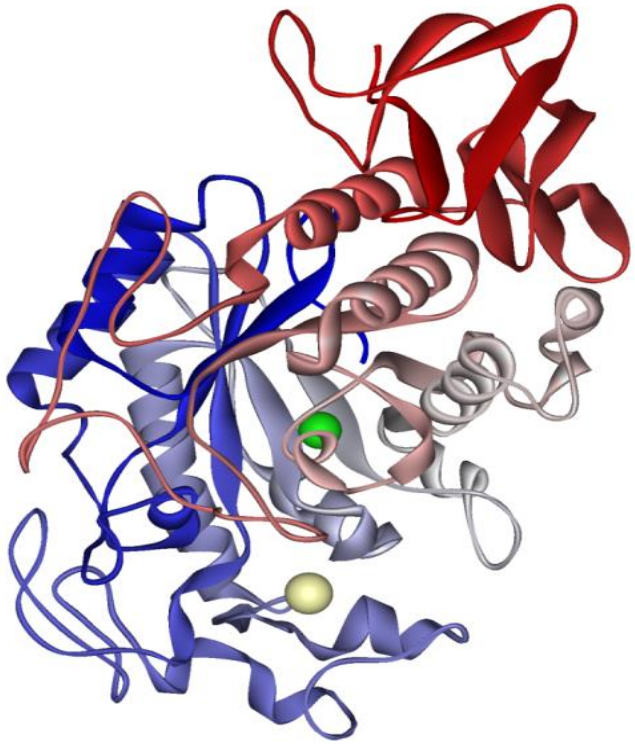
Enzimi e biomassa: le amilasi

Distribuzione naturale

animali

uomo

- *pancreas*
- *ghiandole salivari*
- *fegato*
- *intestino tenue*
- *reni*
- *ovaio*



Amilasi salivare (ptialina)

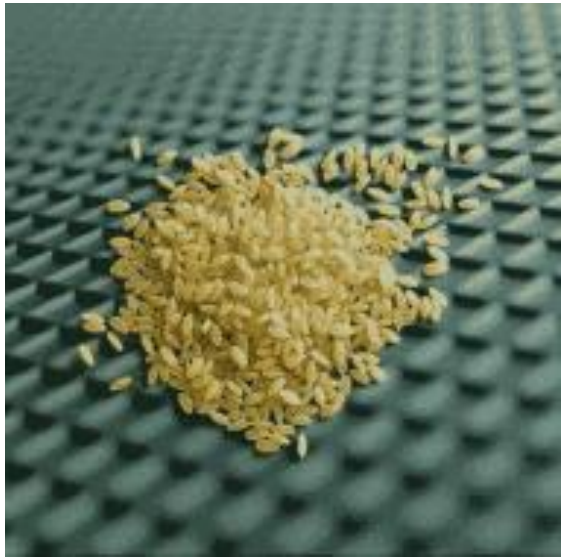
Enzimi e biomassa: le amilasi

Distribuzione naturale

piante

orzo

grano



riso

Enzimi e biomassa: le amilasi

Distribuzione naturale

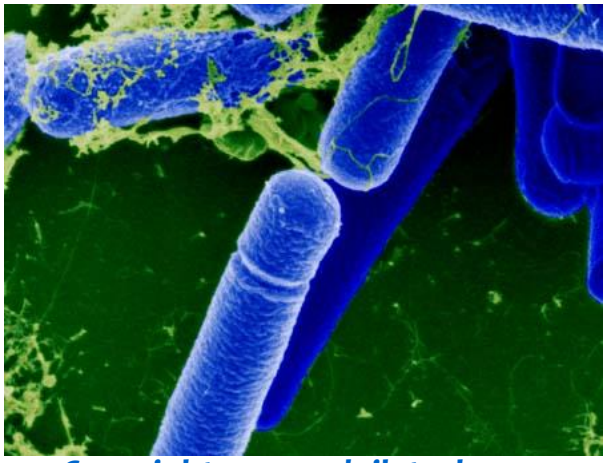
microorganismi

Lieviti

Batteri

Funghi

Bacillus subtilis



Copyright : www.dailytech.com

Aspergillus oryzae

Copyright: www.foodprocessing-technology.com

Enzimi e biomassa: le amilasi

CLASSIFICAZIONE DELLE AMILASI

- **Sequenza aminoacidica**

Il database CAZy individua famiglie di moduli catalitici e domini funzionali strutturalmente relazionati degli enzimi che degradano, modificano o creano legami glicosidici

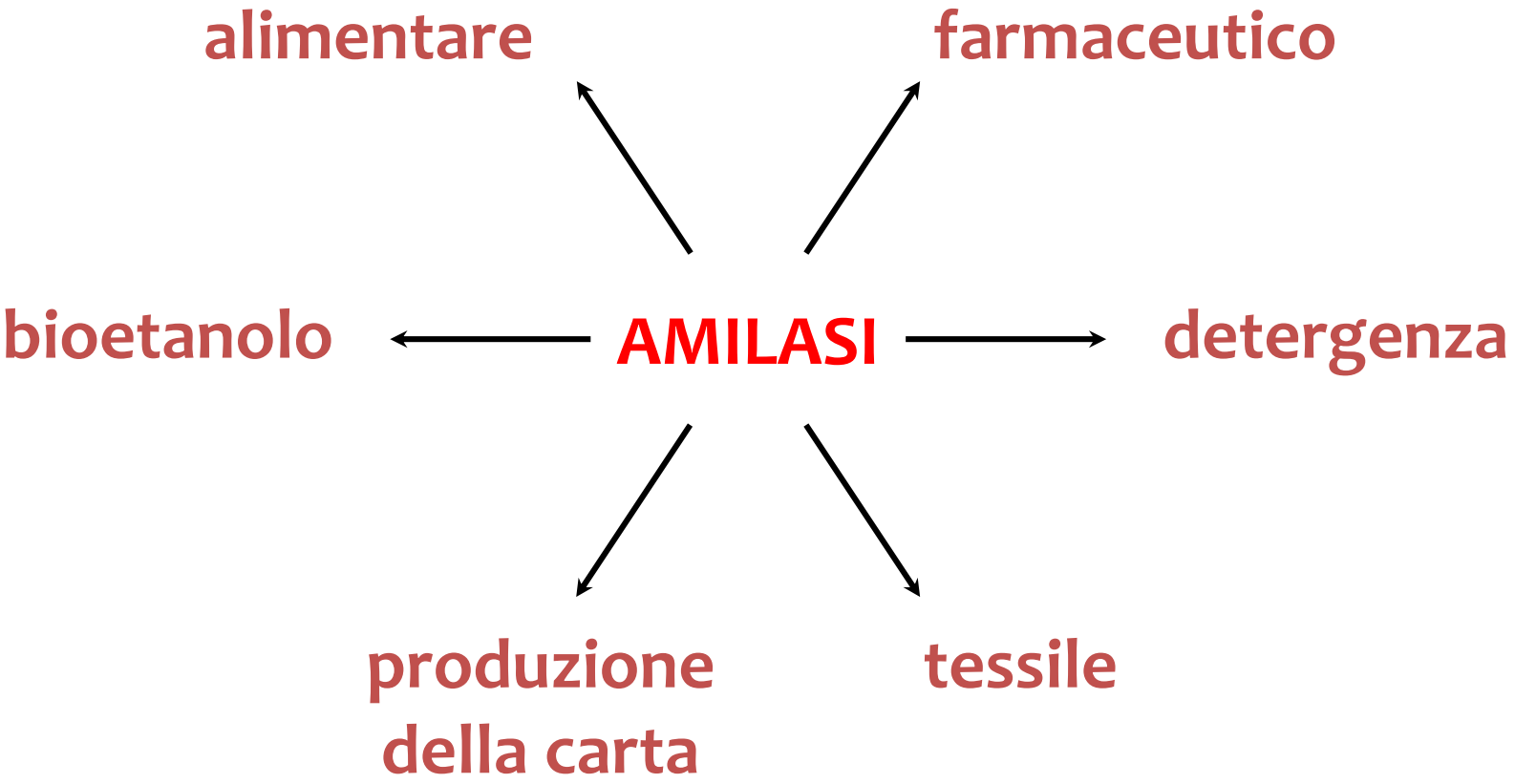
In tale database le amilasi ricadono principalmente nelle famiglie 13, 14 e 15

- **Tipo di processo catalizzato**

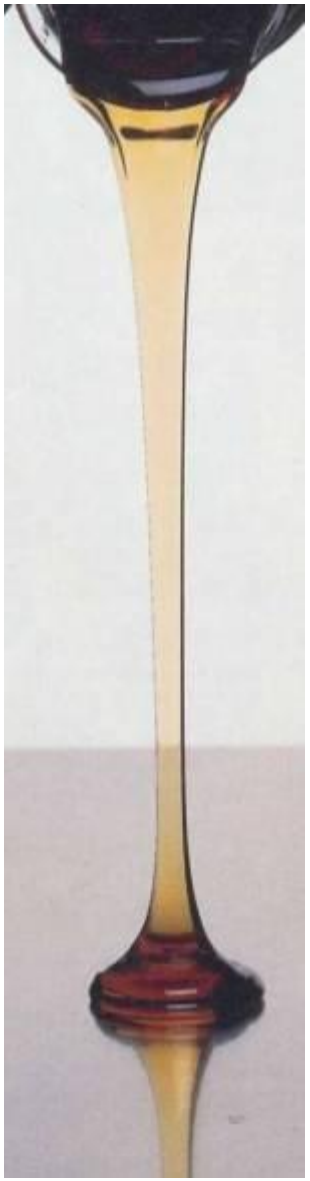
4 gruppi di enzimi: endoamilasi, esoamilasi, enzimi deramificanti, transferasi

Enzimi e biomassa: le amilasi

PRINCIPALI APPLICAZIONI DELLE AMILASI BATTERICHE



APPLICAZIONI DELLE AMILASI



SETTORE ALIMENTARE

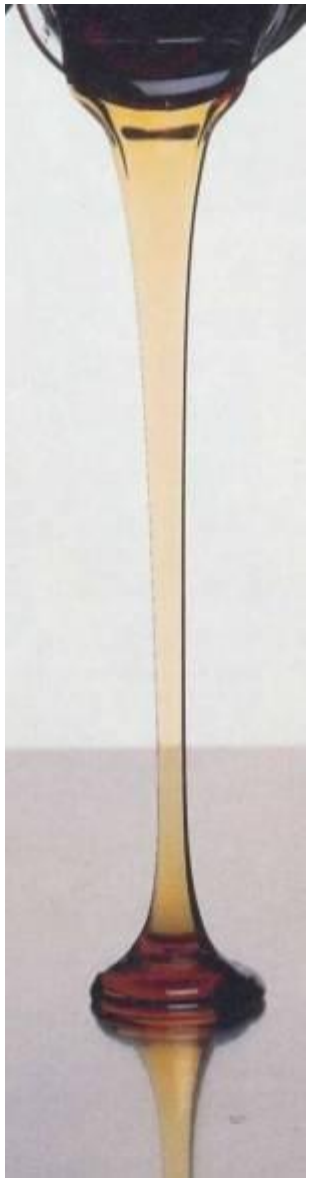
- Produzione di dolcificanti :

-Glucosio
-Fruttosio (HFCS, sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio)
-Miscele di oligosaccaridi

Per la produzione di bevande, dolciumi, et cetera

- Idrolisi dell'amido durante la fermentazione della birra

SETTORE ALIMENTARE



- **Conversione dell'amido in glucosio/fruttosio/maltosio**

1) LIQUEFAZIONE — **AMIDO**

T = 105°C per 5-8min
T = 95° per 1-2h

α-amilasi da *Bacillus subtilis/*
B. licheniformis/B. stearothermophilus

2) SACCARIFICAZIONE — **DESTRINE / GLUCOSIO**

T = 60°C per 36-248/96h

neopullulanasi da *B. acidopullulyticus/*
B. stearothermophilus
β-amilasi da varie specie *Bacillus*
Glucoamilasi fungina

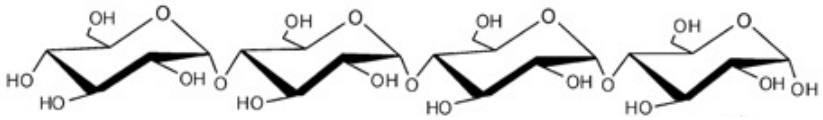
3) ISOMERIZZAZIONE — **GLUCOSIO ➔ FRUTTOSIO**

SETTORE ALIMENTARE

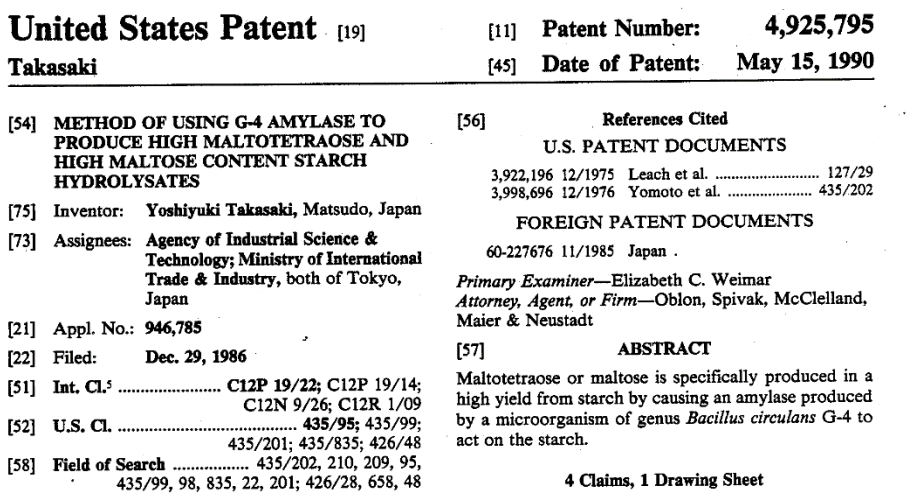
- Produzione di maltooligosaccaridi (Gn amilasi)

amilasi da *Bacillus subtilis/ B. halodurans/ B. circulans*

ES: maltotetraosio (G4)



In anni recenti si è verificato un crescente interesse per sistemi amilolitici in grado di produrre specifici maltooligosaccaridi che hanno un ampio range di potenziali applicazioni nell'industria alimentare e farmaceutica.
Appl. Microbiol. Biotechnol 1994, 42: 198-203



United States Patent [19]
Takasaki

[11] **Patent Number: 4,925,795**
[45] **Date of Patent: May 15, 1990**

[54] **METHOD OF USING G-4 AMYLASE TO PRODUCE HIGH MALTOTETRAOSE AND HIGH MALTOSE CONTENT STARCH HYDROLYSATES**

[75] Inventor: **Yoshiyuki Takasaki**, Matsudo, Japan

[73] Assignees: **Agency of Industrial Science & Technology; Ministry of International Trade & Industry**, both of Tokyo, Japan

[21] Appl. No.: **946,785**

[22] Filed: **Dec. 29, 1986**

[51] **Int. Cl.**[5] **C12P 19/22**; C12P 19/14; C12N 9/26; C12R 1/09

[52] **U.S. Cl.** **435/95**; 435/99; 435/201; 435/835; 426/48

[58] **Field of Search** 435/202, 210, 209, 95, 435/99, 98, 835, 22, 201; 426/28, 658, 48

[56] **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

3,922,196 12/1975 Leach et al. 127/29
3,998,696 12/1976 Yomoto et al. 435/202

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

60-227676 11/1985 Japan .

Primary Examiner—Elizabeth C. Weimar
Attorney, Agent, or Firm—Oblon, Spivak, McClelland, Maier & Neustadt

[57] **ABSTRACT**

Maltotetraose or maltose is specifically produced in a high yield from starch by causing an amylase produced by a microorganism of genus *Bacillus circulans* G-4 to act on the starch.

4 Claims, 1 Drawing Sheet

SETTORE ALIMENTARE

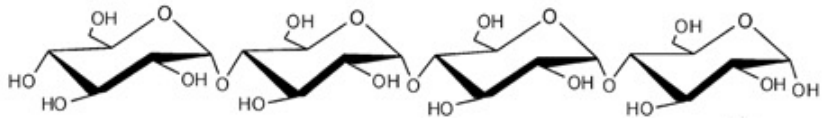
- Proprietà di maltooligosaccaridi

Starch - Stärke

Volume 42 Issue 4, Pages 151 - 157

Published Online: 26 Oct 2006

Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Article

Maltotetraose, A New Saccharide of Tertiary Property

Dr. T. Kimura [1], Dr. T. Nakakuki [2]

[1]Assistent General Manager, Research and Development Center, Chiyoda Corporation: 13, Moriya-cho 3-chome, Kanagawa-ku, Yokohama 221, Japan

[2]Chief Biochemist, Research Institute, Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.: 30 Tajima, Fuji, Shizuoka 417, Japan

Funded by:

- Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (Japan)

ABSTRACT

Maltotetraose, a linear tetramer of α-D-glucose, has many potential uses in the food and pharmaceutical industries because of its unique characteristics. A consortium of Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd., Kirin Brewery Co., Ltd., Chiyoda Corp. and Yokogawa Electric Corp. has developed a continuous maltotetraose production process which uses an immobilized enzyme bioreactor system. Because maltotetraose syrup is a brand-new saccharide having low sweetness and resistance to retrogradation, it has begun to be used as a property enhancer for various foods, powdering materials, saccharide for dry milk, liquid diets for the sick and a body reinforcement agent for refreshing drinks. In addition to the properties of nutrition and taste, the tertiary property of organism control has been discovered; that is, feeding with a maltotetraose-rich corn syrup inhibits the growth of intestinal putrefactive bacteria such as *C. perfringens* and Enterobacteriaceae.

