

Facoltà di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica



Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Relatore: Prof. Carlo MAZZOCCHIA

Co-relatore: Dott. Marco BERNARDI

Tesi di Laurea di: Marco CASTELLI – 783873

Anno Accademico 2013- 2014

Sommario

INTRODUZIONE.....	1
1. STATO DELL'ARTE	4
1.1. Biocarburanti	4
1.1.1. Biocarburanti di seconda generazione	8
1.1.2. Biomasse di seconda generazione lignocellulosiche	11
1.1.3. Bioraffinerie	18
1.2. Processi biochimici	23
1.2.1. Green Chemistry: Panoramica	25
1.2.2. Utilizzo degli enzimi come catalizzatori.....	26
1.2.3. Utilizzo di microrganismi	32
1.3. Sistemi di purificazione di idrolizzati di seconda generazione	34
1.3.1. Metodi fisici	36
1.3.2. Metodi chimici	37
1.3.3. Processi biotecnologici per la disintossicazione.....	39
2. MATERIALI E METODI	44
2.1. <i>Escherichia coli</i>	44
2.2. Idrolizzato PROESA®	48
2.2.1. Pretrattamento biomasse lignocellulosiche PROESA®	49
2.2.2. Idrolisi enzimatica della biomassa lignocellulosica	51
2.2.3. Composizione	52
2.3. Terreni	54
2.3.1. M9YE.....	54
2.3.2. LB	55
2.3.3. FERM-M	56
2.4. Analisi	56
2.4.1. Cromatografia.....	56
2.4.2. Densità ottica.....	59
2.4.3. Peso cellulare secco.....	60
2.5. Strumentazione Bio-Laboratorio	61
2.5.1. Incubatore agitante	61

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

2.5.2.	Bioreattore	63
2.6.	Valutazione effetto delle specie inibenti la crescita batterica	71
2.6.1.	Espansione inoculo	74
2.6.2.	Crescita	75
2.6.3.	Elaborazione dei dati	76
2.7.	Prove in bio-reattore	79
2.7.1.	Preparativa	82
2.7.2.	Crescita	86
2.7.3.	Elaborazione dei dati	88
2.8.	Metodologie di Purificazione.....	90
2.8.1.	Resine di scambio Ionico	90
2.8.2.	Filtrazione con membrane.....	94
2.9.	Procedure Laboratorio di Purificazione.....	100
2.9.1.	Prove in colonna con resine di scambio ionico	100
2.9.2.	Prove con Alfa Laval Pilot Unit 2,5''	104
3.	VALUTAZIONE EFFETTO DELLE SPECIE INIBENTI LA CRESCITA BATTERICA	109
3.1.	Valutazione dell'effetto dei tre singoli composti inibitori concentrati, in presenza di una concentrazione ridotta degli altri due composti studiati.....	111
3.2.	Valutazione dell'effetto della purificazione graduale di acido acetico o di acido formico, mantenendo la concentrazione di potassio costante	118
3.3.	Verifica delle ipotesi effettuate	126
3.4.	Valutazioni finali sull'effetto della concentrazione di acido acetico, acido formico e potassio sulla resa cellulare	130
4.	PURIFICAZIONE DELL'IDROLIZZATO PROESA®	134
4.1.	Decationizzazione	137
4.1.1.	Prova in laboratorio	138
4.1.2.	Processo pilota	143
4.2.	Filtrazione con membrana.....	146
4.3.	Risultati finali	151
5.	PROVA IN BIOREATTORE	154
5.1.	Crescita in Bioreattore con idrolizzato non purificato.....	157
5.1.1.	Prima fase batch	157

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

5.1.2.	Fase di alimentazione esponenziale e seconda fase batch	162
5.1.3.	Fase di alimentazione costante	166
5.1.4.	Valutazione finale	170
5.2.	Crescita in Bioreattore con idrolizzato purificato.....	171
5.2.1.	Prima fase batch	172
5.2.2.	Fase di alimentazione esponenziale e seconda fase batch	176
5.2.3.	Fase di alimentazione costante	180
5.2.4.	Valutazione finale	184
5.3.	Confronto della crescita con idrolizzato non purificato e con idrolizzato purificato	186
6.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	194

INTRODUZIONE

L'obiettivo di questo elaborato è stato quello di progettare un sistema di purificazione per la riduzione della concentrazione di sostanze, riconosciute come inibitori della crescita microbica, contenute all'interno di uno stream zuccherino di seconda generazione.

Tale progetto è stato effettuato in collaborazione con l'azienda Biochemtex Italia presso la sede R&D di Rivalta Scrivia (AL), dove è presente anche l'impianto pilota per la produzione di bioetanolo che sfrutta la tecnologia PROESA®.

PROESA® (PROduzione di Etanolo da biomassa) è una tecnologia che utilizza gli zuccheri presenti nelle biomasse lignocellulosiche per ottenere alcol, carburanti e altri prodotti chimici. Tale tecnologia utilizza esclusivamente biomasse che non derivano dallo sfruttamento dell'industria agro-alimentare, distinguendosi così dai processi di prima generazione, che sono in grado di ottenere etanolo ed altre sostanze, solo dalla parte commestibile delle piante (mais, canna da zucchero, grano, soia, ecc.). La piattaforma tecnologica PROESA® sfrutta quindi biomasse non ad uso alimentare, come, ad esempio, la paglia di riso e di frumento, la comune canna dei fossi (*Arundo Donax*), il tutolo del mais e la bagassa della canna da zucchero, denominate di "seconda generazione" proprio per distinguerle da quelle di prima generazione sopra citate.

Il processo PROESA® consente di ottenere zuccheri a partire da materiali "lignocellulosici", ovvero piante le cui cellule posseggono una parete organizzata in complesse strutture supramolecolari in cui le fibrille di cellulosa, macromolecola composta da unità monomeriche anidro glucosidiche, sono immerse in una matrice di emicellulosa e lignina, polimero aromatico complesso molto resistente e meno "digeribile".

Nella prima fase del processo PROESA® la biomassa viene sottoposta a pressioni e temperature molto elevate e a una successiva forte decompressione. Tale pretrattamento consente di separare l'emicellulosa dalla cellulosa e in parte dalla lignina. In seguito, la porzione insolubile (cellulosa e lignina) viene trattata con un cocktail di enzimi (prevalentemente cellulasi) che riducono il peso molecolare del polimero (idrolisi enzimatica), fino ad ottenere l'unità monomerica del glucosio. La sospensione così ottenuta viene sottoposta all'azione di lieviti (*saccharomices*) che, in un processo di fermentazione, trasformano il glucosio in etanolo ed anidride carbonica. La tecnologia PROESA® può però essere sfruttata non solo per la produzione di etanolo, ma anche per la bio-sintesi di svariati prodotti chimici di interesse commerciale utilizzando microrganismi opportunamente ingegnerizzati.

Il processo a cui la tecnologia PROESA® sottopone i materiali lignocellulosici, tuttavia, genera, oltre agli zuccheri d'interesse, anche alcuni sottoprodotti come acidi organici, fenoli ed altre sostanze, alcune delle

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

quali, a concentrazioni consistenti, possono inibire i processi di crescita microbica in cui si intende sfruttare gli zuccheri prodotti. In questo elaborato si riporta lo studio condotto presso Biochemtex orientato ad individuare una tecnologia di purificazione dello “stream” zuccherino da questa serie di composti indesiderati, migliorando di conseguenza le performance dell'idrolizzato enzimatico in fase di successiva fermentazione.

Nelle sperimentazioni condotte si è utilizzato lo stream di zuccheri di seconda generazione, denominato idrolizzato (in ragione del processo di idrolisi a cui viene sottoposta la cellulosa per ottenere gli zuccheri monomerici), proveniente dall'impianto pilota PROESA®, e, come anticipato, non si è perseguito l'obiettivo di una specifica produzione, ma si sono solo indagati gli effetti che varie tecniche di purificazione di tale stream hanno sulla crescita del/i microrganismo/i utilizzato/i in fase di fermentazione.

Per raggiungere tale obiettivo è stata condotta una prima attività in bio-laboratorio, per individuare e caratterizzare i principali inibitori contenuti all'interno dell'idrolizzato e determinarne l'effetto sui microorganismi.

Come anticipato gli zuccheri ottenibili dal processo PROESA® possono essere utilizzati come nutrienti per diversi microrganismi, batteri o lieviti, che grazie ad opportune ingegnerizzazioni genetiche permettono la sintesi dei prodotti di interesse. Sarebbe complesso ottenere dei risultati soddisfacenti considerando uno specifico microrganismo, ingegnerizzato alla produzione di uno specifico prodotto di bio-sintesi. Al fine quindi di rendere i risultati ottenuti da questo elaborato il più rappresentativi possibile, si è scelto di indagare l'effetto di questi inibitori sulla crescita di quello che, dalla biologia, è ritenuto un “microrganismo modello”, ovvero una specie che ben rappresenta il comportamento della maggior parte dei microrganismi comunemente studiati ed utilizzati, l'*Escherichia coli* MG1655.

Per questa valutazione preliminare si è scelto di studiare l'effetto della concentrazione dei tre principali inibitori contenuti all'interno dell'idrolizzato PROESA®, ovvero l'acido acetico, l'acido formico e il catione potassio, sulla crescita di *Escherichia coli* MG1655. Grazie ai risultati ottenuti in questa prima fase sperimentale, si è potuto stabilire i criteri principali da adottare per l'eventuale processo di purificazione.

È stato inoltre elaborato uno schema che permettesse di ipotizzare il reale beneficio che un sistema di purificazione avrebbe potuto apportare al processo di crescita, semplicemente conoscendo il grado di purificazione (%) che tale metodologia avrebbe potuto garantire in termini di rimozione di una delle tre specie indagate.

Sono stati quindi testati differenti sistemi di purificazione, in scala di laboratorio, per ridurre la concentrazione dei principali inibitori all'interno dello stream zuccherino PROESA®, ed in base ai risultati

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

ottenuti nella prima fase sperimentale, senza ricorrere più a sperimentazioni sull'idrolizzato, si è stabilito l'entità del beneficio ottenibile dalla purificazione.

Attraverso alcune valutazioni di tipo processistico-economiche è stato quindi selezionato un sistema di purificazione che, oltre a garantire un effettivo beneficio sulla crescita microbica di *Escherichia coli* MG1655, non comportasse un eccessivo onere economico, in relazione sia ai costi di investimento, che di processo. Tale sistema di purificazione è stato quindi adottato in scala pilota utilizzando le apparecchiature presenti all'interno degli stabilimenti R&D della Biochemtex Italia.

L'idrolizzato prodotto utilizzando la tecnologia di purificazione sperimentale scelta è stato quindi utilizzato come fonte di zuccheri in un processo di crescita di *Escherichia coli* MG1655, in confronto ad una crescita condotta utilizzando un idrolizzato tal quale, che non ha quindi subito i medesimi processi di purificazione. Nella terza parte dell'elaborato vengono descritte quindi le prove di crescita condotte di tale microorganismo in bio-reattori della dimensione di 2 litri. I risultati ottenuti utilizzando come fonte di zuccheri l'idrolizzato purificato, sono stati comparati quindi con quelli ottenuti sull'idrolizzato originario.

Grazie a queste ultime sperimentazioni è stato quindi possibile valutare la bontà del metodo predittivo e l'effettivo beneficio del sistema di purificazione adottato sulla crescita del microorganismo "modello".

1. STATO DELL'ARTE

Stiamo entrando in un periodo della nostra storia molto particolare, si aprono infatti di fronte a noi due differenti strade, continuare a dipendere esclusivamente dalle fonti fossili, oppure cercare di creare un portfolio più bilanciato, che integri anche fonti di tipo rinnovabile. È ormai consolidata infatti l'importanza delle fonti rinnovabili, che permetteranno di integrare i sistemi energetici a base di fonti fossili ed, in alcuni casi, persino di sostituirli.