- Inibizione della crescita di batteri intestinali putrefattivi

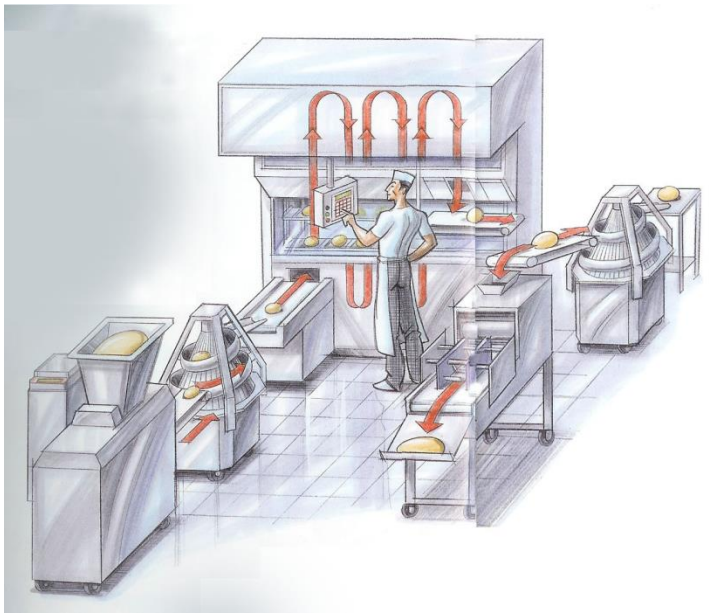
SETTORE ALIMENTARE

- **Produzione di pane**

amilasi batteriche come agenti anti-staling (invecchiamento del pane), rallentano la retrogradazione dell'amido aumentando la vita commerciale (shelf-life) del prodotto.

α-amilasi maltogenica da *B. stearothermophilus*

Gazzetta Ufficiale n. 127 del 03-06-1998
MINISTERO DELLA SANITA' DECRETO 6 aprile 1998, n. 172.
Regolamento recante norme per l'aggiunta di farine di cereali maltati, di estratti di malto e degli enzimi amilolitici alfaamilasi e betaamilasi alle farine di grano tenero.



PRODUZIONE DI MANGIMI

32006R1876
Regolamento (CE) n. 1876/2006 della Commissione, del 18 dicembre 2006, relativo all'autorizzazione provvisoria e permanente di alcuni additivi negli alimenti per animali (Testo rilevante ai fini del SEE)
Gazzetta ufficiale n. L 360 del 19/12/2006 pag. 0126 - 0132

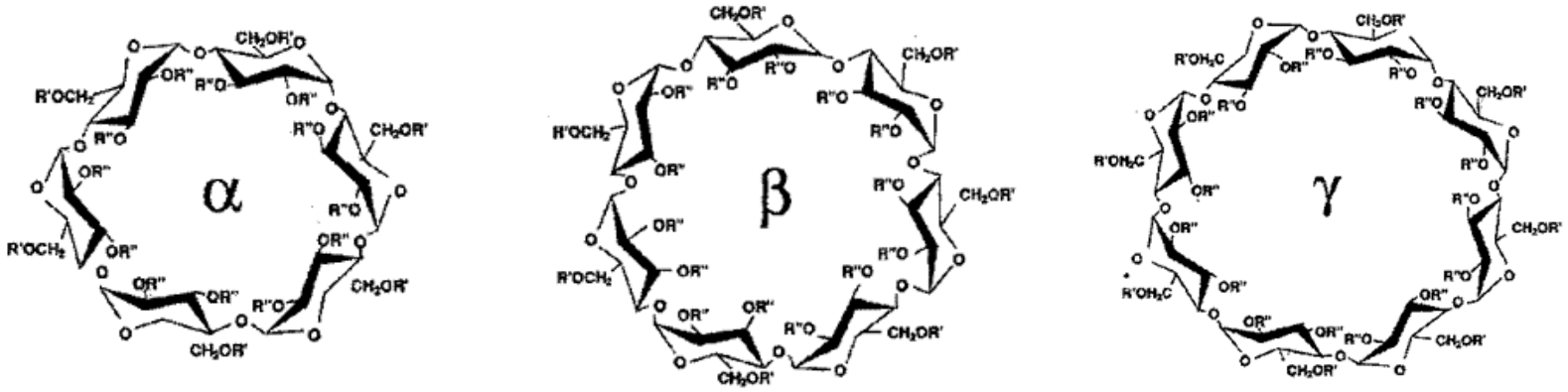
Applicazioni di amilasi nella produzione di mangimi animali

I mangimi vengono addizionati con enzimi (glucanasi, xylanasi, proteasi ed **amilasi**) che facilitano la liberazione dei nutrienti tramite l'idrolisi di fibre non digeribili

amilasi da ***Bacillus licheniformis***,
Bacillus subtilis e ***Bacillus amyloliquefaciens***

INDUSTRIA FARMACEUTICA

- Produzione di ciclodestrine



Oligosaccaridi ciclici di 6 (α), 7 (β) ed 8 (γ) residui di glucosio

Produzione industriale: Ciclodestrinaglicosil transferasi da ***Bacillus macerans***

Studi in corso su CGT da *Thermoanaerobacter*

Le ciclodestrine formano complessi di inclusione di notevole interesse per l'industria farmaceutica *(DRUG DELIVERY)*

Review articles on PubMed

Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers.
Brewster ME, Loftsson T.
Adv Drug Deliv Rev. 2007 Jul 30;59(7):645-66.

The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability.
Carrier RL, Miller LA, Ahmed I.
J Control Release. 2007 Nov 6;123(2):78-99.

Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes.
Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konrádsdóttir F.
J Pharm Sci. 2007 Oct;96(10):2532-46.

DETERGENZA

Le amilasi vengono aggiunte ai detergenti per rimuovere le tracce di amido dalle macchie di sporco o nei residui di cibo. Le amilasi idrolizzano l'amido gelatinizzato che tende ad associarsi stabilmente sulle fibre dei tessuti o si lega ad altri componenti delle macchie.

amilasi da *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*
pullulanasi alcalina da *Bacillus sp.*

United States Patent [19]
Mitsugi et al.

[11] **4,022,666**
[45] **May 10, 1977**

[54] **ALPHA-AMYLASES FROM *BACILLUS SUBTILIS***

[75] Inventors: **Koji Mitsugi**, Kanagawa; **Nobuo Kobayashi**, Kawasaki; **Toshiro Shida**, Kawasaki; **Yasunori Yokokawa**, Kawasaki, all of Japan

[73] Assignee: **Ajinomoto Co., Inc.**, Tokyo, Japan

[22] Filed: **Sept. 9, 1970**

[21] Appl. No.: **70,656**

[30] **Foreign Application Priority Data**
Sept. 12, 1969 Japan 44-72386

[52] **U.S. Cl.** ..... **195/62**; 195/31 R; 195/63; 195/66 R; 195/68; 252/DIG. 12
[51] **Int. Cl.²** **C07G 7/02**
[58] **Field of Search** ..... 195/62 R, 63 R, 66 R, 195/68, 31 R; 252/DIG. 12

[56] **References Cited**
OTHER PUBLICATIONS

Campbell; L. L., Arch of Biochem and Biophys, vol. 54, pp. 154–161.
Nishida et al., Agr. Biol. Chem. vol. 31, pp. 682–693, 1967.
Radley; J. A., Starch and its Derivatives 4th Ed., p. 437, Published by Chapman and Hall, 1968.

Primary Examiner—David M. Naff
Attorney, Agent, or Firm—Hans Berman

[57] **ABSTRACT**

Alpha-amylases which have optimum activity between pH 6.5 to 8 and between pH 9.0 to 11.5 at 40° C are produced by culturing strains of *Bacillus subtilis* on a nutrient medium under aerobic conditions. Some of the alpha amylases are effective in hot and alkaline detergent solutions containing chelating agents.

6 Claims, 5 Drawing Figures

DETERGENZA

amilasi da *Bacillus licheniformis*

Termamyl®

Termamyl is a robust standard amylase. Termamyl efficiently removes starch-based stains and provides whiteness to laundry. It is also highly suitable for automatic dishwash detergents. Termamyl is effective at relatively high alkalinity and at high temperatures. Valuable consumer claims: stain removal, cleanness & whiteness.

In commercio dal 1993

INDUSTRIA TESSILE

- "Sbozzima" dei tessuti: rimozione della bozzima, patina amidacea usata come protettivo delle fibre nei processi di tessitura.

amilasi da batteri del genere
Bacillus

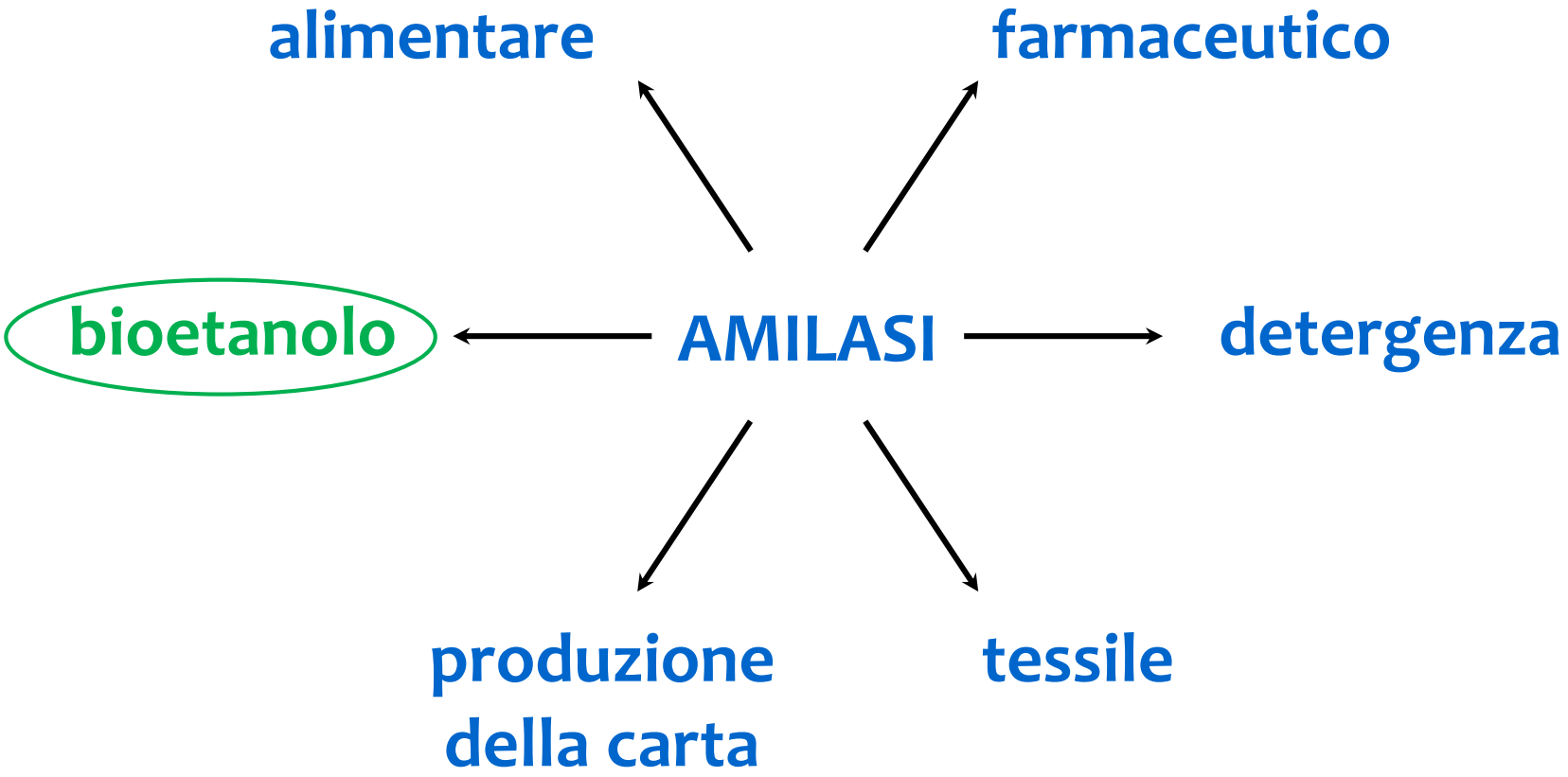
INDUSTRIA CARTIERA

- Preparazione dell'amido da patinatura aggiunto nella preparazione della carta per il controllo di alcune proprietà quali viscosità, rigidità, cancellabilità

- Rimozione dell'amido nei processi di riciclo/decolorazione della carta trattata con amido

Enzimi e biomassa: le amilasi

AMILASI BATTERICHE e SOSTENIBILITÀ:
LA PRODUZIONE DI BIOCARBURANTI



Bioetanolo

Idrolisi/
fermentazione

CH_3CH_2OH

E10
E85
E100

Bioetanolo

- prima generazione (1G)

amido

saccarosio

- seconda generazione (2G)

cellulosa/emicellulosa

- terza generazione (3G)

alghe

BIOCARBURANTI DI PRIMA GENERAZIONE

Prodotti a partire da colture alimentari come materia prima: mais e canna da zucchero, soia e palma ovvero fonti facilmente accessibili di zuccheri, amidi ed olii.

Perdite di energia al netto delle emissioni di gas serra associate ad un aumento dei prezzi dei prodotti alimentari

BIOCARBURANTI DI SECONDA GENERAZIONE

Utilizzano biomasse di scarto (residui agricoli, residui di mais, et cetera) come fonte per la produzione del biocarburante.

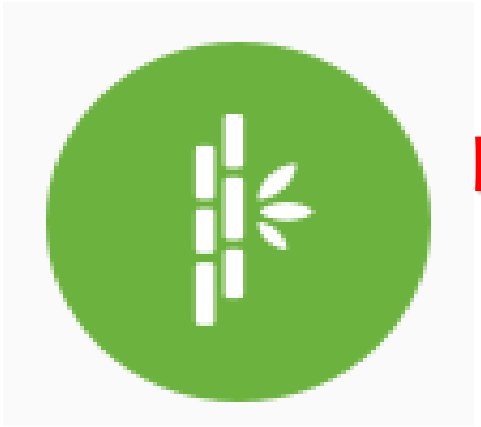
I sistemi di produzione appositamente progettati utilizzano microorganismi in grado di utilizzare tali materie prime per estrarne zuccheri da fermentare.

BIOCARBURANTI DI TERZA GENERAZIONE

Utilizzano biomasse algali .

I sistemi di produzione appositamente progettati utilizzano microorganismi in grado di utilizzare tali materie prime per estrarne zuccheri da fermentare.

Bioetanolo



Biomassa vegetale

pretrattamento

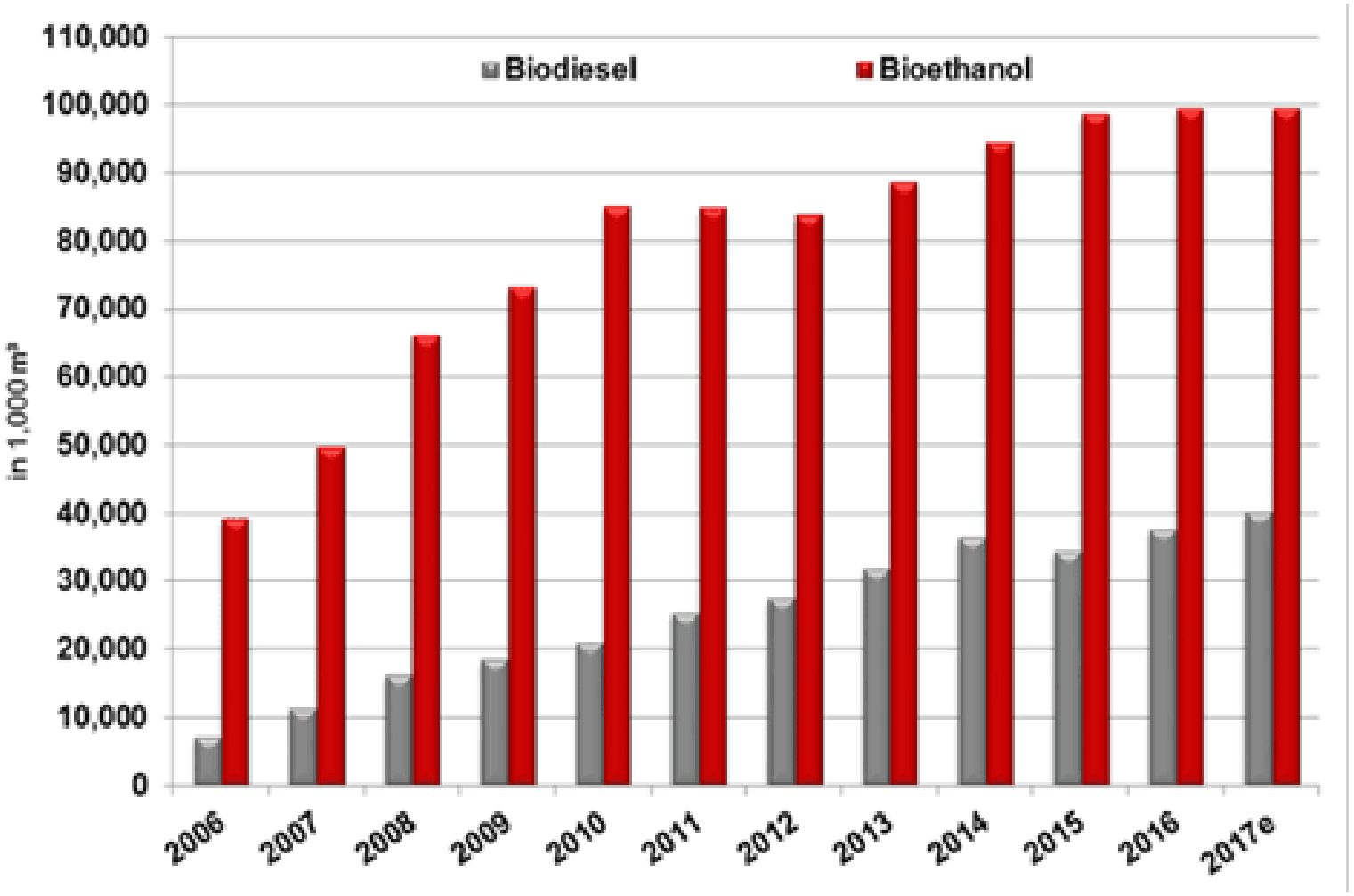
polisaccaridi → **monosaccaridi** → **CH_3CH_2OH**

Idrolisi (saccarificazione)

Fermentazione

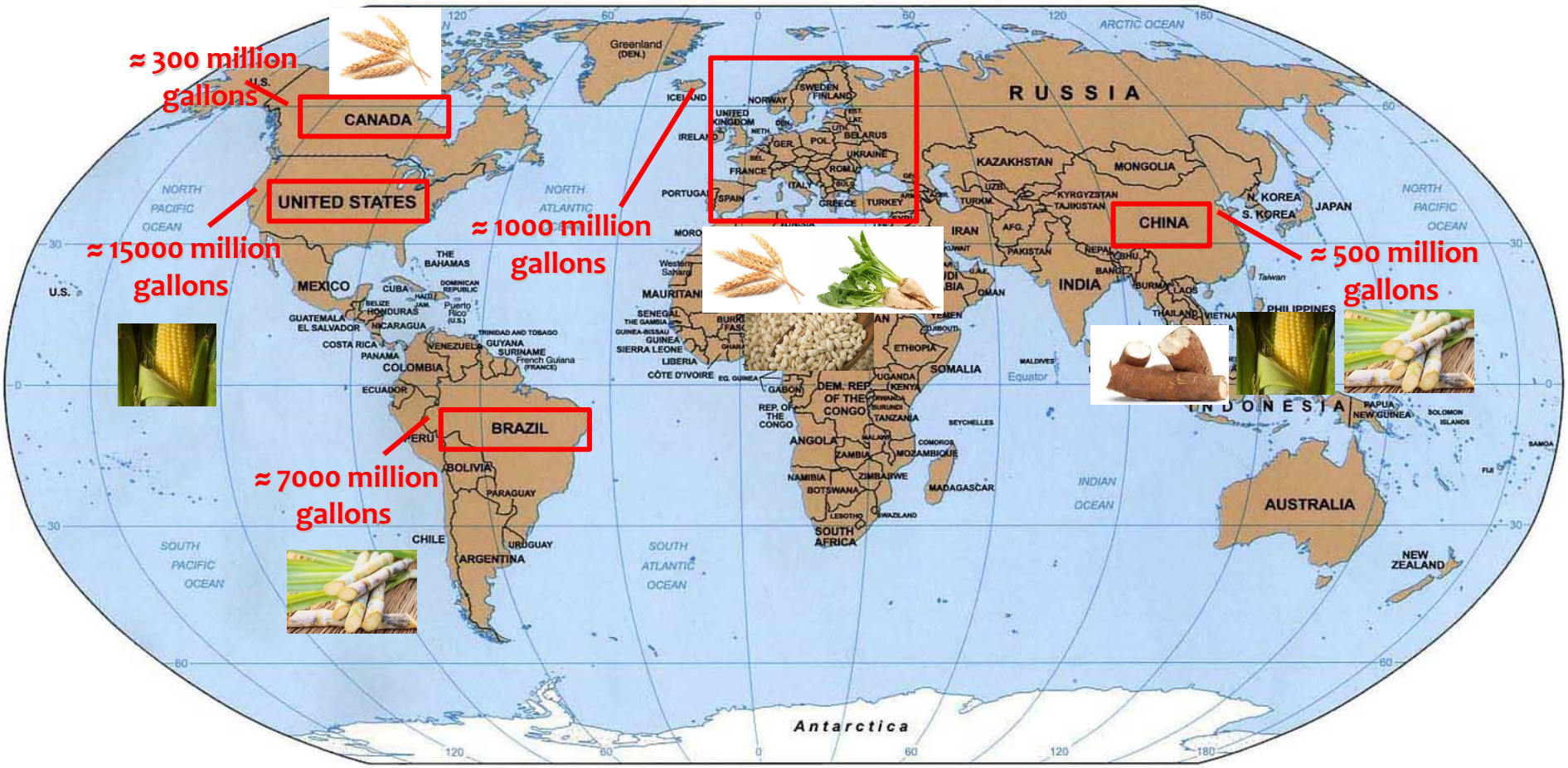
1G	AMIDO	*amilasi*	GLUCOSIO	*lieviti*
2G	CELLULOSA	*cellulasi*	GLUCOSIO, XILOSIO	

1G-bioethanol total world production



Source: http://www.cropenergies.com/Pdf/en/Bioethanol/Markt/Dynamisches_Wachstum.pdf

1G-bioetanolo: produzione mondiale



Canna da zucchero

Barbabietola da zucchero

Cassava

Mais

frumento

schema generale del processo di conversione delle biomasse in etanolo

1. rendere la frazione polisaccaridica disponibile alla digestione enzimatica

2. Digestione enzimatica dei polisaccaridi per liberare monosaccaridi da avviare alla fermentazione

3. Fermentazione dei monosaccaridi mediante uso di microorganismi (lieviti, batteri)

4. Separazione del prodotto (etanolo) dalla miscela di reazione

schema generale del processo di conversione delle biomasse

Fasi separate:

- ogni stadio richiede un recipiente e precise condizioni di pH, temperatura, et ecetera, chiaramente diverse per ogni fase

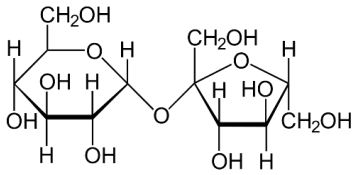
Costo economico:

- produzione di enzimi e microorganismi (lieviti) per la fermentazione
- Distillazione

Costo AMBIENTALE e SOCIALE

1G-bioetanolo: le biomasse ed i processi

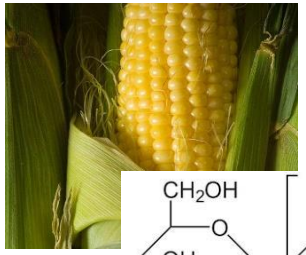
canna da zucchero, barbabietola da zucchero, sorgo zuccherino

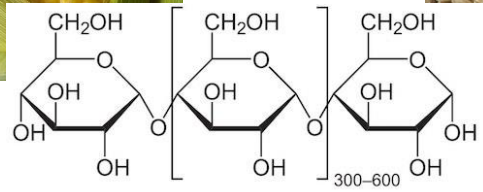


saccarosio

Fermentazione con lieviti

Grano, frumento





AMIDO

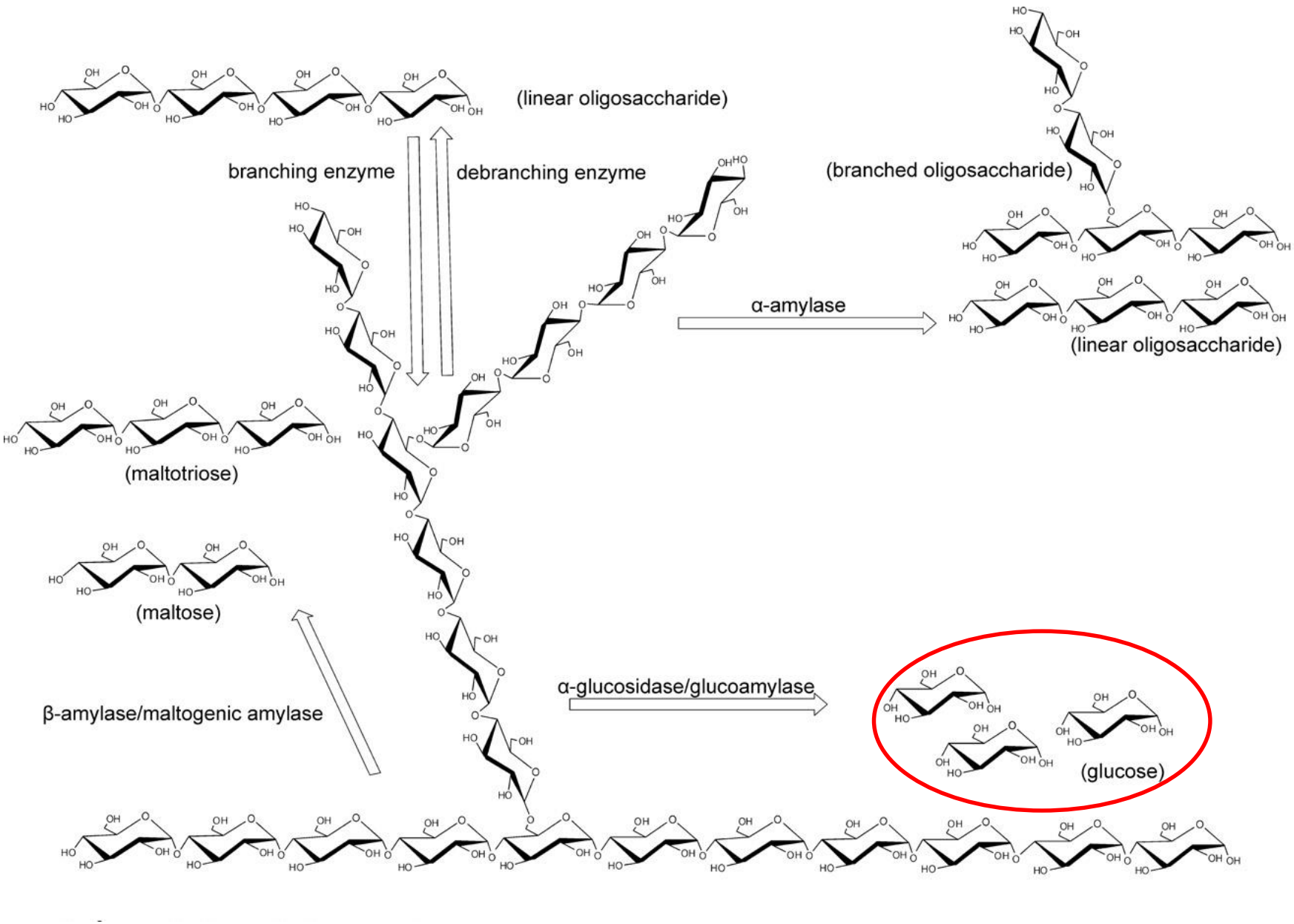
Idrolisi enzimatica

Fermentazione con lieviti

distillazione

CH_3CH_2OH

Enzimi e biomassa: le amilasi

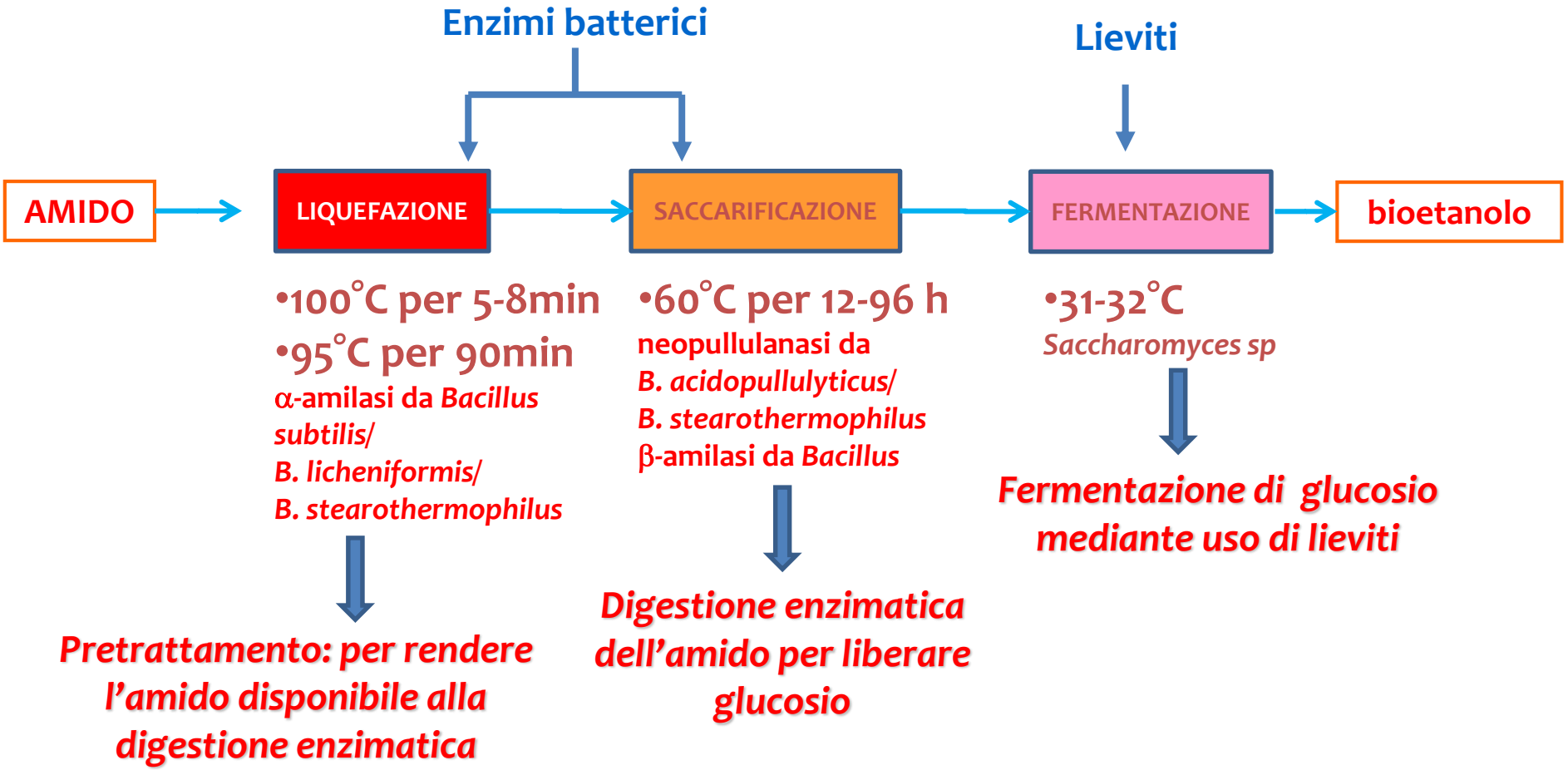


Enzimi e biomassa: le amilasi

- Processo industriale attualmente in uso

Bioetanolo di I Generazione

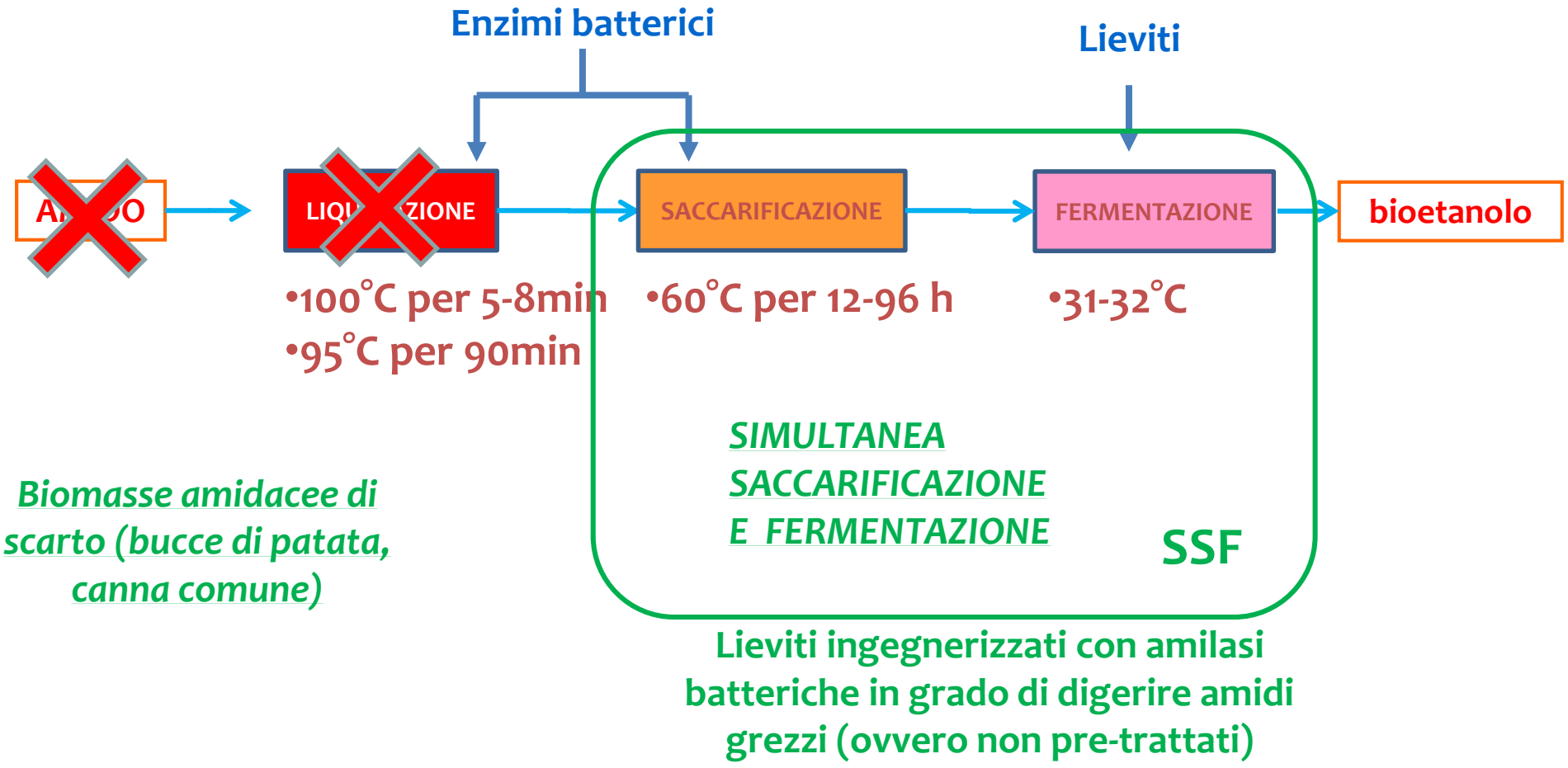
- Impatto sulla catena alimentare
- Elevati costi in termini economici ed energetici