1.1. Biocarburanti

Con il termine "biocarburante" si intende un carburante liquido o gassoso utilizzato nei trasporti, ottenuto mediante la trasformazione di biomasse di diversa natura

La definizione di biomassa data dalla direttiva 2001/77/CE sulla promozione dell'energia elettrica prodotta da fonti rinnovabili e recepita a livello nazionale dal decreto legislativo 29 dicembre 2003, n. 387, riunisce un'ampia categoria di materiali di origine vegetale e animale, compresa la parte biodegradabile dei rifiuti. Per semplicità le biomasse idonee alla trasformazione energetica (sia quelle direttamente combuste che quelle trasformate in un combustibile solido, liquido o gassoso) possono essere suddivise per comparto di provenienza nei seguenti settori:

- ✓ *Comparto forestale e agroforestale*: residui delle operazioni selvicolturali o delle attività agroforestali, utilizzazione di boschi cedui, ecc.;
- ✓ *Comparto agricolo*: residui colturali provenienti dall'attività agricola e dalle colture dedicate di specie lignocellulosiche, piante oleaginose, per l'estrazione di oli e la loro trasformazione in biodiesel, piante alcoligene per la produzione di bioetanolo;
- ✓ *Comparto zootecnico*: reflui zootecnici per la produzione di biogas;
- ✓ *Comparto industriale*: residui provenienti dalle industrie del legno o dei prodotti in legno e dell'industria della carta, nonché residui dell'industria agroalimentare;
- ✓ *Rifiuti urbani*: residui delle operazioni di manutenzione del verde pubblico e frazione umida di rifiuti solidi urbani.

Si comprende quindi che nel termine biomassa sono raggruppati materiali che possono essere anche molto diversi tra loro per caratteristiche chimiche e fisiche. Di conseguenza anche le loro utilizzazioni, a fini energetici, possono essere molteplici. I processi di trasformazione possono essere raggruppati in due diverse

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

categorie: i processi di conversione biochimica che permettono di ricavare energia attraverso reazioni chimiche dovute alla presenza di enzimi, funghi e altri microorganismi e i processi di conversione termochimica che hanno come fondamento l'azione del calore che permette lo sviluppo di reazioni chimiche da cui recuperare energia.

I fattori discriminanti che indirizzano la scelta verso uno dei due processi sono il rapporto carbonio/azoto (C/N) e il tenore di umidità alla raccolta: quando il rapporto C/N è inferiore a 30 e il contenuto di umidità supera valori del 30% si utilizzano generalmente processi biochimici, in caso contrario sono più idonei processi termochimici.

Nella scelta tra tutti i biocarburanti definiti tali a livello europeo, in Italia si propende principalmente, attraverso precise disposizioni normative, ad impiegare il biodiesel e il bioetanolo, in genere previa trasformazione in derivati (bio-eteri) come l'ETBE (etil-*ter*-butil etere) e, in misura minore, il TAE (etil-*ter*-amil etere). Nel decreto legislativo n. 28 del 3 marzo 2011, che recepisce la Direttiva europea del 2009 sullo sviluppo delle fonti di energia rinnovabili (la cosiddetta "Direttiva RED" ovvero "Renewable Energy Directive") è inoltre prevista l'emanazione di specifiche misure legislative e normative per favorire la produzione e l'impiego del biometano, ottenuto mediante "upgrading" del biogas, in sostituzione del metano di origine fossile.¹

La direttiva impone un obiettivo politico ambizioso per il settore dei trasporti: il raggiungimento complessivo del 10% per la quota di energia da fonti rinnovabili nel settore dei trasporti nel 2020. Per fare un confronto, nel 2010 in media nell'UE la quota delle energie rinnovabili nel settore dei trasporti è stata del 4,7%. La direttiva richiede anche agli Stati membri di presentare piani nazionali per il raggiungimento di tale scopo (National Renewable Energy Action Plans, NREAPs), che definisce tra l'altro il contributo previsto di ciascuna tecnologia di energia rinnovabile per soddisfare gli obiettivi del 2020 nel settore dei trasporti.

L'utilizzo dei biocarburanti nel settore dell'autotrazione interessa una vasta gamma di soluzioni praticabili che prevedono la miscelazione con i carburanti fossili, a basse concentrazioni nei motori tradizionali, a medie concentrazioni, richiedendo solo una lieve modifica dei motori utilizzati, fino ad arrivare all'impiego di biocarburante puro per alcune categorie di veicoli appositamente progettati. Secondo i NREAPs, biodiesel e bioetanolo/bioETBE saranno adibiti ad occupare la quota maggiore (oltre il 85%) delle energie rinnovabili utilizzate nel settore dei trasporti nel 2020, seguito da altri tipi di biocarburanti e di energia elettrica da fonti rinnovabili, la maggior parte dei quali sarà però adibito al trasporto ferroviario elettrico. L'impiego di idrogeno da fonti rinnovabili in tali piani rappresenta al momento solo una percentuale trascurabile.

¹ The state of renewable Energy in Europe, EurObserv'ER, 2012;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

In Europa il Biodiesel è ancora il biocombustibile più impiegato, in ragione del 78,2% rispetto al bioetanolo che rappresenta invece il 20,9%. Il consumo del Biogas come biocombustibile è una prerogativa della sola Svezia (0,5%).

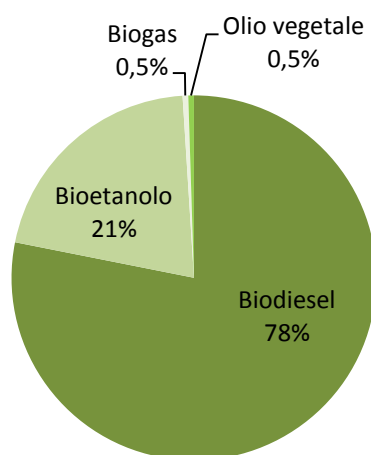


Figura 1: Consumi di biocombustibili in Europa 2010²;

Il biodiesel è un combustibile liquido costituito da una miscela di esteri metilici di acidi grassi (in inglese “FAME” - Fatty Acid Methyl Ester) di origine vegetale o animale, utilizzabile, puro o in miscela con il gasolio, per l’alimentazione di motori a combustione interna a ciclo diesel.

La produzione del biodiesel è un processo industriale in cui un olio vegetale è fatto reagire in eccesso di alcol metilico in un processo catalizzato di transesterificazione, che si avvale di tecnologie consolidate e si realizza in impianti di diversa taglia. La scelta della tecnologia da utilizzare è determinata, a seconda dei casi, dalla valutazione delle capacità produttive desiderate, dalla natura e qualità delle materie prime che si intende utilizzare e dall’entità dell’investimento economico previsto.

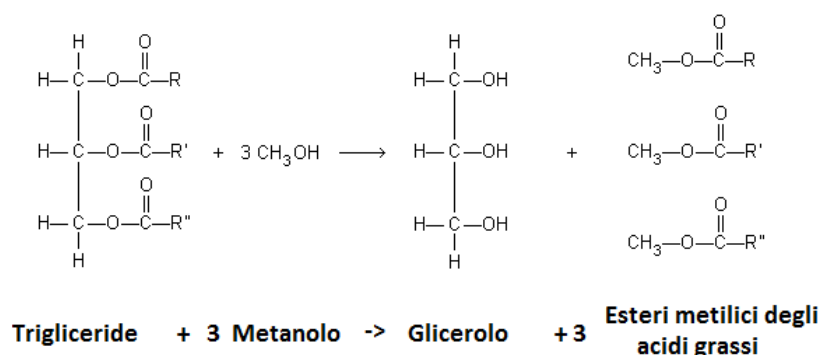


Figura 2: Schematizzazione Transesterificazione di trigliceridi;

² Fonte: The state of renewable Energy in Europe, EurObserv'ER, 2012;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

La produzione industriale del biodiesel viene effettuata a partire da oli vegetali estratti da semi o frutti oleosi di colture dedicate (colza³, soia, girasole, palma da olio, alghe, ecc.), da oli alimentari esausti rigenerati o, in misura minore, da grassi animali di scarto dei processi di macellazione e lavorazione delle carni.

Il principale sottoprodotto della reazione è il glicerolo (nel processo è ottenuto come soluzione acquosa (glicerina) a seguito del trattamento con acqua in cui è molto solubile), che deve essere sottoposto ad un adeguato trattamento di purificazione prima di essere rivenduto all'industria chimica, che lo utilizza direttamente come materia prima in diversi processi (produzione di saponi, cosmetici, prodotti farmaceutici, esplosivi, ecc.).

A differenza del biodiesel, il bioetanolo, che è stato il primo combustibile liquido distribuito pubblicamente per l'alimentazione dei motori a scoppio degli autoveicoli ed è attualmente il biocarburante più utilizzato a livello mondiale, viene ottenuto per fermentazione degli zuccheri contenuti in biomasse vegetali di varia natura (zuccherine, amilacee o lignocellulosiche) e quindi un chiaro esempio di applicazione delle biotecnologie alla produzione di energia.

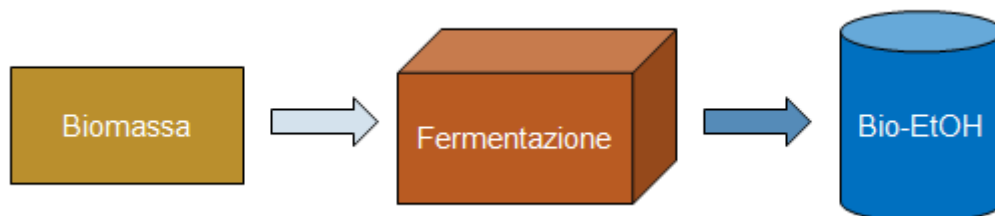


Figura 3: Schema semplificato del processo di produzione del bioetanolo (EtOH);

Quando la materia prima è una coltura zuccherina (canna da zucchero, barbabietola, sorgo, ecc.), si procede con la semplice estrazione degli zuccheri per spremitura e/o diffusione in soluzione acquosa, seguita dalla fermentazione alcolica, mentre i carboidrati complessi come l'amido, l'inulina e la cellulosa richiedono un trattamento preliminare di idrolisi, cioè di degradazione del polimero ad una soluzione di zuccheri semplici. Se si ha a che fare con materie prime amilacee (cereali, patate) o ricche di inulina e altri polimeri a base di fruttosio (topinambur, cicoria da inulina), l'idrolisi viene in genere effettuata per mezzo di enzimi (amilasi, inulinasi, glucoamilasi, ecc.) che reagiscono con il substrato finemente macinato, portato in soluzione acquosa e riscaldato fino a 90 °C e oltre, mentre l'idrolisi della cellulosa è un processo molto più complesso, solo recentemente proposto su scala industriale. Le soluzioni di zuccheri semplici (glucosio,

³ La colza (*Brassica napus* o *Brassica napus oleifera*) è una pianta, dal fiore giallo brillante (o bianco a seconda della varietà), appartenente alle Brassicaceae;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

xilosio, fruttosio e saccarosio) provenienti dall'idrolisi sono poi avviate alla fermentazione ad opera di lieviti come il *Saccharomyces cerevisiae* o altri microrganismi, ottenendo alla fine una soluzione di etanolo in acqua ad una concentrazione generalmente compresa fra il 9 e il 14% in volume.

Il processo di produzione del bioetanolo genera, a seconda della materia prima agricola utilizzata, diversi sottoprodotti con valenza economica destinabili alla mangimistica, alla cogenerazione, o riutilizzati all'interno del processo stesso.

A differenza del biodiesel, l'uso dell'etanolo in miscela con la benzina presenta alcuni problemi di compatibilità perché può dare luogo a fenomeni di smiscelazione in presenza di acqua e alla formazione di azeotropi volatili con gli idrocarburi più leggeri (butano), sostanzialmente dovuti alla diversa struttura chimica dei due prodotti.

Per questi motivi, in Europa e nel nostro paese, si tende ad impiegare l'etanolo non miscelandolo direttamente con la benzina, ma sotto forma di derivati (eteri) di cui il più importante è l'ETBE, ottenuto dalla reazione dell'alcol etilico con l'isobutene, un sottoprodotto proveniente dai processi di cracking e raffinazione del petrolio o dal gas butano o naturale.⁴

Quando l'alcol impiegato per la sintesi dell'ETBE è bioetanolo (dove il prefisso bio- distingue l'etanolo ottenuto dalla biomassa da quello di origine fossile prodotto per idratazione dell'etilene), si parla più propriamente di bio-ETBE. Poiché alla sua sintesi chimica partecipa anche l'isobutene, di origine petrolifera, il bio-ETBE è considerato biocarburante solo per una frazione pari al 47% in peso.