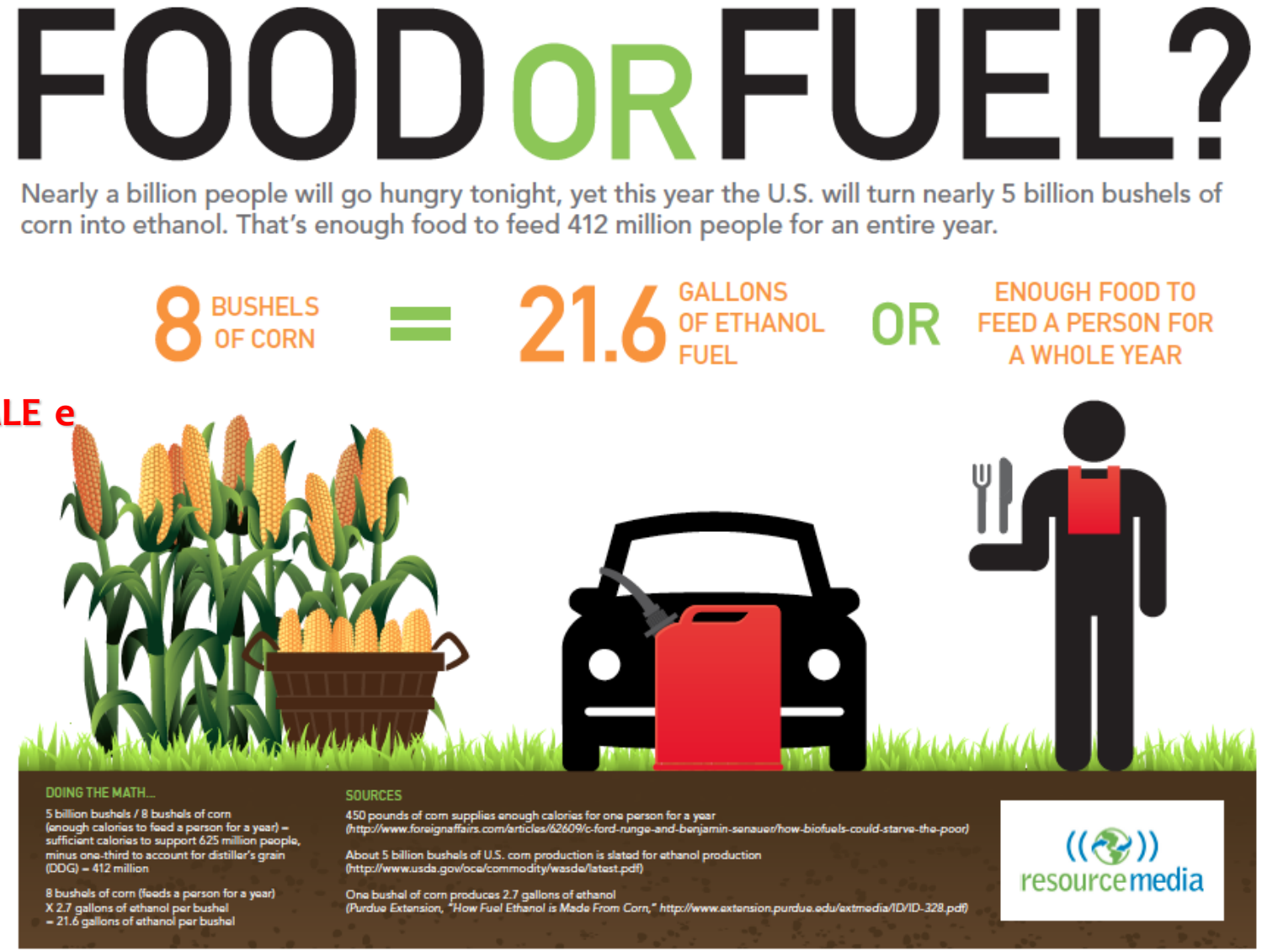
Enzimi e biomassa: le amilasi

PRODUZIONE DI BIOETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE

- Uso di scarti della lavorazione dei vegetali come materia prima
- Identificazione e caratterizzazione di amilasi in grado di digerire amidi grezzi



1G-bioetanolo: la competizione con la catena aimentare



Costo AMBIENTALE e SOCIALE

2G-bioetanolo: le biomasse lignocellulosiche

COLTURE ENERGETICHE

Erbe/piante perenni
Colture non-food dedicate

RESIDUI BOSCHIVI

Residui da conifere
Legni duri
Segatura
Residui della potatura

RESIDUI AGRICOLI

Paglia, bagassa e stoppie da cereali

RIFIUTI SOLIDI URBANI

Frazione organica

2G-bioetanolo: le biomasse lignocellulosiche

COLTURE ENERGETICHE

Canna comune
(Arundo donax)

Cardo
(Cynara cardunculus)

RESIDUI BOSCHIVI

Legni duri

segatura

RESIDUI AGRICOLI

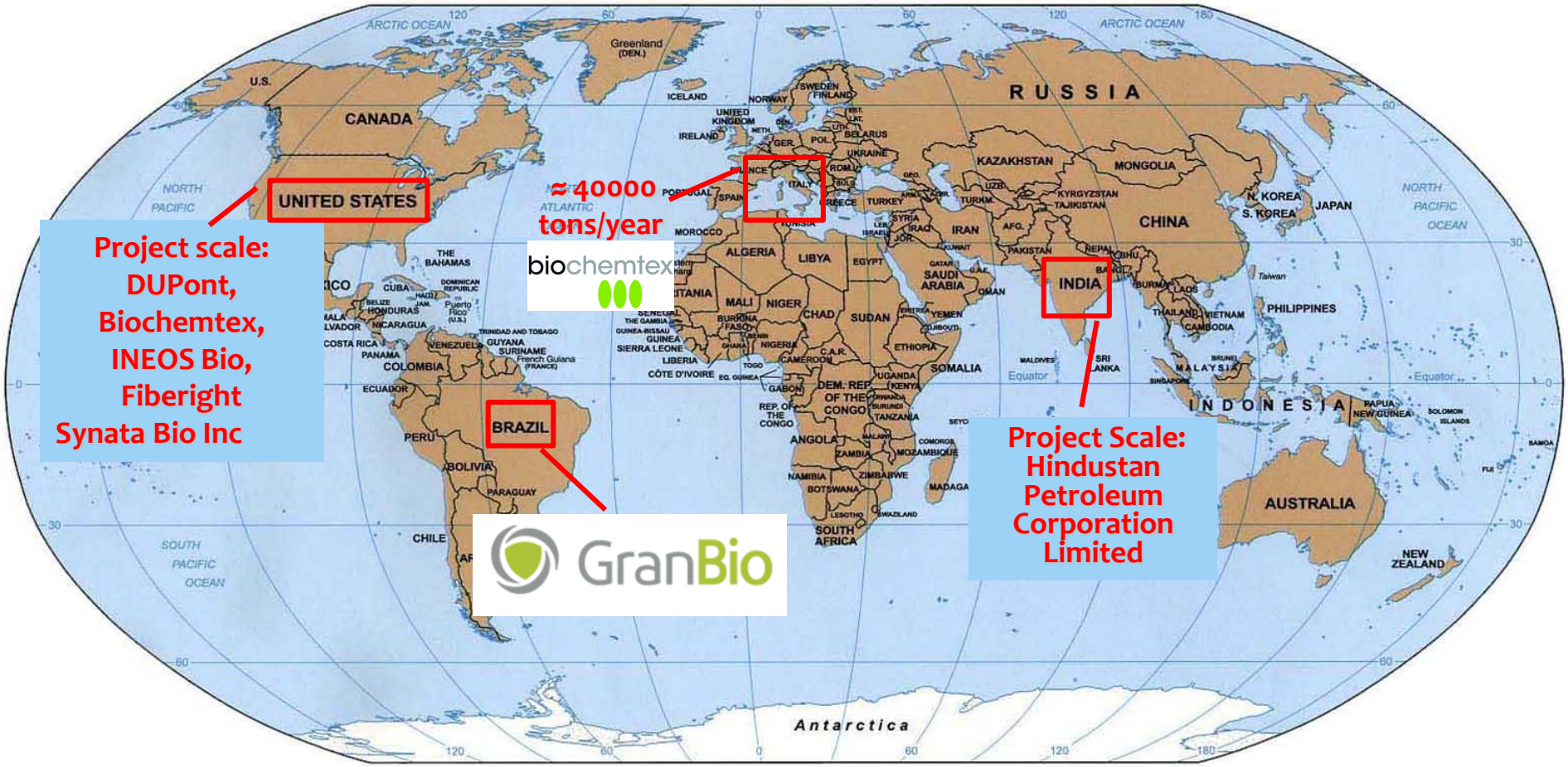
Bagassa da grano

Bagasse da canna da zucchero

RIFIUTI SOLIDI URBANI

Frazione organica

2G-bioetanolo: la produzione mondiale



schema generale del processo di conversione delle biomasse in etanolo

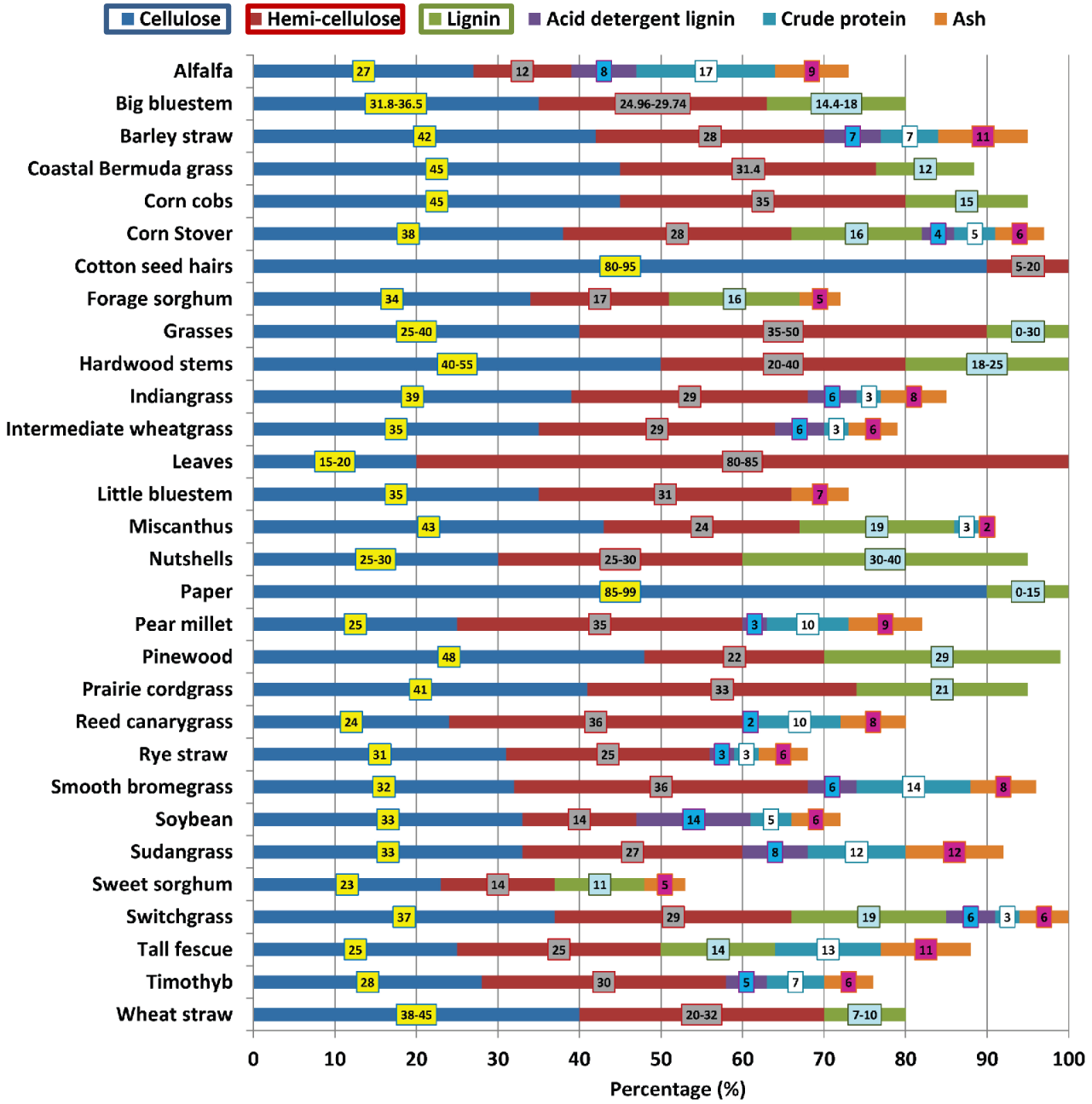
1. rendere la frazione polisaccaridica disponibile alla digestione enzimatica

2. Digestione enzimatica dei polisaccaridi per liberare monosaccaridi da avviare alla fermentazione

3. Fermentazione dei monosaccaridi mediante uso di microorganismi (lieviti, batteri)

4. Separazione del prodotto (etanolo) dalla miscela di reazione

2G-bioetanolo: composizione delle biomasse lignocellulosiche

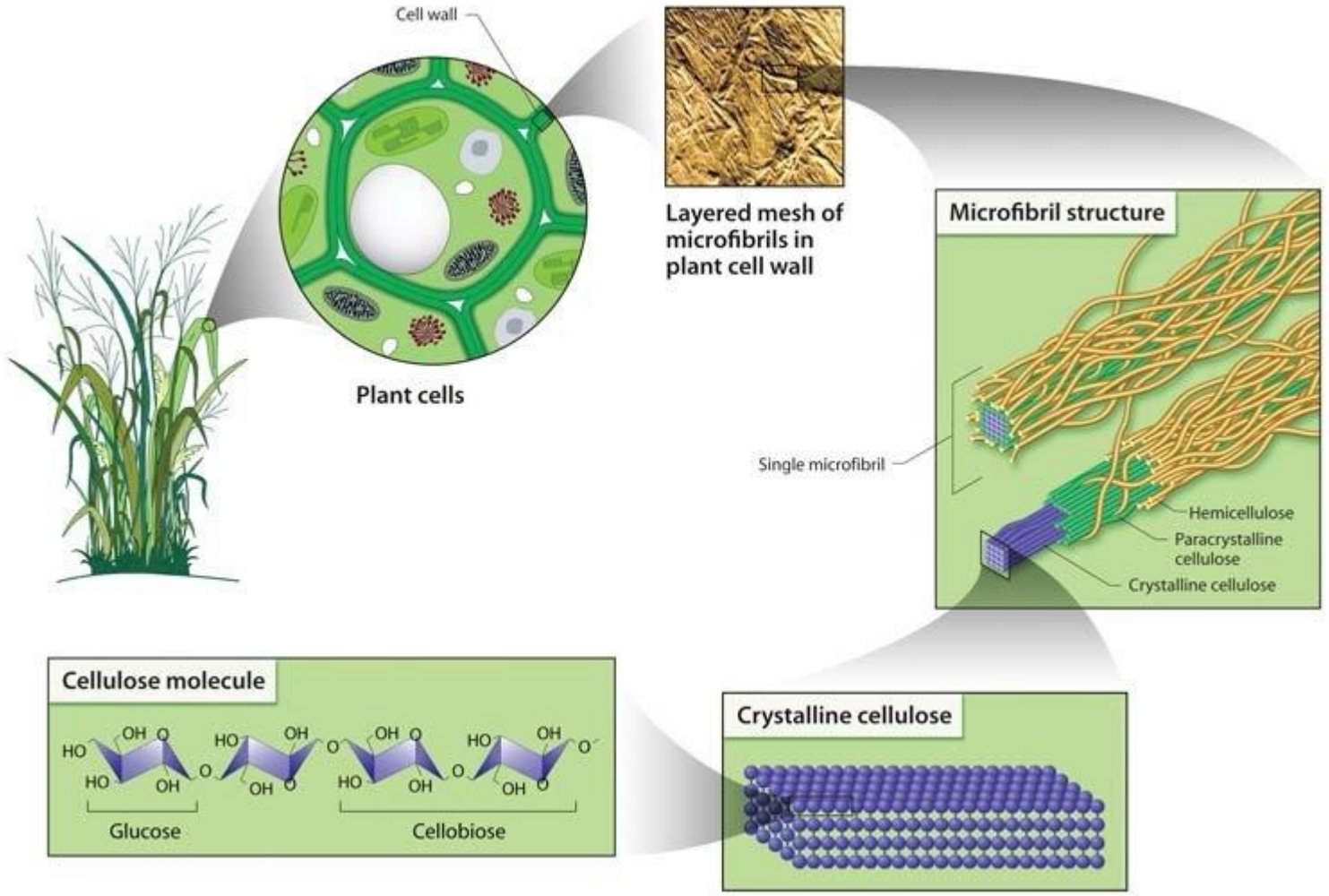


cellulosa

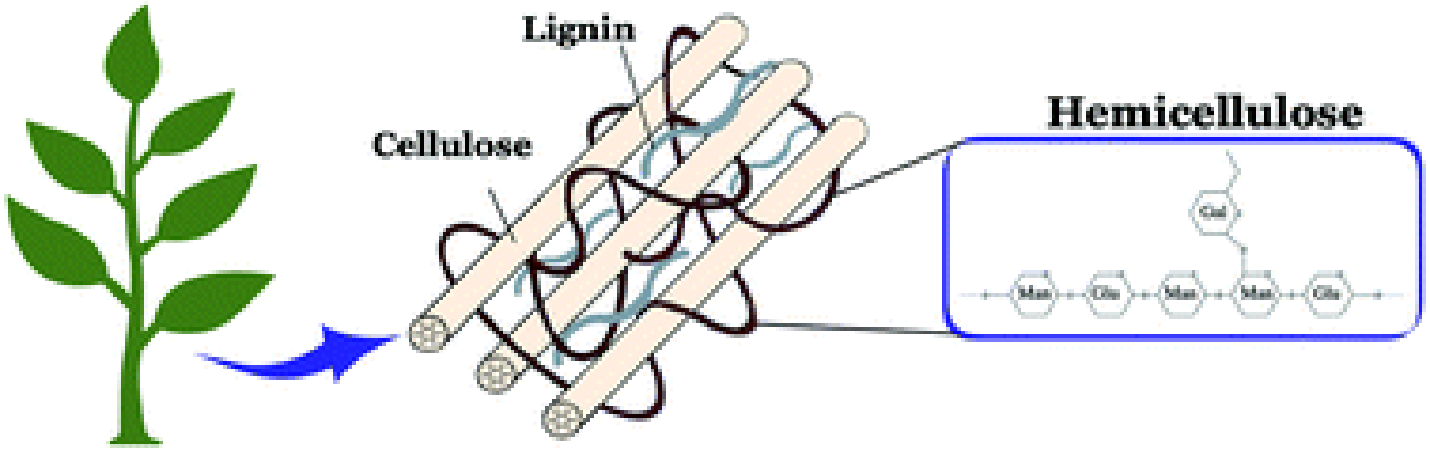
emicellulosa

lignina

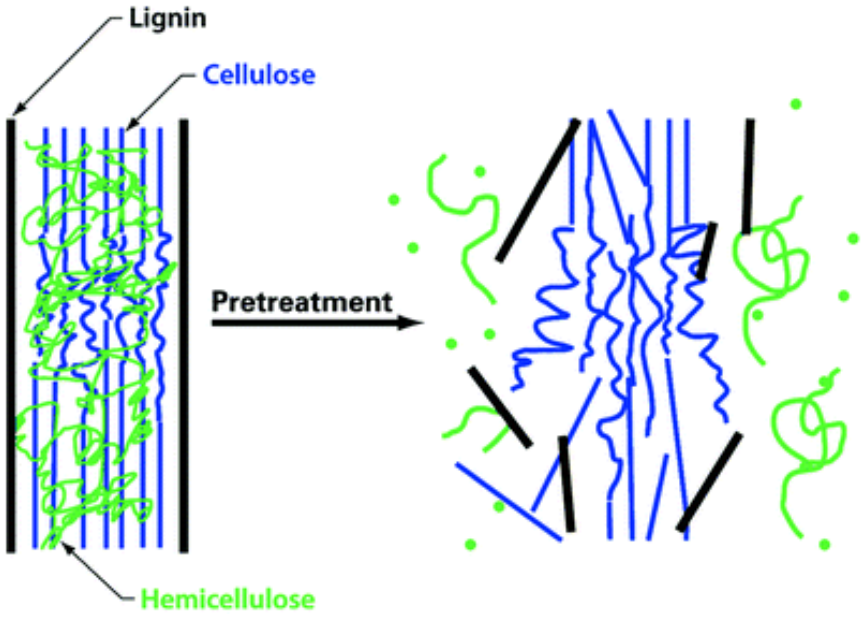
2G-bioetanolo: composizione delle biomasse lignocellulosiche



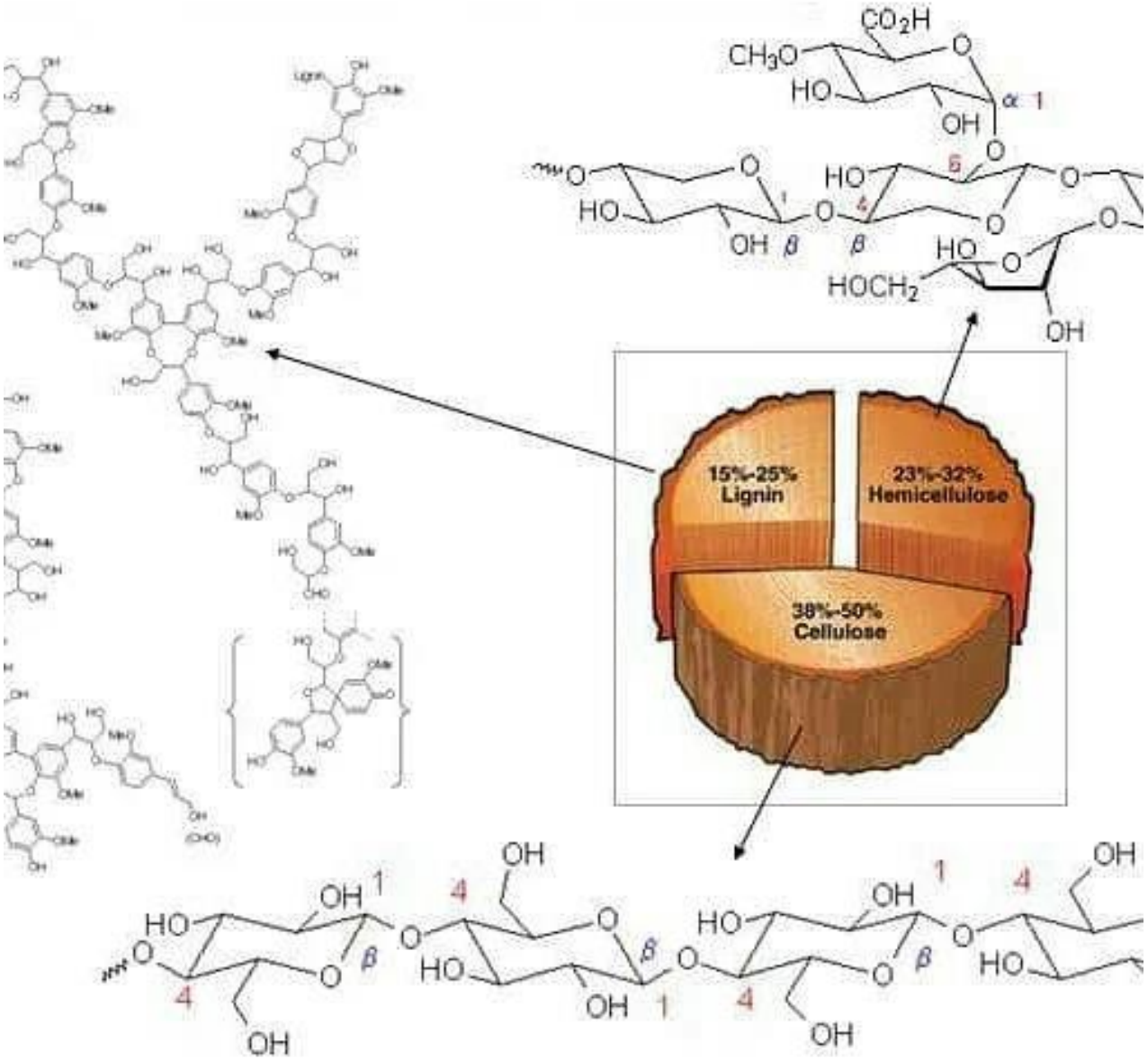
2G-bioetanolo: composizione delle biomasse lignocellulosiche



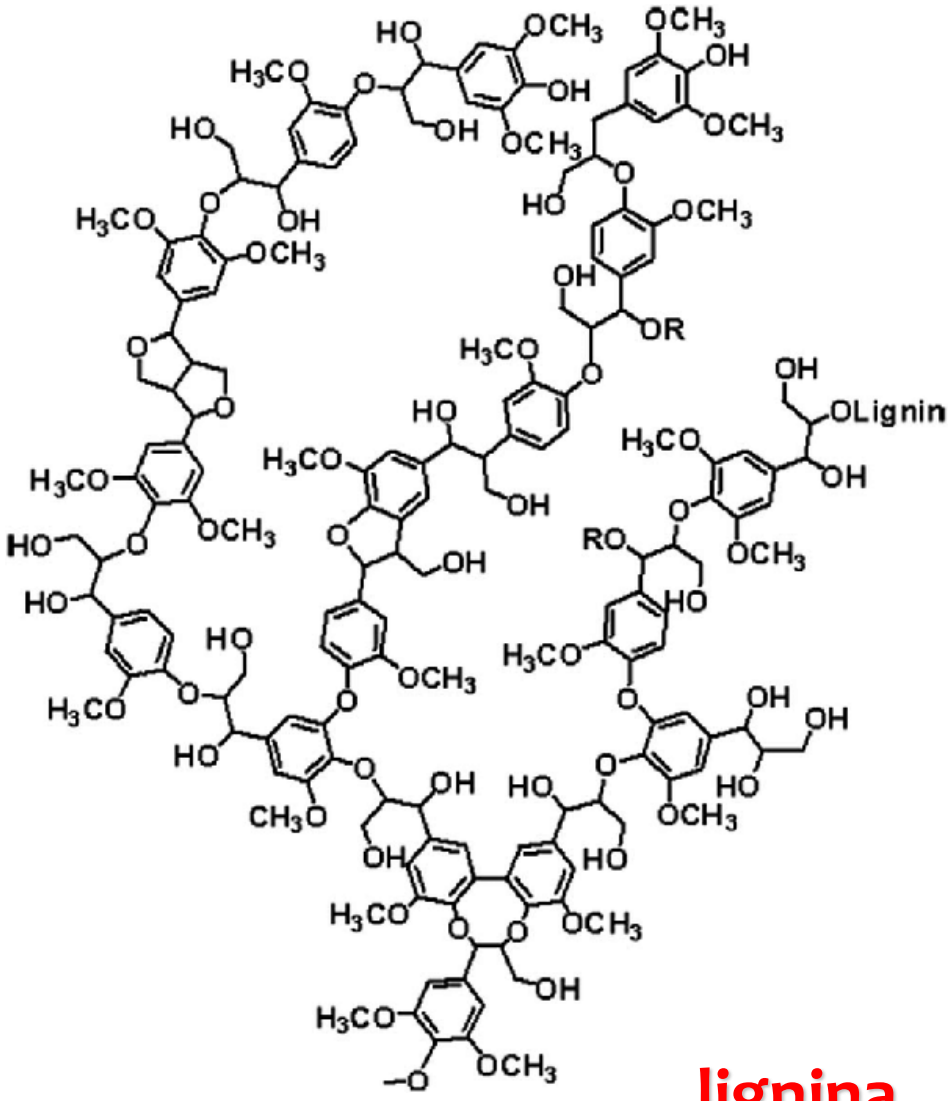
"recalcitranza" delle biomasse lignocellulosiche



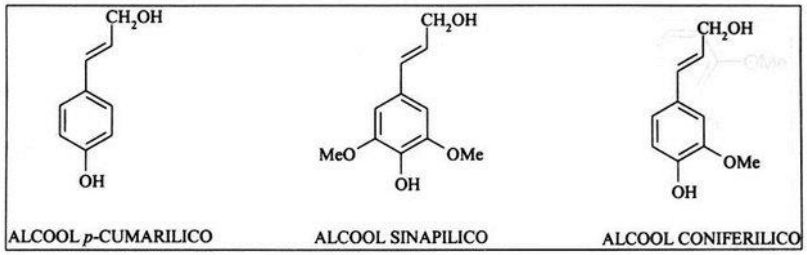
2G-bioetanolo: composizione delle biomasse lignocellulosiche



2G-bioetanolo: composizione delle biomasse lignocellulosiche



lignina



Precursori biosintetici della lignina

2G-bioetanolo: processo di conversione delle biomasse lignocellulosiche

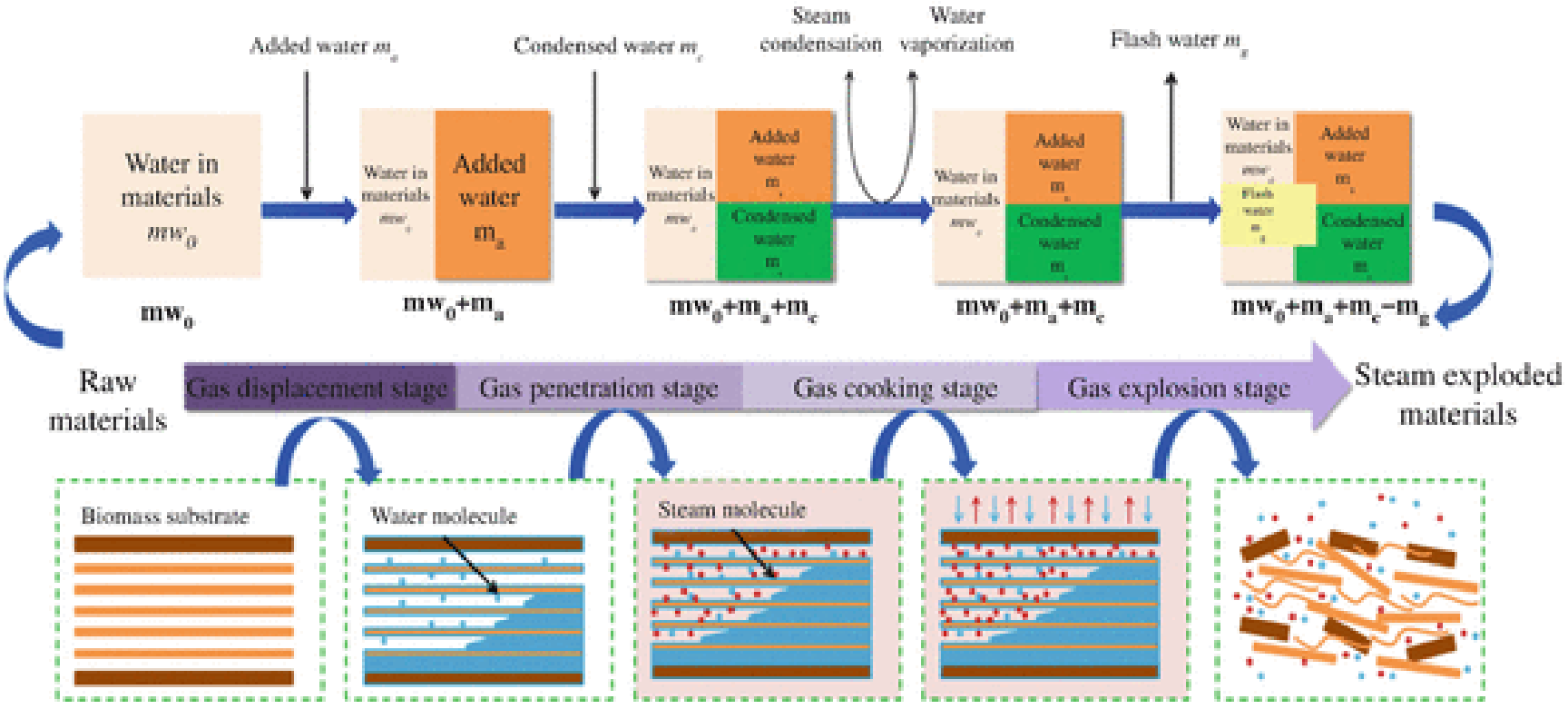
-Detossificazione della biomassa pre-trattata
-elevate quantità di enzimi per assicurare la conversione completa della cellulosa in glucosio
-idrolisi dell'emicellulosa per il recupero degli zuccheri a 5 atomi di C (xilosio)

pre-trettamento → Idrolisi enzimatica → Fermentazione con lieviti → distillazione → CH_3CH_2OH