Per quel che riguarda infine il biometano, è opportuno ricordare che questo biocarburante è presente attualmente sul mercato in quantitativi ancora limitati, e copre circa lo 0,5% del consumo totale di biocarburanti a livello europeo.

Fra tutti i paesi che hanno avviato la produzione di biometano, l'unico a privilegiarne decisamente l'impiego come carburante per i trasporti è la Svezia, dove il biometano alimenta camion per la raccolta dei rifiuti, autobus per il trasporto pubblico e auto private, ed è ovviamente presente una rete di distributori di questo biocarburante.

1.1.1. Biocarburanti di seconda generazione

Con la sola, ma poco rilevante, eccezione del biometano, tutti i biocarburanti attualmente distribuiti su larga scala sono ricavati a partire da colture ben note: oleaginose come colza, soia, girasole e palma da olio o zuccherine come mais, grano, barbabietola e canna da zucchero. Si tratta in tutti i casi di colture

⁴ Speciale, Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile, 2013, ENEA anno 59;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

largamente diffuse e utilizzate prevalentemente a fini alimentari, sia nel nostro paese che in altri contesti europei ed extra-europei. In questo caso si usa parlare di biocarburanti di prima generazione, in quanto prodotti da biomasse legate in qualche modo alla filiera alimentare dell'uomo.

L'attuale tendenza ad incorporare percentuali crescenti (ma, tutto sommato, limitate) di questi prodotti in benzina e gasolio va incontro all'esigenza del sistema produttivo agricolo di diversificare le proprie produzioni e di utilizzare grandi estensioni di terreni non più destinabili alla produzione di risorse alimentari. Ovviamente, questa convergenza di interessi è valida solo fino ad un certo punto perché, con l'aumentare della richiesta, si rischia di innescare una pericolosa competizione fra le possibili destinazioni alternative efficacemente sintetizzata dall'espressione "food vs. fuel".

Questa preoccupazione è fortemente sentita a livello europeo, al punto che, in sede di revisione e aggiornamento della Direttiva n. 28 del 2009 sulla promozione delle fonti rinnovabili di energia (Direttiva RED), che prevede l'obbligo di coprire nel 2020 il 10% dei consumi energetici nel settore dei trasporti con energie rinnovabili, è attualmente in discussione la proposta di limitare al 5% il contributo dei biocarburanti ottenuti a partire da materie prime a possibili destinazione alimentare, coprendo il restante 5% con elettricità da fonti rinnovabili e biocarburanti cosiddetti "di seconda generazione". Questa comune denominazione raggruppa in realtà un gran numero di prodotti, ottenibili da diverse materie prime con una varietà di processi a diversi stadi di sviluppo (dal laboratorio all'impianto dimostrativo pre-commerciale), ma nessuno ancora presente sul mercato in quantità significative.

Tabella 1: tipologie di Biocarburanti di seconda generazione⁵;

TIPOLOGIA	BIOCARBURANTE	MATERIA PRIMA	PROCESSO PRODUTTIVO
Bioetanolo	Etanolo da cellulosa	Materiali lignocellulosici	Idrolisi enzimatica e fermentazione
Biocarburanti da sintesi	Fischer-Tropsch diesel; Biometanolo; Alcoli superiori; DME;	Materiali lignocellulosici	Gassificazione e sintesi
Biodiesel	Hydrodiesel; Greendiesel;	Oli e grassi vegetali e animali; Materiali Lignocellulosici; Microalghe	Idrogenazione catalitica; Pirolisi; Coltivazione ed estrazione;
Metano	SNG	Materiali lignocellulosici	Gassificazione e sintesi
Idrogeno	Bioidrogeno	Materiali lignocellulosici; Biomasse fermentescibili;	Gassificazione e separazione; fermentazione anaerobica;

Denominatore comune delle filiere dei biocarburanti di seconda generazione è comunque l'uso come materia prima di substrati generalmente non utilizzabili a fini alimentari (ad esempio, materiali

⁵ Fonte: Speciale, Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile, 2013, ENEA anno 59;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

lignocellulosici e oli non commestibili) o prodotti comunque in aree diverse da quelle tradizionalmente destinate alle produzioni agricole convenzionali, come ad esempio le colture di microalghe.

Le tecnologie utilizzate per la produzione di biocarburanti di seconda generazione sono sia termochimiche (gasificazione, pirolisi, idrogenazione catalitica ecc.), che di natura biologica. Questa seconda categoria comprende tutti quei processi basati sull'uso di microrganismi (fermentazioni aerobiche e anaerobiche) ed enzimi (idrolisi della cellulosa), che sono tipici esempi di applicazione delle biotecnologie, sia per quel che riguarda le colture microbiche, sia relativamente agli aspetti più propriamente legati alla tecnologia di processo.

Una fra le applicazioni potenzialmente più interessanti delle biotecnologie per la produzione di bioenergia è, infine, la produzione di biocombustibili liquidi da colture di microalghe, attualmente oggetto di interesse e di numerose attività sperimentali di ricerca, sviluppo e dimostrazione in diverse parti del mondo.

Questi organismi sono infatti in grado di sintetizzare ed accumulare grandi quantità di lipidi, utilizzabili per la produzione di biocarburanti con processi convenzionali (biodiesel) o innovativi, e questa modalità di produzione, i cui prodotti finali vengono spesso indicati come "biocarburanti di terza generazione", appare particolarmente promettente in quanto le rese ottenibili per ettaro di superficie messa a coltura con microalghe sono stimate intorno alle 30 tonnellate di olio/anno, valore che è circa di un ordine di grandezza superiore alla migliore resa produttiva delle piante oleaginose terrestri (olio da coltivazioni di palma in ambienti tropicali: 4-5 t/ha/anno).⁶

Rese così elevate non sono però in grado di assicurare di per sé una convenienza economica per l'impresa che decida di avviarne la produzione. Infatti sia le poche esperienze finora realizzate a livello di impianti pilota, che gli studi e simulazioni effettuati estrapolando i dati ottenuti in laboratorio fanno comprendere che i costi degli impianti di coltivazione delle microalghe e quelli relativi all'insieme dei processi di downstream (recupero della biomassa, estrazione e purificazione della componente lipidica) siano ancora troppo alti, anche a causa delle elevate richieste energetiche del processo.

Inoltre, per ottenere produzioni significative, le estensioni ed i volumi delle colture algali devono raggiungere valori ragguardevoli, dell'ordine minimo di svariati ettari se si parla di coltivazioni in vasche (open ponds), e quindi tali da porre, oltre ai problemi di natura tecnologica e di bilanci energetici ed economici, anche una serie di pressioni sull'ambiente ospitante le coltivazioni e su quello circostante.

Per raggiungere, quindi, l'obiettivo di un bilancio economico ed energetico favorevole è necessario agire sia sul versante dell'incremento di produttività, cercando di riprodurre a livello di impianto i risultati ottenuti alla scala di laboratorio, sia sugli aspetti più propriamente ingegneristici del processo, per arrivare ad una

⁶ Biotecnologie per la bioenergia, Vito Pignatelli, ENEA anno 59;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

semplificazione e standardizzazione della componente impiantistica, contenendo significativamente i relativi costi.

Una possibile soluzione intermedia, praticabile nel breve-medio periodo e in grado di ovviare alla mancanza, a livello mondiale, di tecnologie consolidate per la produzione intensiva su larga scala di biomassa microalgale a basso costo potrebbe essere quella di realizzare impianti su piccola/media scala per la produzione di microalghe da destinare alla produzione di biogas, che, oltre a non richiedere alcun processo di frazionamento e recupero di singole componenti della biomassa, presenterebbero il valore aggiunto della depurazione di acque reflue e dell'assorbimento di CO₂, inclusa parte di quella prodotta dai cogeneratori, e consentirebbero di produrre energia in modo più semplice e con minori input energetici e standard qualitativi della biomassa prodotta rispetto a quanto richiesto per la produzione di biodiesel.

1.1.2. Biomasse di seconda generazione lignocellulosiche

La difficoltà più consistente legata all'utilizzo di materiale lignocellulosico risiede nella struttura più complessa e difficile da pretrattare e nella necessità di utilizzare tecnologie meno consolidate di quelle viste per le biomasse zuccherine e amidacee. La particolare resistenza alla degradazione mostrata dai materiali lignocellulosici risiede nella loro composizione: dovendo la parete delle cellule vegetali conferire rigidità, essa si compone in modo simile ai materiali compositi inventati dall'uomo di strutture di rinforzo, le microfibrille di cellulosa ad elevata cristallinità, in una matrice amorfa di lignina ed emicellulosa che le ben compenetra molto bene.

Indipendentemente dalla loro provenienza, le biomasse di tipo legnoso/erbaceo (forestali o agricole), meritano un'attenzione più dettagliata ai fini di questo elaborato. Come già accennato le componenti principali di questo genere di biomasse sono tre: la lignina, l'emicellulosa e la cellulosa. In questo paragrafo le componenti verranno descritte in maniera più dettagliata, evidenziando quelle che sono le caratteristiche chimiche e biologiche di queste tipologie di polimeri naturali.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

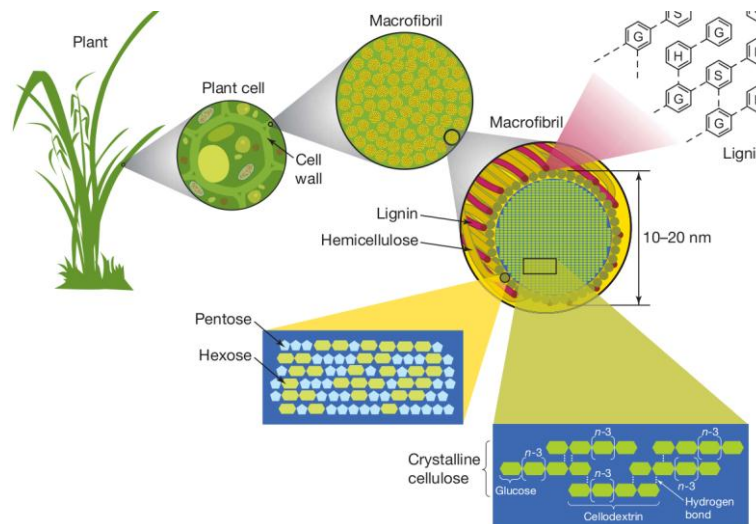
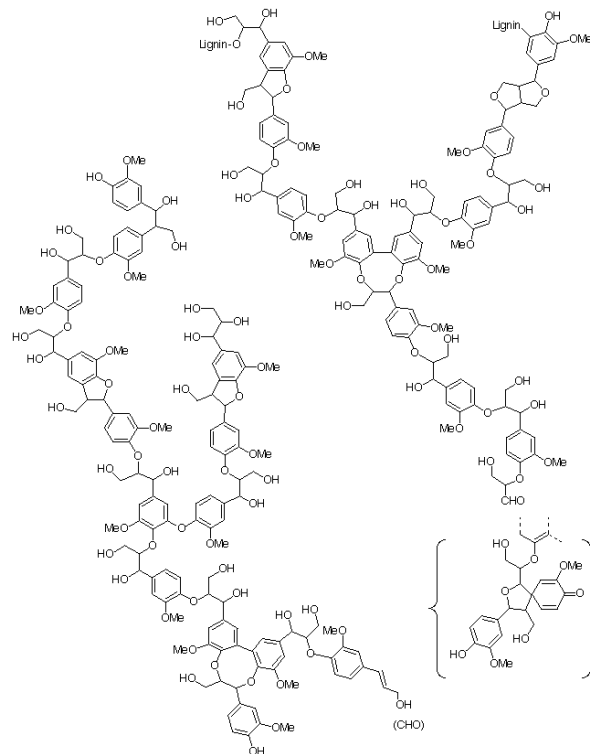


Figura 4: Schematizzazione dell'organizzazione dei polimeri naturali cellulosa, emicellulosa e lignina nella parete cellulare delle piante.