Processi chimico/fisici in condizioni estreme → domanda energetica

Bioreattori separati per fermentare zuccheri a 6 e 5 atomi di C

2G-bioetanolo: pretrattamento delle biomasse lignocellulosiche



Steam explosion

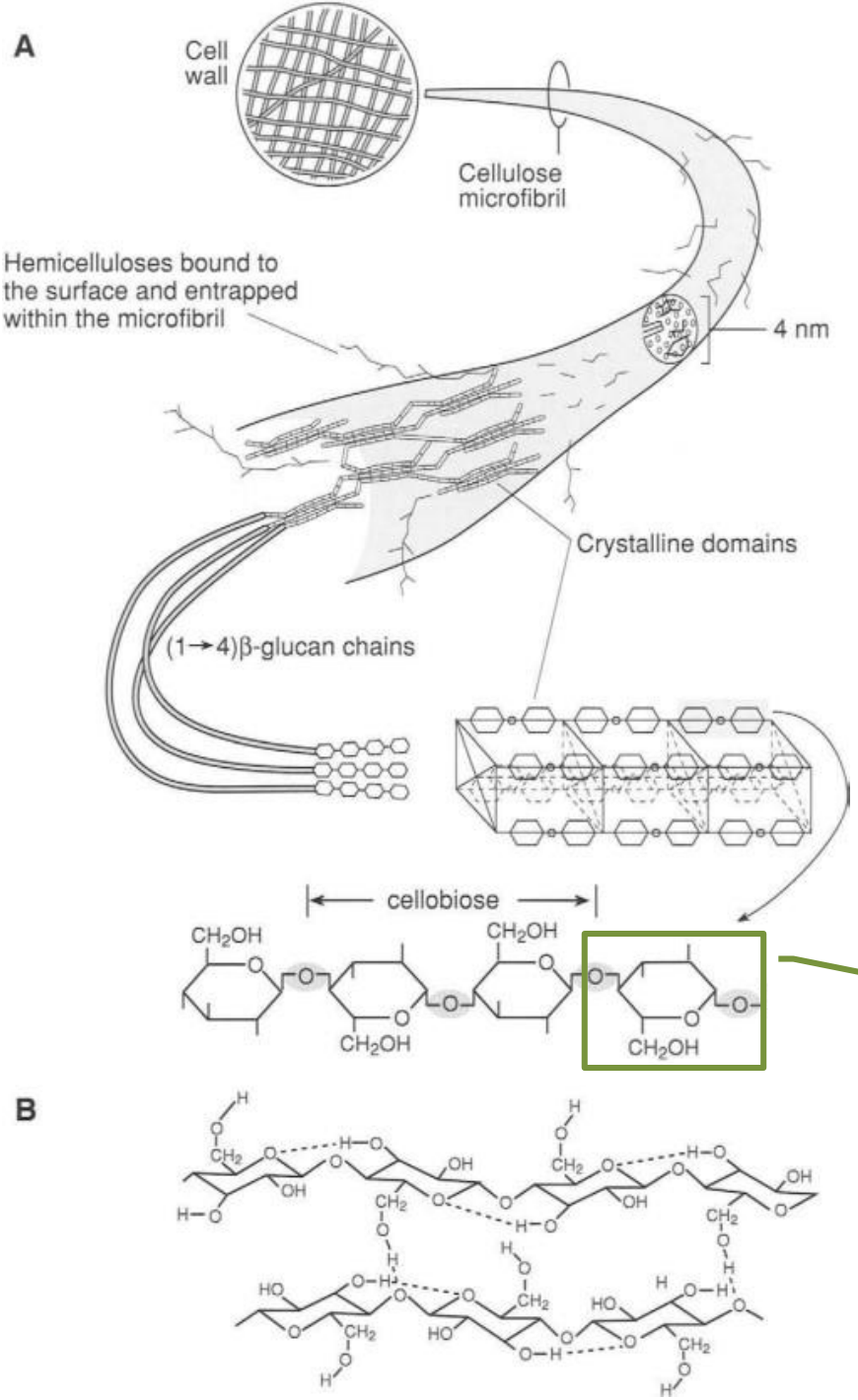
2G-bioetanolo: digestione enzimatica della frazione polisaccaridica delle biomasse lignocellulosiche

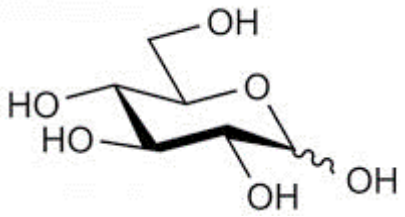
1. Enzimi cellulasi
2. Enzimi emicellulasi

2G-bioetanolo: composizione delle biomasse lignocellulosiche

Biomassa lignocellulosica	Quantità (Mton/anno)	composizione	Contenuto polisaccaridi (% peso secco)
Bagassa da			
canna da zucchero	300	emicellulosa/ cellulosa	30-35/ 40-45
Stoppie/paglia da			
Grano	696	emicellulosa/ cellulosa	32.0/ 27.8
Orzo	≈ 5.6 - 9.8	emicellulosa/ cellulosa	27/ 44
Malto	≈ 10.5 – 15.7	emicellulosa/ cellulosa	16/ 41
Riso	731	emicellulosa/ cellulosa	26/ 33
Sorgo	≈ 28 – 43	emicellulosa/ cellulosa	30/ 31
Granturco	550	emicellulosa/ cellulosa	36/ 39

2G-bioetanolo: struttura della cellulosa

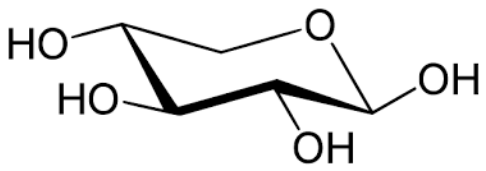




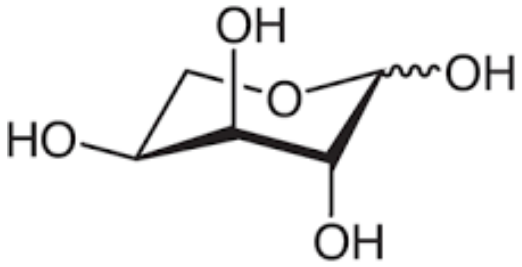
β (1→4) D-glucopiranosio

(C6)

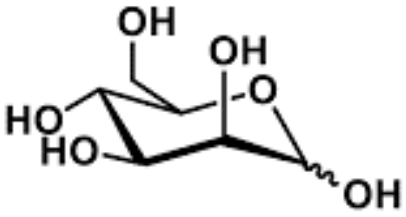
2G-bioetanolo: monosaccaridi dell'emicellulosa (C5/C6)



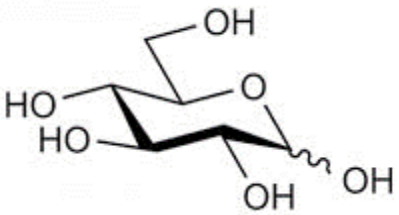
Xilosio (C5)



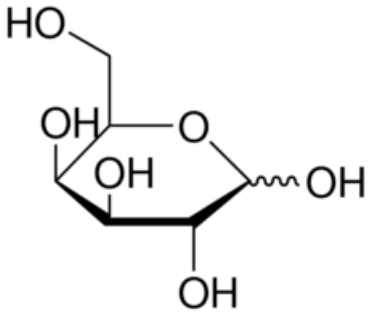
Arabinosio (C5)



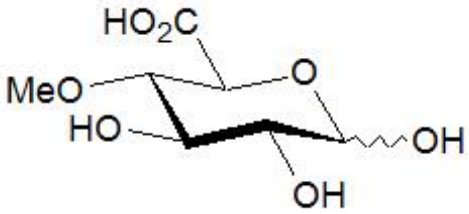
Mannosio (C6)



Glucosio (C6)

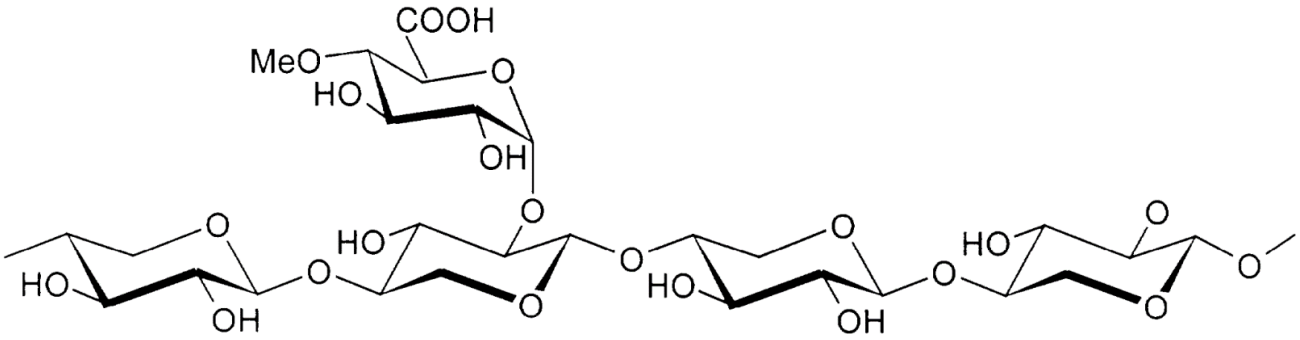


Galattosio (C6)

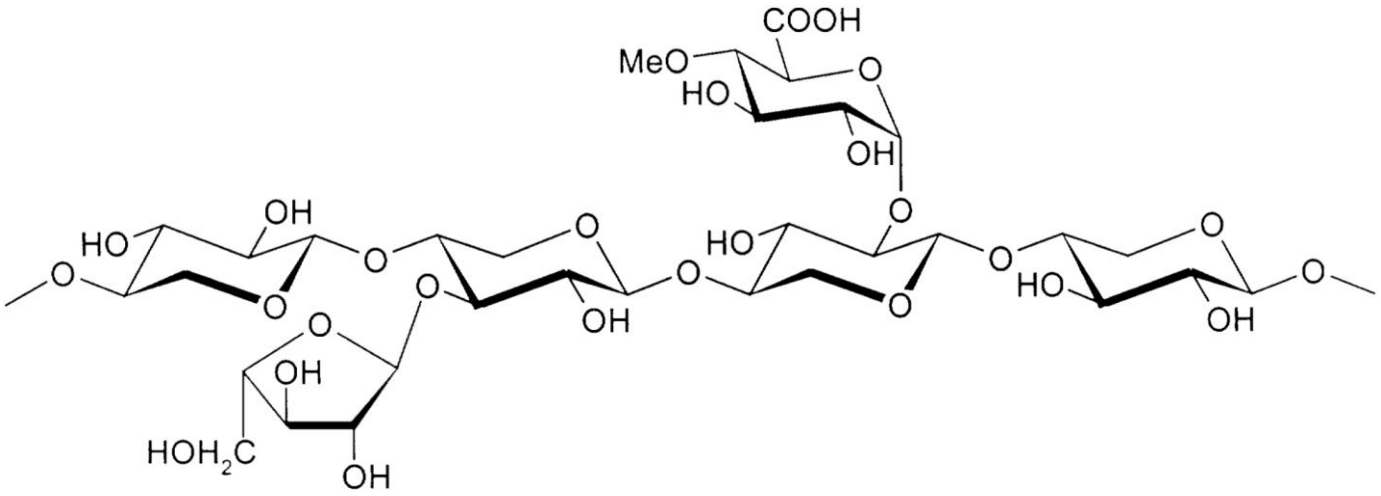


Acido 4-O-metil-D-glucuronico (C6)

2G-bioetanolo: struttura dell'emicellulosa

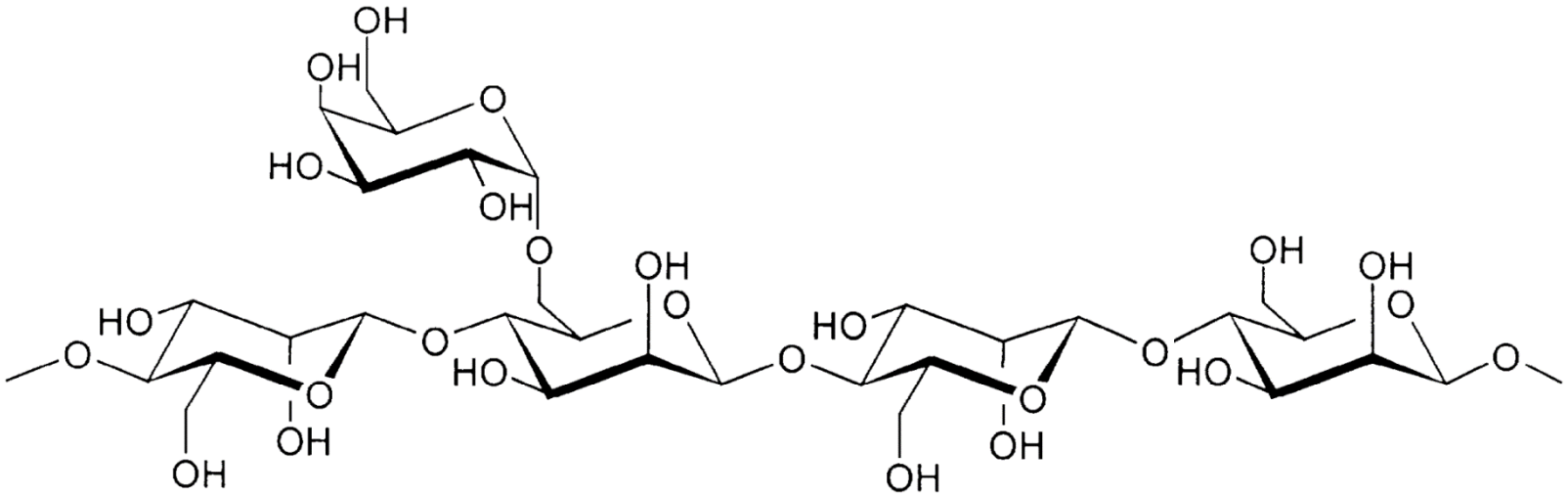


Struttura di un glucuronoxilano (GX)

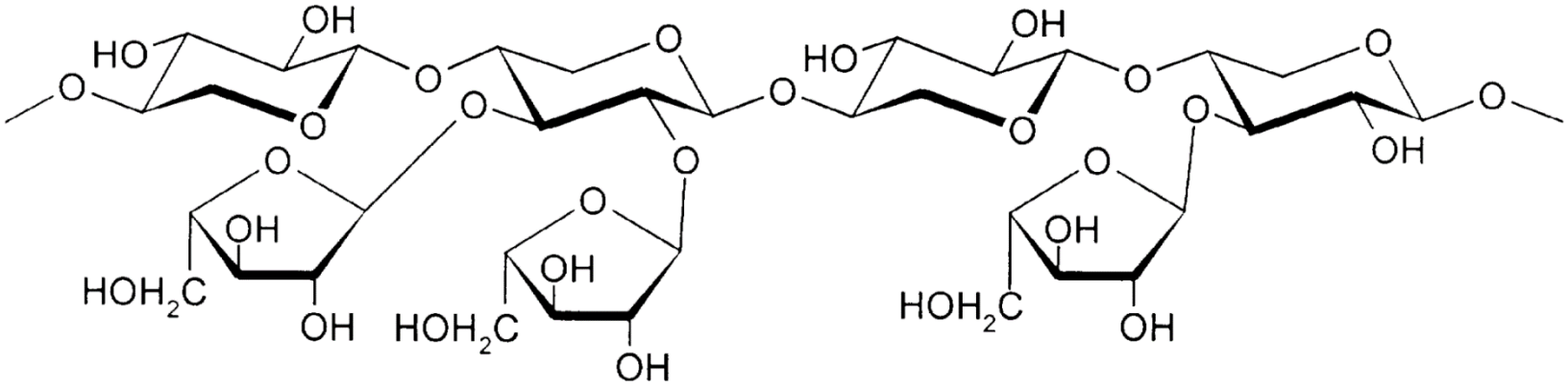


Struttura di un arabinoglucuronoxilano (AGX)

2G-bioetanolo: struttura dell'emicellulosa

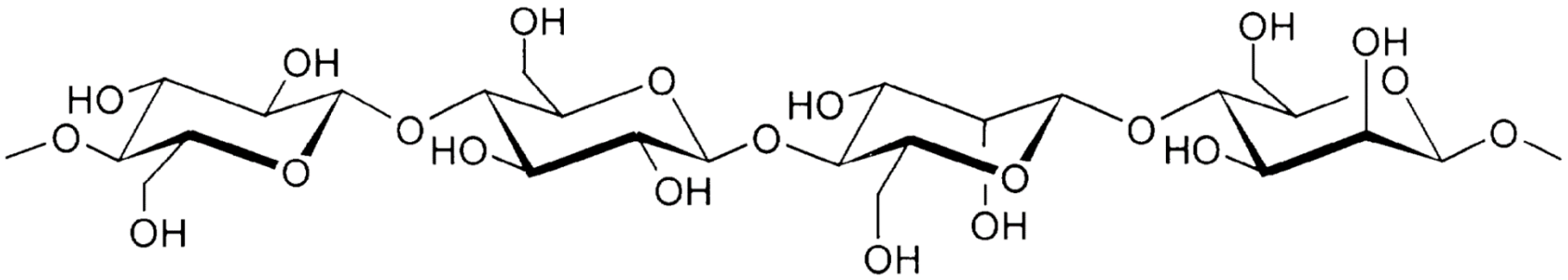


Struttura di un galattomannano (GaM)

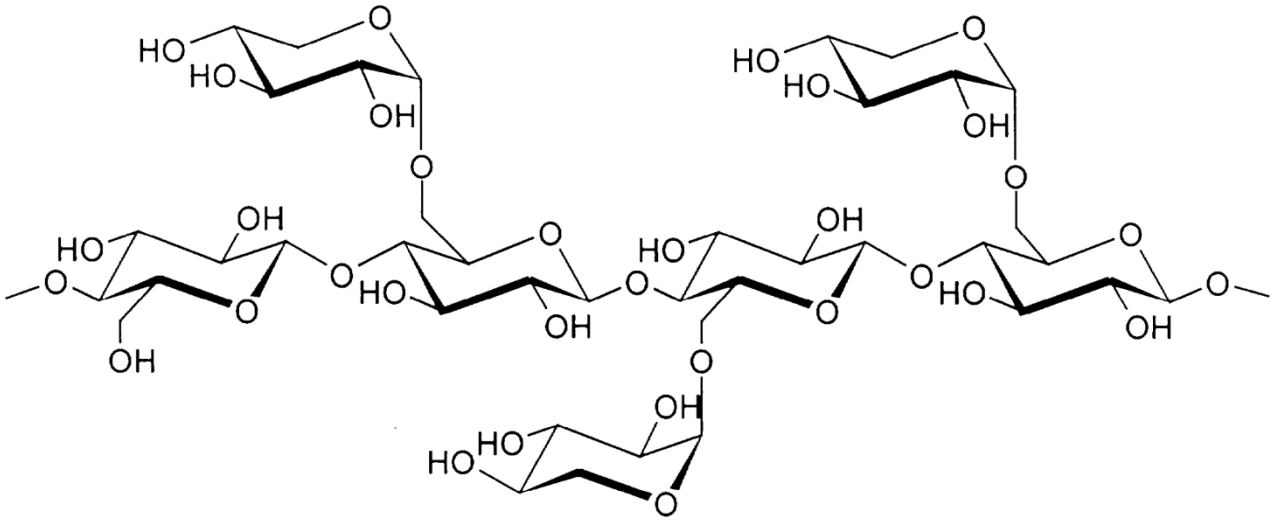


Struttura di un arabinoxilano (AX)

2G-bioetanolo: struttura dell'emicellulosa

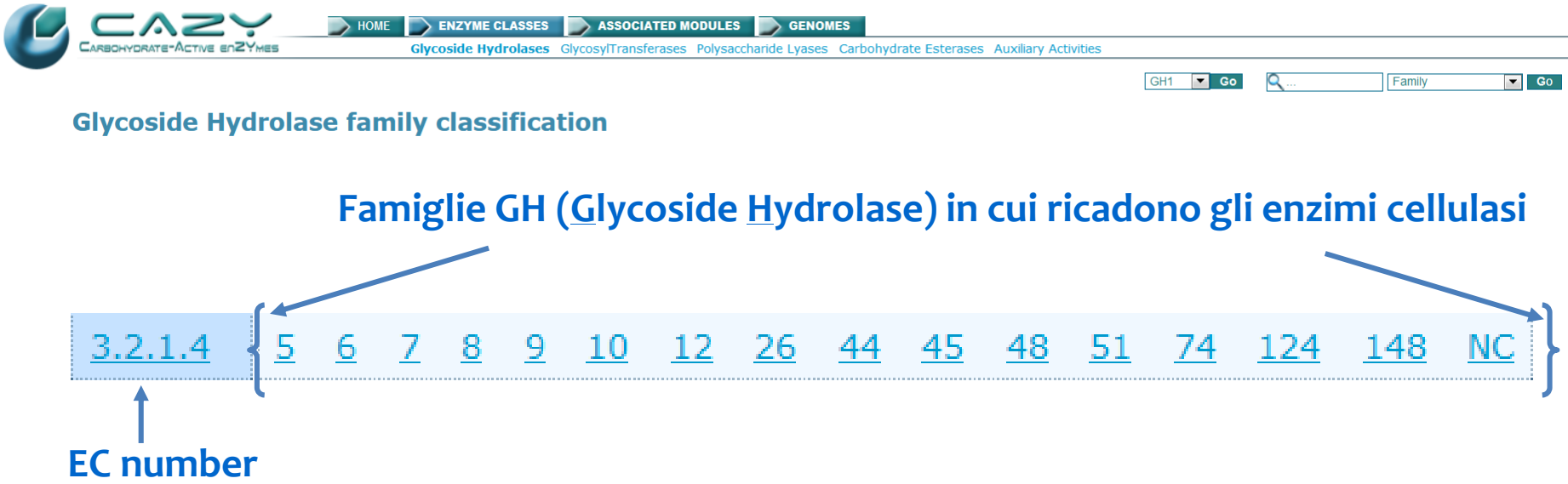


Struttura di un glucomannano (GM)



Struttura di uno xiloglucano (XG)

Enzimi e biomassa: le cellulasi

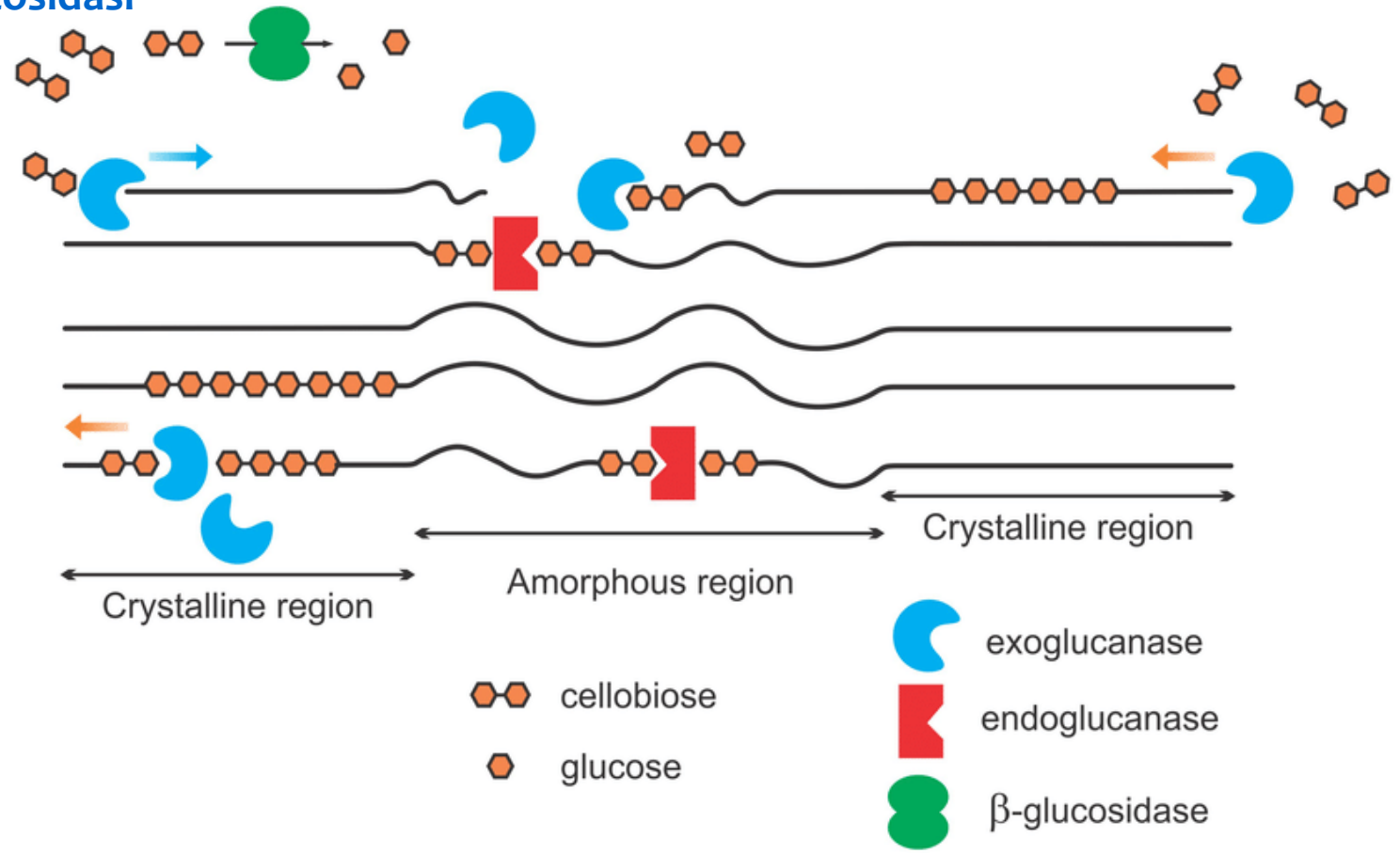


La maggior parte gli enzimi cellulasi sono prodotti da batteri (aerobi ed anaerobi) e funghi

2G-bioetanolo: digestione enzimatica della cellulosa

La degradazione della cellulosa richiede l'impiego di diversi enzimi ad attività cellulolitica:

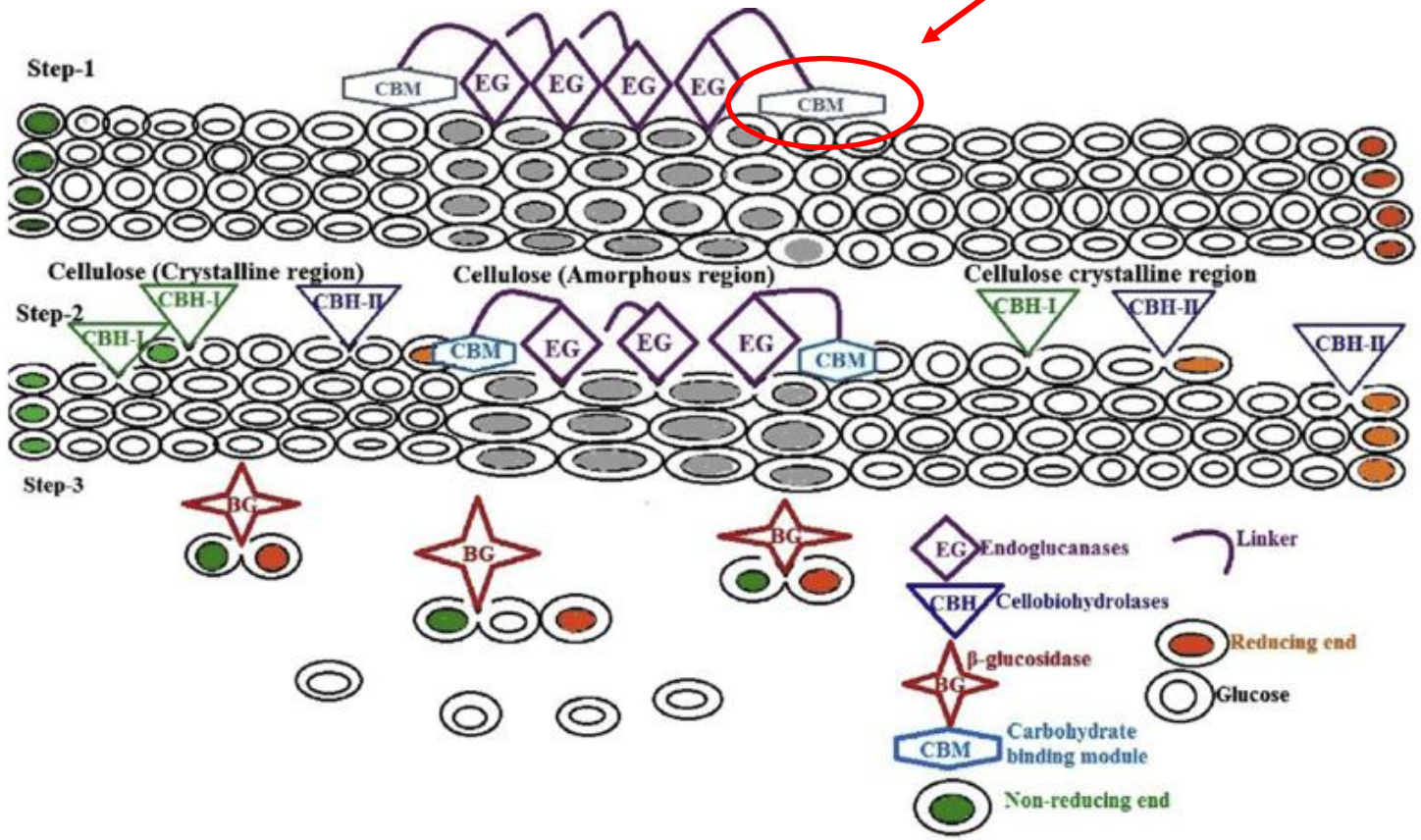
- **Endoglucanasi ed esoglucanasi**
- **Cellobioidrolasi**
- **β-glucosidasi**



2G-bioetanolo: digestione enzimatica della cellulosa

La degradazione della cellulosa richiede l'impiego di diversi enzimi ad attività cellulolitica:

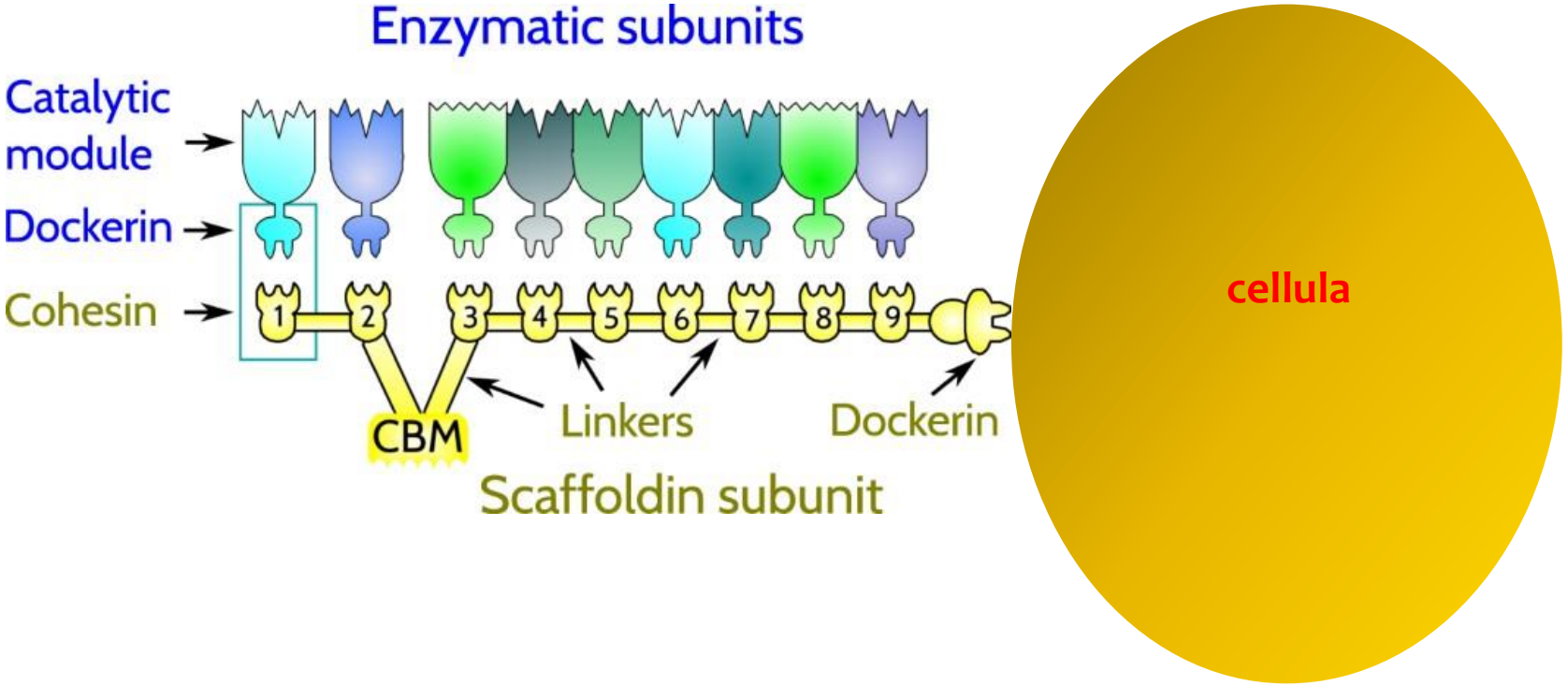
- **Endoglucanasi ed esoglucanasi (modulo di legame ai carboidrati CBM)**
- **Cellobioidrolasi**
- **β-glucosidasi**