- ✓ **Lignina.** Complesso polimero organico a struttura amorfa costituito principalmente da composti fenolici (non sostituiti o sostituiti da uno o due gruppi metossi in posizione orto al fenolo), legati tramite una catena di tre atomi di carbonio. La lignina nella struttura vegetale svolge una le funzioni di impermeabilizzante, di sostegno e di protezione nei confronti di attacchi biotici e abiotici. Sul totale del peso secco il suo contenuto varia dal 9 al 30% a seconda che si considerino piante erbacee o legnose. Maggiore è il contenuto di lignina, più severe sono le condizioni del pretrattamento che miri a destrutturarla per liberare il substrato zuccherino in essa racchiuso.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Figura 5: Rappresentazione della lignina;

- ✓ **Emicellulosa.** Eteropolisaccaride ramificato con corte catene laterali e contenente residui zuccherini diversi, tra cui esosi (glucosio, galattosio, mannosio, ramnosio), pentosi (xilosio, arabinosio) e acidi uronici (acido glucuronico), in proporzioni differenti a seconda della biomassa considerata. A livello della parete cellulare essa svolge il ruolo di legante tra cellulosa e lignina. La catena principale della macromolecola può anche essere rappresentata da omopolimeri, quale xilani (unita ripetitiva D- β -xilopiranosio), mannani o galattani ai quali si legano ramificazioni di monomeri diversi. Spesso i gruppi alcolici degli zuccheri delle emicellulose sono sostituiti da gruppi acidi (acetili e cinnamili) che si possono idrolizzare in presenza di acqua ed alta temperatura, passando in soluzione sotto forma di acido acetico e acido cinnamico. I legami intracatena sono glicosidici di tipo β -1,4 e talvolta β -1,3 e ciò comporta che l'emicellulosa è più facilmente degradabile della cellulosa.

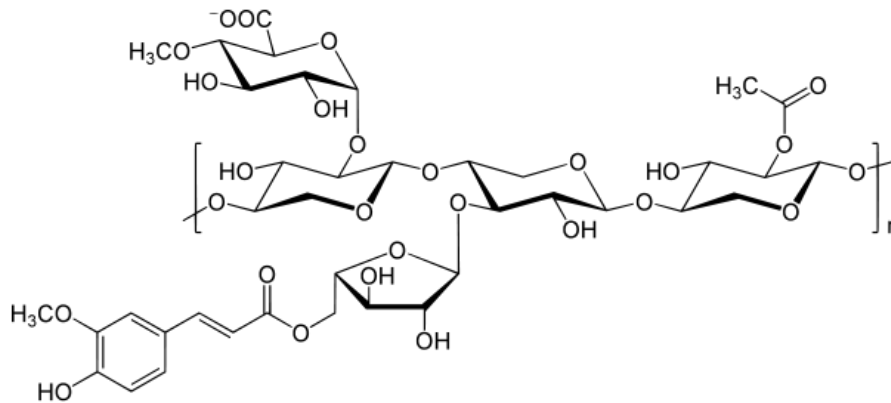


Figura 6: Schematizzazione della struttura eteropolisaccaridica della emicellulosa (qui indicata con il residuo aromatico dell'acido 4-idrossi-3-metossicinnamico);

- ✓ **Cellulosa.** Omopolimero lineare del glucosio con legami glicosidici β -1,4. Non presenta ramificazioni a differenza dell'emicellulosa; il cellobiosio è la subunità dimerica in esso ripetuta. Questo polimero si compone di frazioni amorfe e cristalline.

L'aspetto disordinato della cellulosa amorfa, presente in minor percentuale, ne incrementa il grado di idrofilia: in questi punti, tre molecole di glucosio adiacenti formano angoli tensionati aventi ampiezza superiore a 180° , più facilmente soggetti a idrolisi enzimatica⁷. Le numerose microfibrille di cellulosa cristallina presentano invece un aspetto più compatto e idrofobico: grazie ai legami a idrogeno e interazioni di tipo Van der Waals tra catene parallele, queste zone non sono raggiungibili da enzimi idrolitici.

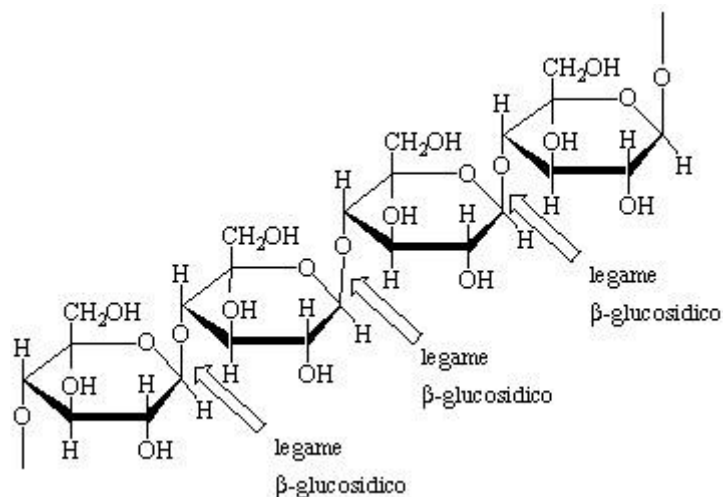


Figura 7: Schematizzazione della struttura omopolimerica della cellulosa;

⁷ The biological degradation of cellulose, Beguin and Aubert (1994);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Il contenuto di cellulosa, emicellulosa e lignina varia a seconda della biomassa lignocellulosica considerata: in generale, piante erbacee come le graminacee hanno un basso contenuto di lignina, più abbondante invece nelle conifere.

Materiale lignocellulosico	Cellulosa (%)	Emicellulosa (%)	Lignina (%)
Legno da conifere	40-55	24-40	18-25
Legno da angiosperme	45-50	25-35	25-35
Granella di mais	45	35	15
Graminacee	25-40	35-50	20
Carta	85-99	0	0-15
Paglia di grano	30	50	15
Rifiuti misti	60	20	20
Foglie	15-20	80-85	0
Cotone	80-95	12	0
Carta di giornale	40-55	25-40	18-30
Rifiuti di carta	60-70	15	7
Solidi da acque reflue	10	-	-
Reflui solidi zootecnici	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Gramigna (infestante)	25	35	6.04
Panico verga (<i>Panicum virgatum</i>)	45	31	12

Tabella 2: Composizione in lignina, emicellulosa e cellulosa di alcune biomasse lignocellulosiche⁸;

- ✓ **Acqua.** Può rappresentare fino all'80% del peso complessivo e deriva dai fluidi biologici della pianta.
- ✓ **Ceneri.** A questa frazione, definita come il residuo che si ottiene bruciando il campione a una temperatura di 575° C per un'ora, appartengono sali inorganici, silicati, carbonati e solfati di vari cationi, potassio, sodio, calcio ed elementi metallici contenuti negli enzimi. Nonostante nella struttura vegetale siano presenti in percentuali molto basse (0.1-0.2 %) svolgono spesso funzione coenzimatiche nelle vie biosintetiche.
- ✓ **Estrattivi.** Composti non strutturali solubili, quali zuccheri, composti azotati, clorofilla, cere, terpeni e flavonoidi, aventi funzione di riserva, difesa, comunicazione, ecc..

La conversione del materiale lignocellulosico a zuccheri monomerici include due processi sequenziali: il pretrattamento del materiale e l'idrolisi della cellulosa in zuccheri fermentabili, per idrolisi acida o enzimatica.

⁸ Fonte: AREA Science Park;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Tra i fattori che incidono sull'idrolisi della cellulosa sono riconosciuti l'accessibilità della matrice agli enzimi cellulasi, il grado di cristallinità delle fibre di cellulosa e il contenuto di emicellulose e lignina. Queste ultime infatti, proteggendo la cellulosa, rendono difficoltoso l'accesso enzimatico riducendo l'efficienza idrolitica.

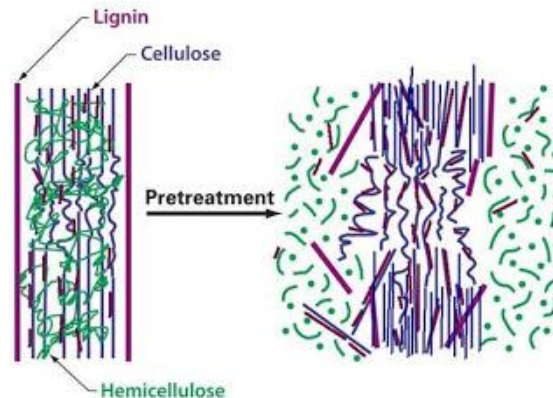


Figura 8: Schematizzazione dell'effetto desiderato da un pretrattamento di biomassa lignocellulosica;

I principali sistemi di pretrattamento vengono classificati in fisici, chimici e fisico-chimici. Qui di seguito vengono descritti alcuni dei sistemi più utilizzati e le loro caratteristiche principali.

✓ *Pretrattamenti fisici:*

- ✓ Sminuzzamento meccanico. Riducendo la biomassa ad un particolato di 0.2-30 mm, viene diminuito il grado di cristallinità della cellulosa. Il sistema più efficace utilizzato per tale scopo è un mulino a tamburo con sistema vibrante.
- ✓ Pirolisi. Sistema utilizzante temperature superiori ai 300° C, che decompongono rapidamente la cellulosa in prodotti gassosi e residui carbonizzati.

✓ *Pretrattamenti chimici:*

- ✓ Idrolisi Acida. L'utilizzo di acidi concentrati quali H₂SO₄ e HCl rendono possibile un'efficace idrolisi della cellulosa. Ciò nonostante risultano tossici, altamente inquinanti e il loro utilizzo richiede reattori resistenti alla corrosione. In aggiunta, il processo risulta economicamente sostenibile solo nel caso in cui l'acido venga recuperato.⁹
- ✓ Idrolisi Alcalina. Alcune basi quali idrossido di sodio, calcio o potassio possono risultare utili nel trattamento di materiale lignocellulosico in base al contenuto di lignina. Rispetto a processi che utilizzano acidi, gli alcali vengono utilizzati in condizioni di reazione più blande, causando per

⁹ Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production; Tengborn C. and Galbe M. (2001);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

questo una minore degradazione degli zuccheri liberati. I tempi del processo si protraggono però per ore o giorni.¹⁰

✓ *Pretrattamenti chimico-fisici:*

- ✓ **Steam-Explosion (STEX).** Metodo più comunemente impiegato per il pretrattamento di materiali lignocellulosici, consiste nel sottoporre la biomassa macinata all'azione di vapore saturo ad alta pressione (1-4 MPa): penetrando attraverso i pori normalmente presenti a livello delle strutture vegetali, il vapore determina una prima idrolisi dei legami glicosidici presenti a livello dei carboidrati. L'elevata temperatura determina la liberazione di acidi e formazione di ioni idronio (H_3O^+) che catalizzano una prima reazione di idrolisi dei polimeri (autoidrolisi). Ciò determina una parziale perdita di cellulosa ed emicellulosa in composti non fermentabili e inibenti l'attività fermentativa. La rimozione dell'emicellulosa determina l'esposizione della cellulosa alla successiva azione enzimatica. Successivamente, in seguito a brusca riduzione della pressione riportata a quella atmosferica, all'interno del reattore il materiale subisce una decompressione esplosiva che forza il materiale fibroso a esplodere: si verifica degradazione della lignina, solubilizzazione dell'emicellulosa, la quale libera in soluzione altri acidi, provocando la perdita di cristallinità nella frazione di cellulosa.

Diversi studi riportano che una soddisfacente solubilizzazione e idrolisi dell'emicellulosa si verifica ad elevate temperature per un breve tempo di residenza (270° C, 1 minuto) oppure a temperature inferiori per un tempo di residenza più lungo (190° C, 10 minuti). Ricerche più recenti hanno suggerito come queste ultime condizioni siano più favorevoli. In base alla severità del pretrattamento, una parte della cellulosa viene degradata.

La lignina viene comunque rimossa solo in misura limitata e ridistribuita sulla superficie delle fibre come risultato di reazioni di depolimerizzazione e ripolimerizzazione.¹¹

- ✓ **Ammonia Fiber Explosion (AFEX).** Pretrattamento simile alla Steam explosion, in cui il materiale lignocellulosico è esposto all'azione di ammoniacca a temperature e pressioni elevate per un periodo definito. Di norma, vengono utilizzati 1-2 kg di ammoniacca per kg di biomassa, che all'interno del reattore è sottoposta ad una temperatura di 90° C per un tempo di 30 min. Dati presenti in letteratura, dimostrano come la AFEX aumenti la percentuale di saccarificazione di diverse biomasse, senza però solubilizzare in modo significativo l'emicellulosa rispetto a pretrattamenti acido-catalizzati, tra cui anche la steam explosion.

¹⁰Process for ethanol from lignocellulosic materials: Acid-based hydrolysis process; Tazadah M.J. and Karim K. (2007);

¹¹ Fermentability of the sugars from steam-exploded softwood; Boussaid A., Robinson J., Cai Y.J., Greg D.J. and Saddler J.R. (1999);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Inoltre, è stata osservata la sua scarsa efficacia verso biomasse con elevato contenuto di lignina (dal 20 al 30%) in cui la resa di idrolisi raggiunta può essere al mas

simo del 50%.¹²

1.1.3. Bioraffinerie

Il concetto di “Zero Waste” si basa sull’idea di considerare qualsiasi materiale di scarto prodotto da attività antropiche come possibile risorsa per altri processi o utilizzatori. In tal modo, verrebbe meno il concetto di rifiuto, inteso come “qualsiasi sostanza o oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l’intenzione o l’obbligo di disfarsi”¹³, che passerebbe ad essere inteso come “sottoprodotto”, che per normativa si distingue appunto dal rifiuto; se utilizzato in successive attività industriali, se in grado di essere impiegato senza altri pre-trattamenti ed ovviamente se il suo utilizzo come materia prima soddisfa tutti i requisiti di legge relativi alla protezione della salute e dell’ambiente. In tal senso, il riciclaggio rappresenta una pratica dedicata al recupero del rifiuto che contribuisce all’idea di eliminare gli scarti prodotti dall’uomo. Gli scarti dell’industria agricola e forestale rientrano in questa particolare categoria di “rifiuti”. Se il ri-utilizzo di tali “scarti” (di natura organica) contribuisce significativamente al problema dello smaltimento dei rifiuti, la loro origine biologica li rende d’altra parte un’interessante materia prima dalla quale recuperare molecole naturali di interesse industriale o dalla quale ottenere altre molecole ad alto valore aggiunto, biomateriali e/o biofuels mediante trasformazione del materiale organico di cui gli scarti sono composti, insieme ad acqua e elementi inorganici. Dette trasformazioni possono avvenire mediante applicazione di processi biotecnologici, durante i quali la materia è bioconvertita grazie al metabolismo di specifici organismi viventi, che la utilizzano come fonte di carbonio o di energia.

Nello specifico, si parla di bioraffineria quando il residuo organico è sfruttato in filiere industriali che includono processi modulari e seriali basati su approcci principalmente (ma non esclusivamente) biologici, ognuno dei quali in grado di utilizzare come materia prima lo scarto del processo a monte. Le bioraffinerie consentono di sfruttare nella maniera più completa possibile la materia organica di scarto, ottenendo tra l’altro prodotti che possono essere d’interesse per settori industriali differenti, permettendo quindi non solo di diversificare sensibilmente il rischio industriale dovuto alle variazioni di valore di mercato associate ad ogni singolo prodotto, ma guadagnando l’opportunità di impegnare molteplici settori del mercato a partire da una stessa matrice. Le bioraffinerie sono quindi concettualmente simili alle raffinerie chimiche,

¹² Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility; Chundawat S.P., Venkatesh B. and Dale B.E. (2007);

¹³ Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

ma se ne differenziano per le risorse impiegate. Al termine delle filiere biotecnologiche, tutto ciò che non può ulteriormente essere sfruttato viene tipicamente inviato a processi di digestione anaerobica, dedicati alla mineralizzazione del materiale biologico in assenza di ossigeno, il cui prodotti sono un digestato, ormai molto povero di materia organica residua, e un biogas ricco in metano.

Tutto ciò considerato, le biotecnologie applicate nell'ambito delle bioraffinerie dovrebbero essere considerate uno strumento fondamentale nell'ottica di riciclare materiale di scarto in cicli industriali produttivi, al fine di consentire la valorizzazione di frazioni organiche di interesse, la riduzione dei costi del loro eventuale smaltimento e l'introduzione di nuove molecole di interesse commerciale su diversi settori del mercato.

In particolare, la biomassa ottenuta come scarto di processi industriali è definita "residuale". La materia organica contenuta nei rifiuti delle attività agro-industriali in particolare partecipa inoltre al ciclo del carbonio dell'ecosfera¹⁴. In tal senso, la CO₂ sviluppata dalla trasformazione biologica o chimico-fisica di detti rifiuti non contribuisce all'incremento di gas serra in atmosfera, in quanto utilizzata come fonte di carbonio da diversi organismi appartenenti a svariati ecosistemi.

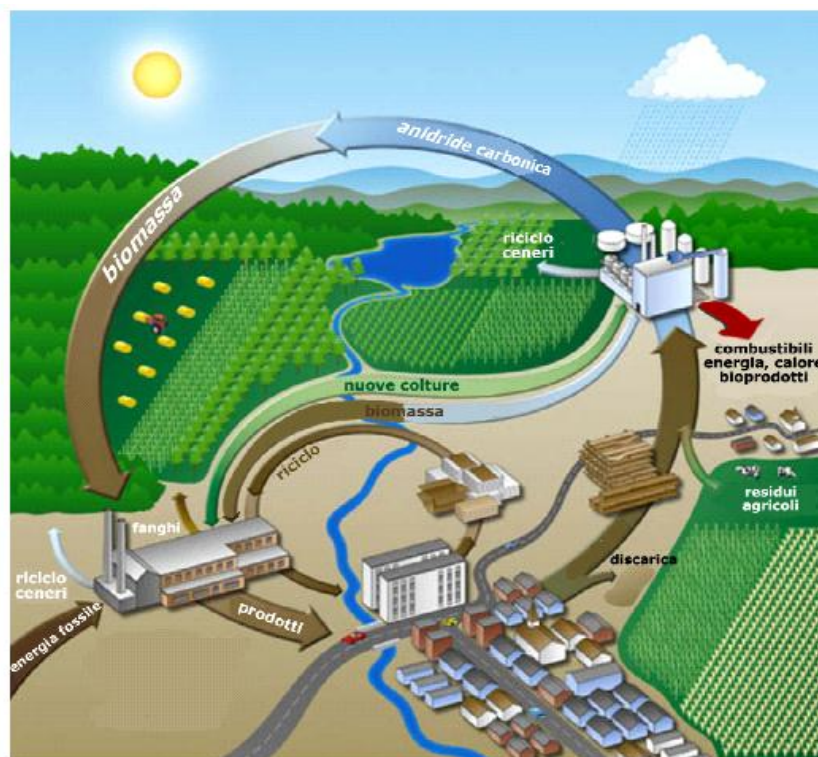


Figura 9: Immagine esemplificativa del concetto di "bioraffineria" all'interno del ciclo del carbonio;

¹⁴ L'insieme della porzione esterna della litosfera (suolo e parte del sottosuolo), l'idrosfera (le acque marine, lacustri e fluviali) ed i primi strati dell'atmosfera;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Come accennato nei precedenti capitoli le biomasse di tipo residuale possono essere di diversa natura e generalmente si distinguono in prodotti secondari e scarti dell'industria agro-alimentare, materiali e residui di attività agricole e forestali, reflui di origine zootecnica, frazione organica dei rifiuti solidi urbani ed alghe od altre specie vegetali utilizzate per la depurazione di liquami organici.

In virtù della grande varietà di biomasse residuali ottenute come rifiuti di attività agro-industriali, le possibilità di valorizzare matrici organiche attraverso approcci biotecnologici sono molteplici. D'altra parte, la composizione di dette matrici è estremamente variabile, in funzione sia dello spazio (a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche e climatiche e del territorio) sia del tempo (la stessa tipologia di biomassa può avere composizione diversa a seconda del periodo dell'anno in cui è prodotta). Di conseguenza, se da un lato è possibile suggerire quali processi biotecnologici possano essere applicati a carico di una definita matrice organica di scarto, è spesso assai difficile prevedere quali valori dei principali parametri di processo consentano di massimizzarne la produttività.

In generale, le bioraffinerie possono essere dedicate al recupero di molecole naturali (biomolecole) di interesse industriale (inclusi i principali polimeri biologici, quali ad esempio proteine o polisaccaridi) e/o alla (bio)conversione del materiale organico in altri *chemicals* ad alto valore aggiunto, in biomateriali o *biofuels*. A seconda della tipologia dello scarto, sono però possibili altri processi di valorizzazione. Ad esempio, le coltivazioni di frutta e cereali, che generano elevati volumi di sottoprodotti (per il 20-60% del peso della materia prima processata¹⁵) e che sono generalmente impiegate nella produzione di mangimi, hanno trovato recente impiego nell'ambito della produzione di *functional foods*, ovvero alimenti con specifiche benefiche proprietà nutraceutiche. Tali residui sono infatti generalmente ricchi di fibre dietetiche, vitamine, carotenoidi, antiossidanti di origine naturale, mono-, di- ed oligo-saccaridi. In particolare, questi ultimi agiscono come prebiotici raggiungendo il colon senza aver subito processi digestivi e venendo solo allora fermentati da bifidobatteri o batteri lattici, con effetti benefici per la salute umana. Lo sfruttamento delle componenti sopra indicate per la produzione di *functional foods* può avvenire senza necessità di estrarle come molecole pure, evitando approcci costosi che non consentirebbero l'immissione sul mercato degli stessi prodotti alimentari. A dimostrazione dell'importanza e dell'attualità della tematica sopra descritta, la Comunità Europea e il governo dell'India hanno recentemente finanziato un progetto comune dedicato alla produzione di *functional foods* e nuovi prodotti alimentari a partire da sottoprodotti della produzione di agrumi, mango, melograno e crusca di grano e riso¹⁶.

In merito ai processi di separazione ed estrazione di sostanze ad alto valore aggiunto da scarti agro-industriali, i principali approcci sfruttano la loro diversa dimensione (processi con membrane) o affinità con

¹⁵ Handbook for the Prevention and Minimisation of Waste and Valorisation of by-products in European Agro-Food Industries; AWARENET(2004);

¹⁶ www.namaste-eu-india.org

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

fasi acquose od organiche (processi di estrazione in fase liquida o solida). In generale, è possibile prevedere diversi pretrattamenti (meccanici, chimico-fisici, di natura enzimatica) in grado di rendere più disponibile al processo estrattivo la sostanza di interesse, e la natura dello scarto influenza sensibilmente sia il primo che il secondo.¹⁷

Per quanto concerne i biocarburanti, i rifiuti di natura agro-industriale possono essere utilizzati soprattutto per la produzione di bioetanolo, biodiesel, bioidrogeno e biometano. Come già accennato, il bioetanolo è il prodotto della fermentazione alcolica di zuccheri semplici; i processi di prima generazione impiegano substrati puri, mentre il bioetanolo di seconda generazione è prodotto a partire da matrici lignocellulosiche, per le quali è necessario prevedere i pretrattamenti sopra indicati. Il biodiesel è prodotto dalla transesterificazione di oli vegetali in presenza di metanolo, dalla quale si ottiene una miscela di esteri metilici di acidi grassi (alimentabile in motore Diesel) e glicerolo, sottoprodotto per il quale è a sua volta necessario prevedere processi di valorizzazione che contribuiscano alla sostenibilità economica del processo di produzione del biocarburante. Bioidrogeno e biometano sono ottenuti mediante digestione anaerobica del materiale organico, rispettivamente in condizioni idrolitiche/acidogeniche e metanogeniche. La digestione anaerobica di surplus dell'agro-industria per la produzione di metano è già tecnologia consolidata e largamente impiegata nel contesto nazionale e continentale.