2G-bioetanolo: digestione enzimatica della cellulosa

CELLULOSOMA

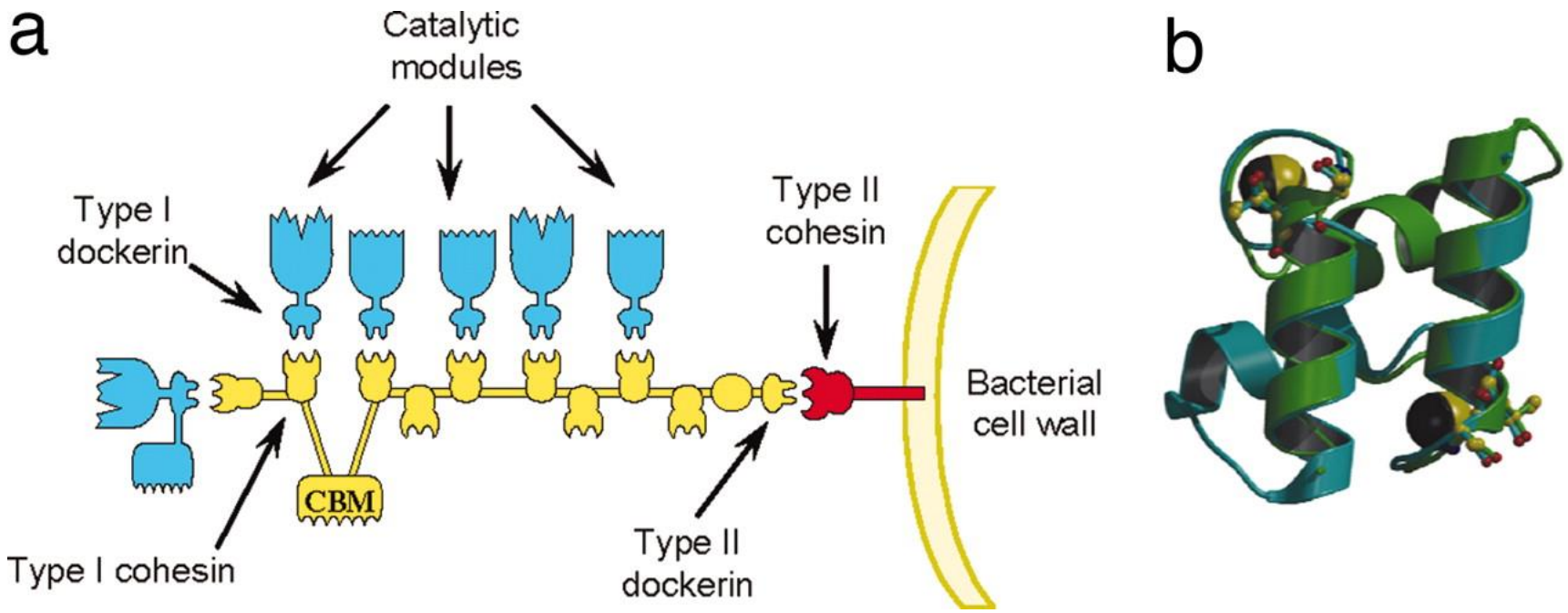
- **complesso multi-enzimatico extracellulare ad elevato peso molecolare, 3-80 MDa, prodotto da microrganismi anaerobi e funghi ruminali**
- **Le attività cellulasiche agiscono in sinergia ed in sequenza in quanto ancorate su uno scaffold proteico extracellulare**



2G-bioetanolo: digestione enzimatica della cellulosa

CELLULOSOMA

- **complesso multi-enzimatico extracellulare ad elevato peso molecolare, 3-80 MDa, prodotto da microrganismi anaerobi e funghi ruminali**
- **Le attività cellulasiche agiscono in sinergia ed in sequenza in quanto ancorate su uno scaffold proteico extracellulare**



2G-bioetanolo: la fermentazione dei monosaccaridi C5

Microorganismi in grado di fermentare i pentosi

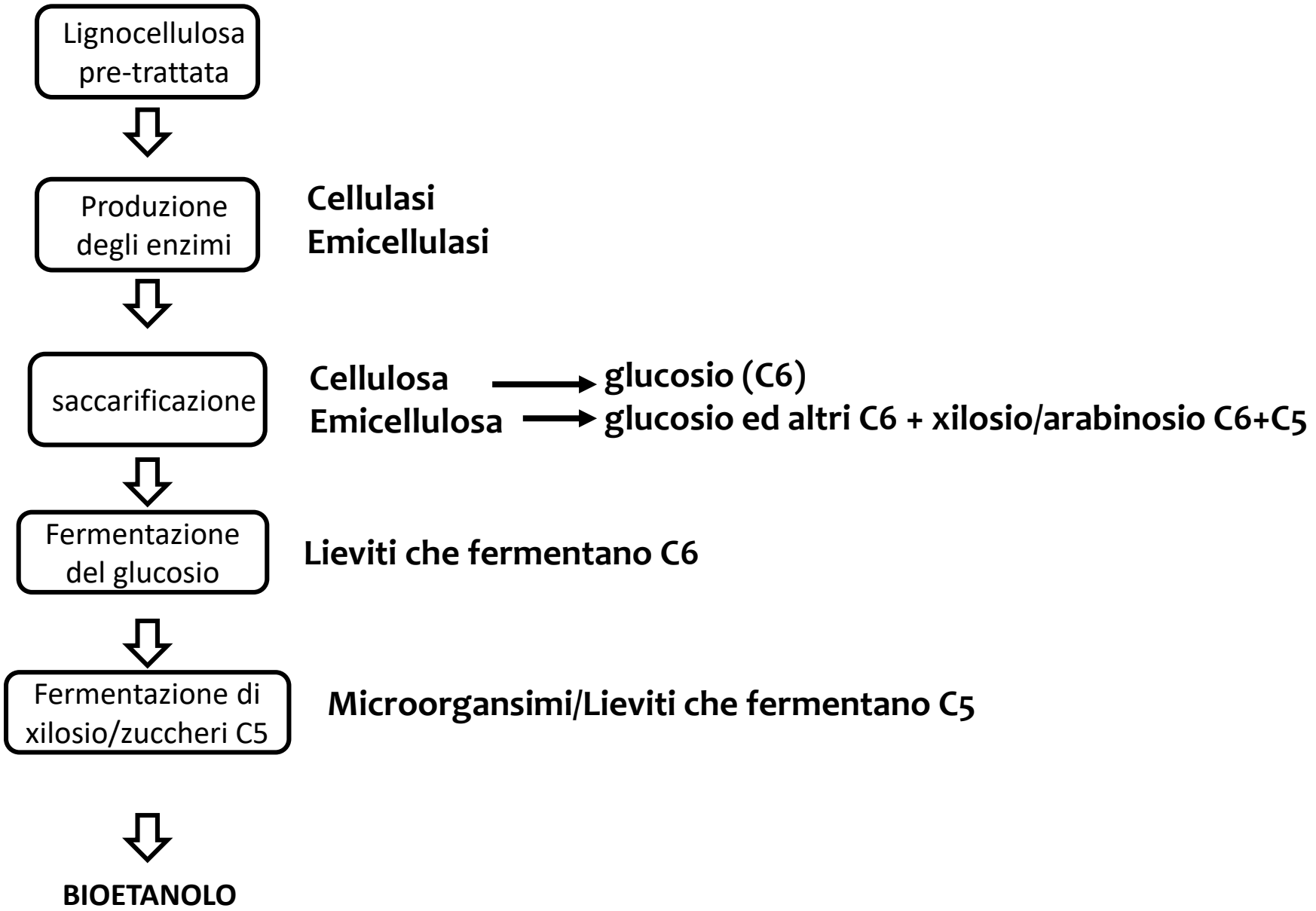
Microorganismi wild type dei generi:
Brettanomyces
Candida
Clavispora
Kluyveromyces
Pachysolen
Pichia
Schizosaccharomyces

Non fermentano C6!

Microorganismi ingegnerizzati dei generi:
Saccharomyces
Schizosaccharomyces

Fermentazione di C6 e C5

2G-bioetanolo: strategie per il miglioramento del processo

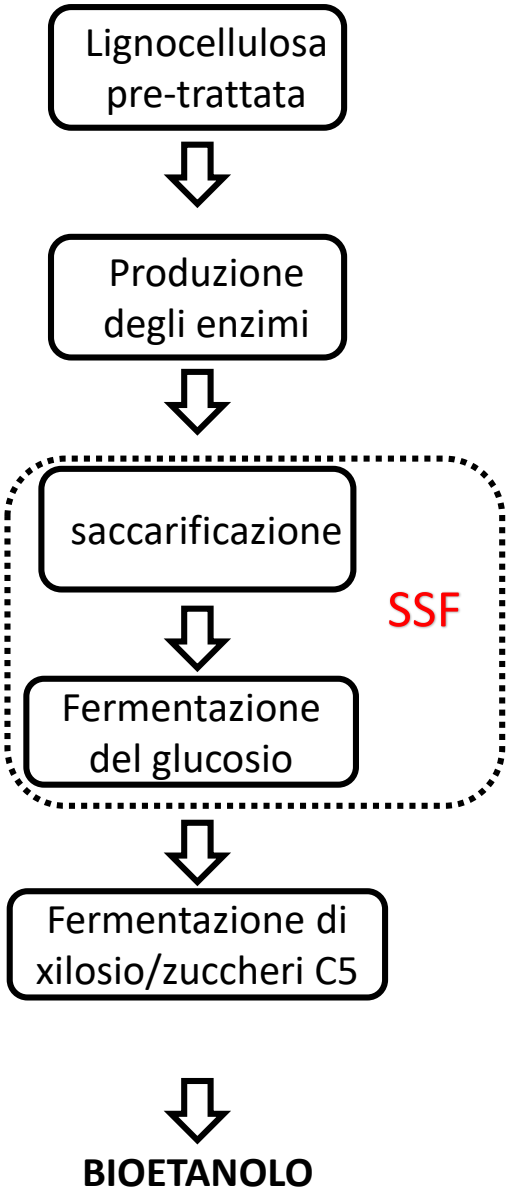


2G-bioetanolo: strategie per il miglioramento del processo

Processo attualmente usato:
SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation)

Saccarificazione e fermentazione sono condotti in step/bioreattori separati

2G-bioetanolo: strategie per il miglioramento del processo



SSF (Simultaneous Hydrolysis and Fermentation)

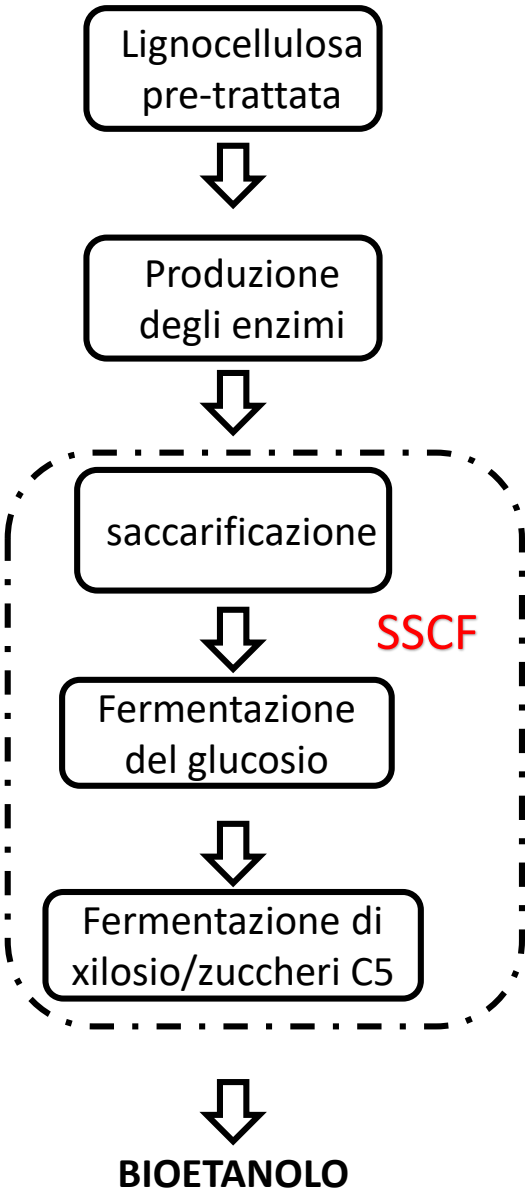
Idrolisi e fermentazione degli esosi in un singolo step

Microorganismi ingegnerizzati, ad esempio:

***Saccharomyces* (lieviti modificati per effettuare anche la digestione della cellulosa)**

***Zymomonas* (batteri cellulolitici modificati per effettuare anche la fermentazione del glucosio)**

2G-bioetanolo: strategie per il miglioramento del processo



SSCF (Simultaneous Hydrolysis and co-Fermentation)

Produzione degli enzimi, idrolisi e co-fermentazione degli esosi e dei pentosi in un singolo step

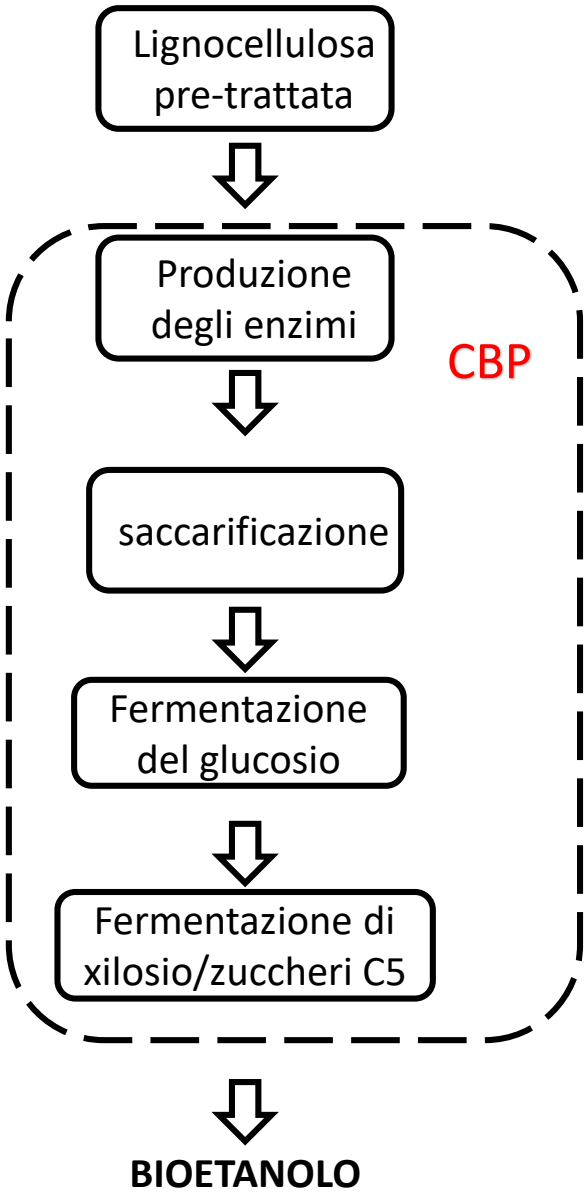
Microorganismi etanologeni e co-culture di micoorganismi che fermentano C5/C6

Etanologeni: Batteri in grado di condurre sia la saccarificazione che la fermentazione

Alcuni batteri appartenenti ai generi *Clostridria* e *Geobacillus*, sono in grado sia di produrre enzimi cellulasi che di fermentare gli esosi

Alcuni batteri appartenenti ai generi *Clostridria* e *Thermoanaerobacter* sono in grado di fermentare sia gli esosi che i pentosi

2G-bioetanolo: strategie per il miglioramento del processo



CBP (Consolidated BioProcessing)

Idrolisi e co-fermentazione degli esosi e dei pentosi in un singolo step

Microorganismi ingegnerizzati

Studi in corso usano etanologeni (in grado sia di produrre enzimi cellulasi che di fermentare gli esosi) e/o batteri che sono in grado di fermentare sia gli esosi che i pentosi

2G-bioetanolo: strategie per il miglioramento del processo

tipo di processo	Step del processo successivi al pretrattamento	Vantaggi	svantaggi
SHF	1. Produzione degli enzimi 2. Saccarificazione 3. Fermentazione degli esosi (C6) 4. Fermentazione dei pentosi (C5)	ogni step è condotto in un bioreattore distinto, per garantire le condizioni ottimali di pH e temperatura	Costi della produzione degli enzimi Il glucosio che si accumula durante la saccarificazione inibisce le cellulasi È necessario uno step di raffreddamento per consentire ai lieviti di fermentare il glucosio
SSF	1. Produzione degli enzimi 2. Saccarificazione e fermentazione dei C6 3. Fermentazione dei C5	No inibizione delle cellulasi	Costi della produzione degli enzimi Idrolisi e fermentazione non possono essere condotte entrambe alle condizioni ottimali
SSCF	1. Produzione degli enzimi 2. Saccarificazione e fermentazione simultanea di esosi e pentosi	No inibizione delle cellulasi Fermentazione di tutti gli zuccheri prodotti durante la saccarificazione	
CBP	Simultanea produzione degli enzimi idrolitici, saccarificazione e fermentazione di esosi/pentosi	No inibizione delle cellulasi Fermentazione di tutti gli zuccheri prodotti durante la saccarificazione	Non esiste ancora un microorganismo già disponibile