¹⁷ Biotecnologie ambientali per la valorizzazione integrata di residui organici dell'industria agro-alimentare (biowaste biorefinery) a sostegno della "zero waste strategy";

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

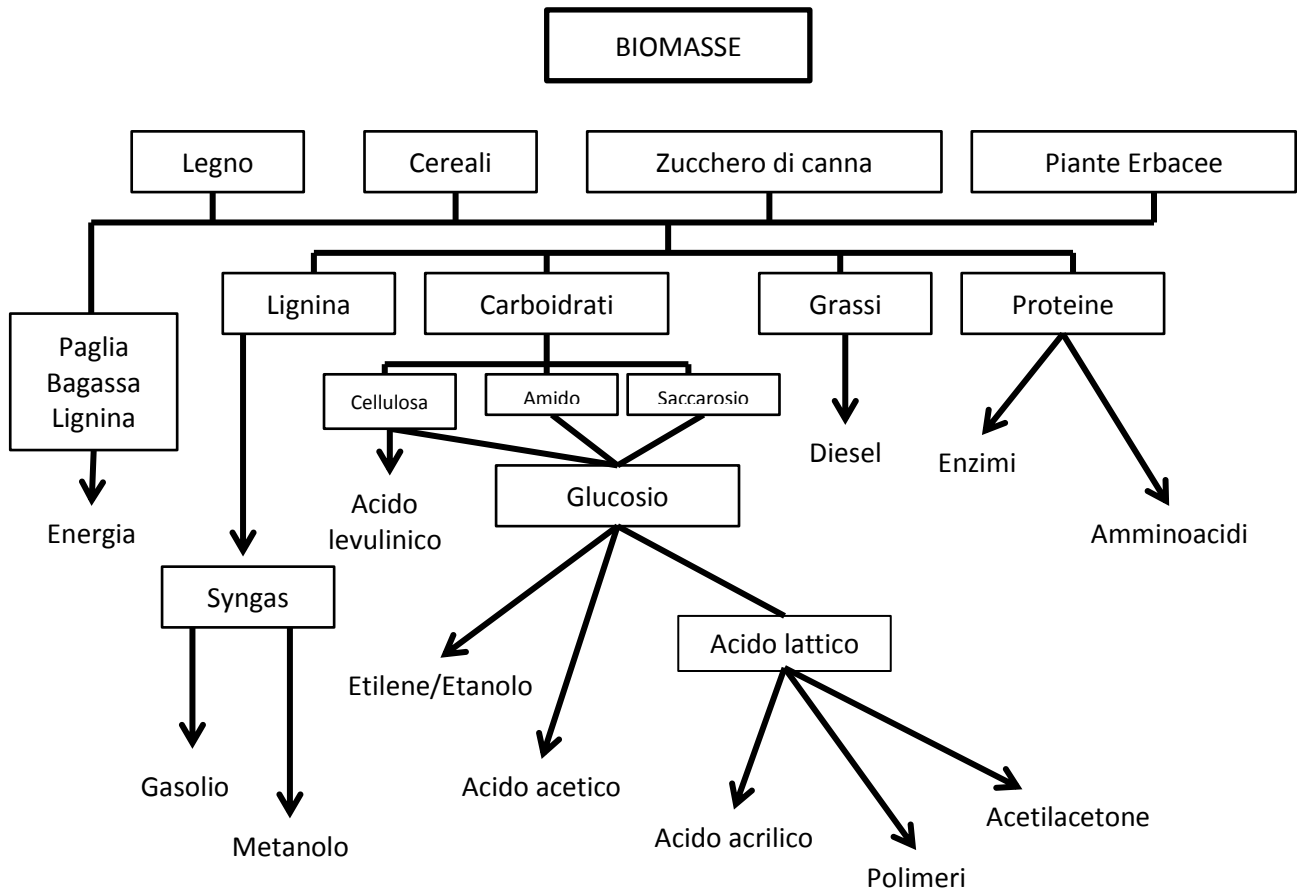


Figura 9: Schematizzazione della filiera di prodotti ottenibili da una bioraffineria integrata;

1.2. Processi biochimici

L'industria chimica è una delle industrie a più alta intensità energetica, poiché oltre a basarsi su fonti fossili come petrolio e gas per l'energia utilizzata durante i propri processi, sfrutta queste risorse anche come materia prima per la produzione di molti dei suoi prodotti. L'industria chimica ricava più del 90% dei suoi prodotti dal petrolio: materie plastiche per tutti gli usi, fertilizzanti per l'agricoltura e anche farmaci.

Oggi l'industria chimica consuma circa il 10% del petrolio mondiale. Delle alternative derivano dalla biotecnologia industriale: materie plastiche ottenute da amido di mais, zucchero o acido lattico; vernici prodotti da colza; batteri producono in adatti bioreattori particolari sostanze chimiche da gusci di granchi e da legno.¹⁸

Questa svolta trova il sostegno anche nella politica dell'Unione Europea che vuole promuovere l'uso di materie prime rinnovabili. Lo studio di consulenza industriale Arthur D. Little¹⁹ stima il mercato mondiale dei prodotti biochimici a 77 miliardi di dollari (USD), corrispondente al 4% del mercato totale. Secondo alcuni esperti, entro il 2025 questa quota potrebbe persino salire al 17%. Indubbiamente, l'industria chimica vuole ridurre la sua dipendenza dal petrolio come materia prima, ma la strada da percorrere è ancora lunga e piena di insidie.

Per mitigare l'impatto economico e ambientale derivante dall'uso di prodotti petrolchimici le aziende dell'industria Chimica-Verde stanno adottando due soluzioni differenti: la conversione (*drop-in*) e l'innovazione (*novels*). Entrambe le scelte offrono soluzioni valide per il mercato, ma sfidano l'industria petrolchimica in auge attraverso soluzioni con caratteristiche tali da offrire vantaggi differenti. Attualmente è ancora in corso un dibattito su quale approccio affronti i costi di tali cambiamenti in maniera più efficiente, quale diminuisca maggiormente l'impatto ambientale, senza disattendere i desideri dei consumatori e, di conseguenza, quale approccio avrà più probabilità di successo.

Attualmente la definizione di "novel" si potrebbe attribuire a tutti i prodotti chimici innovativi che vengono prodotti a partire da materiale rinnovabili, semplicemente perché appunto sono prodotti mai commercializzati prima, mentre la definizione "*drop-in*" sono le versioni *bio-based* di prodotti petrolchimici esistenti con mercati consolidati e che sono chimicamente equivalenti al prodotto ottenuto da idrocarburi

¹⁸ Un mondo senza Petrolio, MiniWatt.it;

¹⁹ La Arthur D. Little è una società di consulenza internazionale con sede a Boston (Massachusetts, USA), fondata nel 1909 da Arthur Dehon Little, un chimico del MIT autore della scoperta dell'acetato;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

fossili. Esempi sono il Bio-Etilene, il Bio-PoliEtilene (PE) e il Bio-Butandiolo (BDO), che utilizzano impianti e mercati già avviati da importanti aziende chimiche.

Le sostanze chimiche “*novel*” utilizzano invece strutture chimiche innovative e che non sono state applicate ai mercati commerciali per la produzione di materiali chimici da fonti fossili. Queste sostanze spesso hanno proprietà chimiche diverse rispetto ai prodotti petrolchimici che sostituiscono, sebbene mantengano le medesime funzionalità. Un esempio sono gli acidi aldarici, una sostanza chimica verde *novel* con funzionalità paragonabili ai fosfati nei detersivi, ma con ulteriori vantaggi di mercato (per esempio biodegradabilità e minor impatto ambientale). A tal proposito è bene sottolineare che sebbene esistano differenze chimiche sostanziali, dal punto di vista degli utenti finali è irrilevante se un sostituto rinnovabile sia chimicamente equivalente al suo precursore.

Al contrario viene definito un “*drop-in*” un processo che porta alla produzione di un materiale con tutte le funzionalità e le caratteristiche chimiche del proprio precursore e i cui costi di commutazione risultino esigui (sia che siano legati alla conversione di tecnologia o all’uso di attrezzature pre-esistenti). In sostanza tali processi permettono di ottenere lo stesso prodotto chimico allo stesso prezzo del tradizionale, ma a partire da materiali rinnovabili.

Sembra quindi che la soluzione “*drop-in*” possa avere un vantaggio iniziale a causa dell’equivalenza chimica con il prodotto precursore. Il problema più significativo di prodotti chimici-verdi “*novel*” infatti è che alcuni possono richiedere, oltre che notevoli costi di avviamento, un ulteriore sfida in termini di qualità, soprattutto nella fase iniziale del loro sviluppo e utilizzo, poiché comportano l’introduzione nel mercato di un composto chimico nuovo (sebbene rinnovabile). Tuttavia contrariamente ai materiali “*drop-in*”, i componenti “*novel*” possono offrire al mercato materiali con proprietà innovative, questo è un potenziale vantaggio chiave sia per la versatilità del portfolio, sia per il riutilizzo di tali componenti “*novel*” per la produzione di nuovi prodotti.

Altre considerazioni in questa diatriba spettano al ruolo dei finanziamenti futuri riservati a tali strategie, che spesso determinano il successo di alcune tecnologie. Attualmente questo settore è in una fase così precoce che non è possibile determinare ancora verso quale delle due strategie verranno convogliati i finanziamenti futuri; è infatti interessante notare come molti dei produttori di biocarburanti con ottime performance finanziarie sono impegnati sia in strategie “*drop-in*” che nella ricerca di prodotti chimici “*novel*”.

Questi sono i motivi, per i quali molte industrie chimiche e anche piccole e medie imprese si dedicano oggi alla ricerca nel campo dei prodotti biochimici, ma, in ragione di quelle che sono attualmente le difficoltà riscontrate nel riproporre i risultati ottenuti su scale industriale, il passo verso una chimica senza petrolio non sarà una rivoluzione, ma un lento processo che durerà ancora a lungo.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Ciò nonostante, uno studio dell'Unione Europea prevede che, nel 2030, le biotecnologie potranno fornire circa un terzo di tutti i prodotti del settore chimico.

1.2.1. Green Chemistry: Panoramica

Il termine "Green Chemistry" è stato coniato nel 1991 dal docente dell'università di Berkeley Paul Anastas e fa proprio riferimento al nuovo ordine di priorità con cui si fa innovazione scientifica e tecnologica sulla base di principi generali rivolti ad eliminare l'uso di procedure e di sostanze pericolose. Alcune strategie possibili per perseguire questi obiettivi sono:

- ✓ L'ottimizzazione del bilancio di massa globale così da minimizzare i reflui;
- ✓ La minimizzazione dei costi energetici, per esempio progettando processi a temperatura e a pressione ambiente;
- ✓ L'utilizzo di materie prime ricavate da fonti rinnovabili;
- ✓ Laddove possibile, sostituire composti obsoleti con altri, che mantengano la loro efficacia funzionale riducendo nel contempo la tossicità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente naturale;
- ✓ L'utilizzo, a livello industriale, di microorganismi che svolgono al loro interno reazioni enzimatiche a temperatura e pressione ambiente;
- ✓ La riduzione, tramite l'utilizzo di processi biomimetici, dei sottoprodotti di reazione, presenti (in diverse percentuali) in tutte le reazioni della chimica organica tradizionale;

In questo contesto rientra quindi l'ottica delle bioraffinerie che possono essere dedicate al recupero di molecole naturali di interesse industriale (inclusi i principali polimeri biologici, quali ad esempio proteine o polisaccaridi) e/o alla bioconversione del materiale organico in altri chemicals ad alto valore aggiunto, in biomateriali o biofuels.

In particolare, in caso di matrice lignocellulosica, il pretrattamento è fondamentale nell'ottica di separare la lignina dai polisaccaridi (cellulosa ed emicellulosa), che possono essere impiegati in processi fermentativi. Tuttavia, alcuni ostacoli devono essere ancora superati, tra i quali un'insufficiente separazione tra lignina e polisaccaridi, formazione di prodotti in grado di inibire i seguenti processi biologici, alto uso di agenti chimici e di energia.

Per quanto concerne la produzione di polimeri e biomateriali, la stessa si basa sulla naturale capacità di microorganismi di produrre, a partire da risorse di natura organica, e accumulare monomeri e polimeri che

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

in alcuni casi possono avere proprietà meccaniche che li rendono potenziali alternative alle plastiche di origine sintetica (ad esempio, i polioidrossialcanoati). Alcuni polimeri naturali specifici a struttura polisaccaridica (mannani, glucani e chitina) sono secreti da batteri o costituiscono parte della parete cellulare di alcuni microorganismi, quali i lieviti, o l'esoscheletro di crostacei.

Inoltre, polimeri "bio-based" possono essere prodotti dalla polimerizzazione di building blocks ottenuti per bioconversione di substrati organici (ad esempio, l'acido polilattico (PLA) è ottenuto per sintesi chimica dall'acido lattico, prodotto della fermentazione del glucosio da parte dei batteri lattici; il polietilene è sintetizzato dal bioetanolo; il polietilensuccinato dall'acido succinico, ottenuto biologicamente per vie fermentative, e dall'1,4-butandiolo)²⁰.

Tuttavia, al momento, gran parte dei polimeri microbici è prodotta a partire da costosi substrati zuccherini sintetici aventi una composizione definita. Obiettivo delle ricerche attualmente condotte nel settore è quindi la produzione di biopolimeri da rifiuti di natura organica. In virtù dell'elevato contenuto di materiale organico, parte del quale zuccherino, molti di questi potrebbero essere adatti allo scopo: melasso da canna o da barbabietola da zucchero, effluenti dell'industria casearia, acque reflue della produzione di oli, idrolizzati amidacei, cellulose ed emicellulose. I rifiuti dell'industria agro-alimentare possono anche essere valorizzati mediante produzione di esopolisaccaridi (come la gomma xantana che è l'esopolisaccaride batterico che è attualmente più utilizzato).

1.2.2. Utilizzo degli enzimi come catalizzatori

Si definisce enzima una proteina la cui funzione è quella di un catalizzatore dei processi biologici. Sono proprio gli enzimi i principali artefici di quelli che sono i benefici dell'utilizzo di sistemi biotecnologici per la sintesi di prodotti che altrimenti richiederebbero, oltre all'utilizzo di materie derivanti da fonti fossili, anche l'utilizzo di catalizzatori tradizionali, composti per la maggior parte da metalli costosi (Pt, Ag Co...) o tossici (Mn, Cr...)²¹.

Il processo di catalisi indotto da un enzima (come da un qualsiasi altro catalizzatore) consiste in un aumento della velocità di reazione e quindi in un più rapido raggiungimento dello stato di equilibrio termodinamico. Un enzima incrementa unicamente le velocità delle reazioni chimiche, diretta e inversa (dal composto A al composto B e viceversa), senza intervenire sui processi che ne regolano la spontaneità. In altre parole, agiscono dal punto di vista cinetico senza modificare la termodinamica del processo. Il suo

²⁰ Biotecnologie ambientali per la valorizzazione integrata di residui organici dell'industria agro-alimentare (biowaste biorefinery) a sostegno della "zero waste strategy";

²¹ Biologia, la scienza della vita, 2012; Zanichelli;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

ruolo consiste nel facilitare le reazioni attraverso l'interazione tra il substrato (la molecola o le molecole che partecipano alla reazione) e il proprio sito attivo (la parte di enzima in cui avvengono le reazioni), formando un complesso. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per iniziarne una nuova. L'enzima infatti non viene consumato durante la reazione.

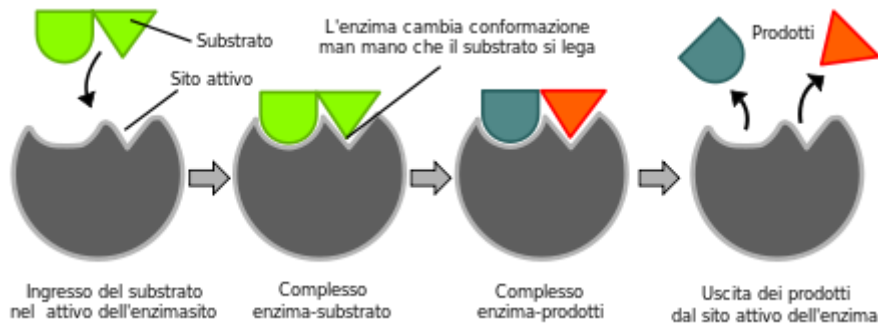


Figura 10: Schematizzazione di una reazione enzimatica;

In ogni caso, la differenza principale degli enzimi dagli altri catalizzatori chimici è la loro estrema specificità di substrato. Essi infatti sono in grado di catalizzare solo una reazione o pochissime reazioni simili, poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo stereospecifico (è sensibile anche a piccolissime differenze della struttura tridimensionale).

Secondo la banca dati ExplorEnz della IUBMB, sono state individuate finora 4038 reazioni biochimiche catalizzate da enzimi.

La maggiore selettività degli enzimi oltre a renderli più efficienti rende questi catalizzatori biologici molto più resistenti dei catalizzatori tradizionali, essi infatti non sono soggetti ad avvelenamento, va tuttavia sottolineato che l'attività enzimatica può essere influenzata da altre molecole dette inibitori. Esistono infatti molecole in grado di inibire tale attività (molti farmaci e veleni sono inibitori enzimatici).

L'attività di un enzima inoltre può essere anche influenzata dalla temperatura e dal pH, ma sebbene questi catalizzatori abbiano intervalli di attività molto più ristretti dei corrispettivi sintetici, lavorano in condizioni notevolmente meno critiche, l'attività enzimatica infatti si concentra principalmente tra i 10 e i 60°C e attorno a pH neutro.

Alcuni enzimi sono utilizzati per fini industriali. La sintesi chimica di numerosi farmaci, ad esempio, è portata a termine attraverso l'utilizzo di enzimi. Anche diversi prodotti di uso domestico fanno ampio uso di enzimi, diversi detersivi contengono enzimi per velocizzare la degradazione delle proteine e dei lipidi che compongono le macchie. La papaina, enzima estratto dalla papaia, è invece utilizzato in numerosi prodotti

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

per le sue caratteristiche proteolitiche: dall'intenerimento della carne, processo noto già agli indigeni americani, all'utilizzo in applicazioni topiche sulle ferite e sulle cicatrici.

Gli enzimi portano a termine una gran quantità di funzioni all'interno degli organismi viventi:

- ✓ Una delle caratteristiche più importanti degli enzimi è la possibilità di lavorare in successione, creando un pathway metabolico. Nei pathway, ogni enzima utilizza il prodotto della reazione precedente come substrato. È la presenza degli enzimi a determinare i passaggi del pathway: senza enzimi, il metabolismo non passerebbe attraverso gli stessi passaggi e non sarebbe in grado di generare prodotti a una velocità sufficiente per le esigenze della cellula. Ad esempio, un pathway come la glicolisi non potrebbe esistere in assenza degli enzimi che la compongono

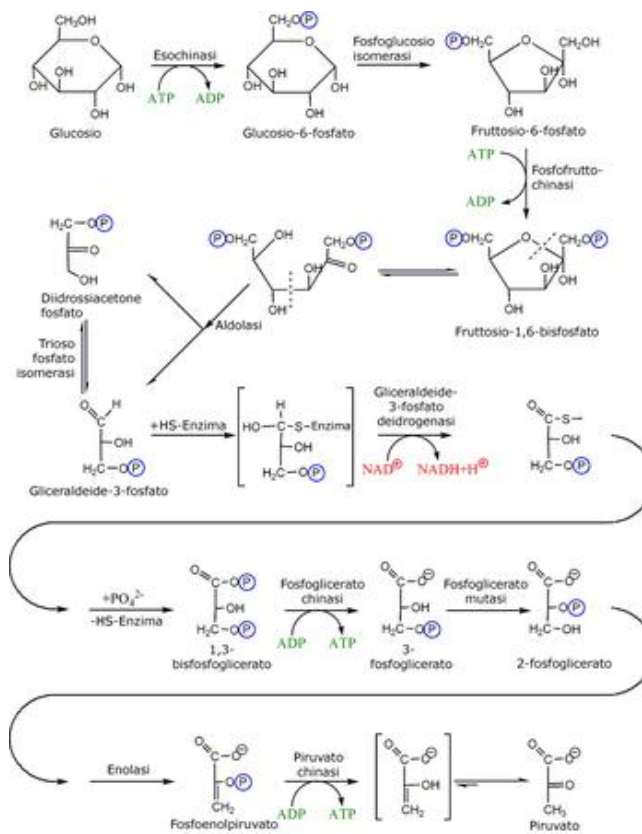


Figura 11: Pathway della glicolisi;

- ✓ Un'altra importante funzione degli enzimi è correlata alla digestione negli animali. Enzimi come le amilasi e le proteasi sono in grado di ridurre le macromolecole (nella fattispecie amido e proteine) in unità semplici (maltosio e amminoacidi), assorbibili dall'intestino. In alcuni casi gli enzimi

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

necessari alla digestione possono essere prodotti da organismi ospiti del tubo digerente: nei ruminanti, ad esempio, la cellulasi necessaria alla degradazione della cellulosa è prodotta da alcune specie batteriche;

- ✓ Essi sono anche fondamentali per la trasduzione del segnale e la regolazione dei processi cellulari. In particolare, questi processi sono coordinati solitamente da chinasi e fosfatasi;
- ✓ Gli enzimi sono anche in grado di generare movimento, come avviene ad esempio con la miosina, che idrolizza l'ATP generando la contrazione muscolare o con il trasporto di molecole nei vari dipartimenti cellulari attraverso il citoscheletro;
- ✓ Altre ATPasi, localizzate presso le membrane cellulari, sono le pompe ioniche, coinvolte nel trasporto attivo;
- ✓ I virus contengono numerosi enzimi che permettono loro di infettare le cellule. Tra di essi figurano le integrasi e le retrotrascrittasi;

La maggior parte degli enzimi presenta una notevolissima specificità per la reazione catalizzata e per i substrati coinvolti. Tale specificità è legata a diversi fattori che caratterizzano l'associazione tra il substrato e il sito attivo, come la complementarità dal punto di vista strutturale, le cariche elettriche, la natura idrofila o idrofoba. Gli enzimi mostrano spesso livelli elevatissimi di stereospecificità, regioselettività e chemoselettività.

Gli enzimi sono enormemente utilizzati nell'industria chimica e in altre applicazioni industriali che richiedono catalizzatori estremamente specifici. Le principali limitazioni al loro impiego sono la scarsa stabilità in solventi differenti da quello biologico e ovviamente il numero limitato di reazioni per cui l'evoluzione ha messo a punto enzimi efficaci. Di conseguenza, sta assumendo un'importanza sempre crescente una nuova area di ricerca che punta alla messa a punto di enzimi con determinate proprietà, sia attraverso la modifica di enzimi esistenti, sia attraverso una sorta di evoluzione in vitro.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Settore	Applicazione	Enzimi utilizzati	Funzioni
Industria alimentare	Panificazione	α -amilasi fungine.	Catalizzano la conversione dell'amido presente nella farina in zuccheri semplici. Utilizzate nella produzione di pane in genere, si inattivano intorno ai 50 °C e sono dunque distrutte durante il processo di cottura.
		Proteasi	I produttori di biscotti le utilizzando per ridurre la concentrazione di proteine nella farina.
	Birrificazione	Enzimi contenuti nell'orzo.	Degradano amido e proteine producendo zuccheri semplici, amminoacidi e brevi peptidi, utilizzati dai lieviti per la fermentazione.
		Enzimi dell'orzo prodotti industrialmente.	Largamente utilizzati per la birrificazione industriale come sostituto degli enzimi naturali dell'orzo.
		Amilasi, glucanasi	Degradano i polisaccaridi e le proteine del malto.
		Beta glucosidasi	Ottimizza il processo di filtrazione.
		Amiloglucosidasi	Permette la produzione di birre a basso contenuto calorico.
		Proteasi	Rimuovono la torbidità che si genera durante la conservazione delle birre.
	Industria casearia	Rennina	Derivata dallo stomaco di giovani ruminanti (come vitelli e agnelli), è usata nella manifattura di formaggi per idrolizzare proteine.
		Lipasi	Utilizzata nella produzione di formaggi come il Roquefort.
		Lattasi	Degradano il lattosio a glucosio e galattosio.
	Trattamento dell'amido	Amilasi, amiloglucosidasi e glucoamilasi	Convertono l'amido in glucosio (molto utilizzati nella produzione di sciroppi).
		Glucosio isomerasi	Converte il glucosio in fruttosio, per la produzione di sciroppi ad alta concentrazione di fruttosio (che, rispetto al saccarosio, presenta alte caratteristiche dolcificanti e basso contenuto calorico).
Industria cartiera		Amilasi, xilanasi, cellulasi e ligninasi	Le amilasi favoriscono la degradazione dell'amido, al fine di ottenere una viscosità inferiore. Le xilanasi favoriscono lo sbiancamento della carta. Le cellulasi ammorbidiscono le fibre. Le ligninasi rimuovono la lignina per rendere la carta più morbida.
Detersivi		Proteasi	Utilizzate nelle fasi di prelavaggio, con applicazione diretta sulle macchie di natura proteica.
		Amilasi	Utilizzate per il lavaggio di stoviglie con macchie particolarmente resistenti di amido e derivati.
		Lipasi	Utilizzate per ottimizzare la rimozione di macchie di unto e grassi di vario tipo.
Biologia molecolare		Enzimi di restrizione, DNA ligasi e polimerasi	Utilizzate per la manipolazione del DNA nelle tecniche di ingegneria genetica. Ampi utilizzi in farmacologia, agricoltura e medicina (tra cui la medicina forense).

Tabella 3: Esempi di applicazioni di enzimi tratti da cellule enzima origine applicazione²²;²² http://it.wikipedia.org/wiki/Enzima#Applicazioni_industriali;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

L'utilizzo di enzimi in campo industriale e agroalimentare avviene sia con enzimi isolati, sia con enzimi inseriti in cellule (di solito batteri e lieviti); il secondo modo è preferito se la lavorazione è polistadica (es. la fermentazione alcolica) perché l'enzima non necessita di rigenerazione.

La fonte principale di enzimi sono le cellule viventi. Gli enzimi possono essere estratti sia da cellule vegetali, che da cellule animali, che da microrganismi, con processi abbastanza analoghi. L'utilizzo di microrganismi (generalmente ingegnerizzati) è quello industrialmente più conveniente, grazie alla rapidità con cui un microrganismo cresce e si sviluppa, se si considerano infatti i tempi di procreazione (al fine di ottenere un nuovo esemplare da cui estrarre gli enzimi) di un qualunque animale con quelle di un microrganismo, è facile comprendere come mai l'utilizzo di microrganismi sia vantaggioso.

L'estrazione degli enzimi è un processo complesso, in ragione principalmente degli accurati processi di purificazione che questo processo comporta, per essere efficiente infatti un enzima deve essere puro. I costi più ingenti della produzione di enzimi da microrganismi infatti sono quelli relativi ai processi di downstream e non alla produzione in se e per se. Gli stadi di lavorazione comportano:

- ✓ Allestimento del fermentatore: viene inserito il substrato di coltura e sterilizzato, il terreno viene quindi inseminato con l'organismo utilizzato a cui viene fornita la materia da elaborare;
- ✓ Produzione: fase delicata che avviene controllando costantemente l'ambiente e i microrganismi coinvolti per evitare contaminazione e retromutazioni;
- ✓ Recupero dei prodotti: si separano le cellule dal brodo contenente il prodotto (per filtrazione o centrifugazione) o, se il prodotto è intra-cellulare, si distruggono con trattamenti meccanici (macinazione), fisici (ultrasuoni) o chimici (solventi) e poi si filtra per eliminare i frammenti cellulari.

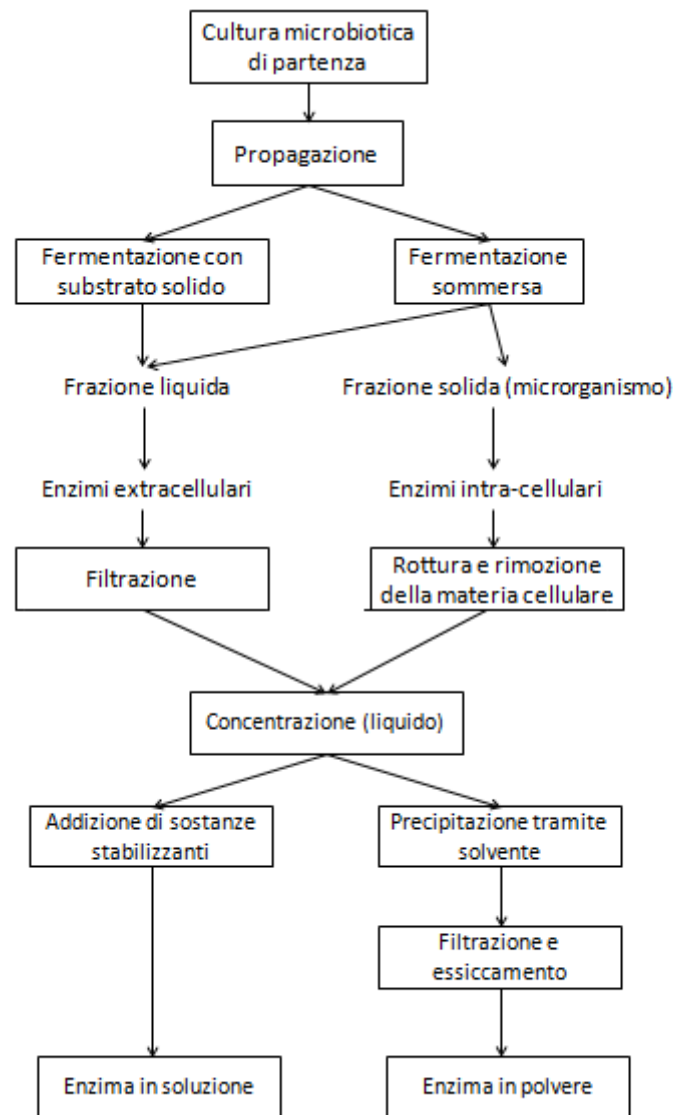


Figura 12: schematizzazione della produzione di un enzima intracellulare o extracellulare;

1.2.3. Utilizzo di microrganismi

L'impiego dell'intero microrganismo, oltre che ad essere necessario per la produzione dei singoli enzimi, è vantaggioso quando sono necessari sistemi enzimatici complessi per cui l'utilizzo del "sistema biochimico batterico" è molto più conveniente che una sintesi polistadica chimica. Vengono impiegati i "fermentatori" cioè un sistema che consente la coltura di microrganismi in ambiente controllato (bioreattori se si parla di cellule o di organismi superiori).

Nell'industria alimentare è sviluppatissimo l'impiego di microrganismi vivi aggiunti all'alimento in lavorazione.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Produzione	Microrganismi
Pane e prodotti da forno, bevande alcoliche;	<i>Saccaromices cerevisiae</i>
Yogurt, Kefir, gioddu e latti fermentati, aromatizzanti;	Batteri lattici
Aceto, produzione di acidi organici;	Batteri acetici
Oli vegetali	Batteri e miceti
Enzimi	Batteri e lieviti
Dolcificanti naturali	Batteri e lieviti

Tabella 4: Esempi di applicazioni che utilizzano microrganismi vivi²³;

Applicazione di grande interesse zootecnico è la produzione di biomasse batteriche (SCP = single cell protein o meglio MBP = microbial biomass protein), di lieviti e di alghe, utilizzate per esempio come mangimi. I batteri o lieviti impiegati possono utilizzare come substrato sottoprodotti della lavorazione della carta, etanolo e metanolo, resti dell'attività agricola e forestale, lattosio.

Questa tecnica ha i vantaggi di elevata rapidità di crescita, quindi di alta produttività, buone qualità alimentari (es. alta percentuale proteine ad alto valore biologico), facile separabilità del prodotto. Uno degli svantaggi principali dell'utilizzo di questa tecnica è però l'elevato costo delle materie prime nel momento in cui si utilizzano substrati di tipo sintetico.

Oltre a materie zuccherine infatti un microrganismo per crescere e svilupparsi necessita di diversi nutrienti, i principali sono:

- ✓ Carbonio: generalmente zuccheri (come il glucosio), necessari per la crescita del microrganismo;
- ✓ Azoto: contenuto nelle proteine, negli enzimi e di conseguenza negli acidi nucleici, la fonte di azoto principale è lo ione ammonio o in alternativa alcuni sali (nitrati);
- ✓ Minerali: contenuti negli enzimi ed utilizzati come co-fattori dell'attività enzimatica (P,S,Mg e Fe), alcuni presenti anche in tracce (Mn, Mo, B, Zn e Cu);
- ✓ Fattori di crescita: alcuni nutrienti come vitamine, amminoacidi e nucleotidi devono essere aggiunti al mezzo di crescita nel caso in cui il microrganismo non sia in grado di sintetizzarli autonomamente;

²³ Fonte: Biologia, la scienza della vita, 2012; Zanichelli;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Alcuni di questi elementi sono presenti all'interno delle biomasse di seconda generazione, proprio in ragione della loro origine organica, molte di esse infatti contengono in concentrazioni più o meno significative, oltre a composti organici di diverse famiglie, sali e metalli.

Le caratteristiche primarie per un microrganismo affinché sia adatto alle applicazioni industriali sono:

- ✓ Attitudine a crescere utilizzando elementi nutrizionali semplici e la cui sintesi sia relativamente poco costosa;
- ✓ Attitudine a crescere in maniera rapida in una cultura che contenga anche il prodotto desiderato (il prodotto non deve quindi inibire la crescita del microrganismo stesso)
- ✓ I prodotti finali derivanti dal processo di crescita non devono contenere prodotti indesiderati o tossici;
- ✓ Il microrganismo deve possedere una propria stabilità genetica, così che durante la duplicazione non perda le proprie caratteristiche;
- ✓ Il microrganismo, dove possibile, dovrebbe riuscire a crescere con una bassa richiesta di ossigeno (l'ossigenazione generalmente partecipa al 20% del costo finale del prodotto);
- ✓ Il microrganismo deve essere facilmente ingegnerizzabile (manipolazione genetica);

1.3. Sistemi di purificazione di idrolizzati di seconda generazione

Il processo di Bio-conversione di biomasse lignocellulosiche in prodotti di interesse commerciale, consiste principalmente in quattro fasi: pretrattamento, idrolisi enzimatica, fermentazione microbica e separazione del prodotto di interesse.

Il pretrattamento è un prerequisito necessario per il processo di idrolisi enzimatica, poiché altera la struttura del materiale celluloso rendendolo più accessibile all'attacco enzimatico. Tali processi sono attualmente sfruttati per produrre etanolo, xilitolo, n-butanolo e 2,3-butandiolo tramite processi di fermentazione microbica.²⁴

Sebbene siano stati sviluppati diversi metodi di pretrattamento, prendendo in considerazione l'efficienza ed i costi operativi, la *steam-explosion* ed i pretrattamenti acidi rimangono i due metodi più comunemente utilizzati²⁵, tuttavia, la non specificità del pretrattamento e della successiva idrolisi, porta alla formazione di

²⁴ Chandel, A.K., Singh, O.V. & Rao, L.V. (2010). Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art;

²⁵ Chandel, A.K., Chan, E.C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V., & Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

composti indesiderati, in grado di inibire la crescita dei microrganismi generalmente utilizzati in tali processi di bio-sintesi.

Questi inibitori possono essere suddivisi in tre gruppi principali:²⁶

- ✓ acidi organici (acetico, acido formico e levulinico)
- ✓ derivati del furano [furfurale e 5-idrossimetilfurfurale (5 -HMF)]
- ✓ composti fenolici

Questi composti influenzano le normali funzioni fisiologiche cellulari portando ad una diminuzione della redditività, resa e produttività del processo. La tossicità degli inibitori dipende da numerosi fattori, quali la loro concentrazione, il tipo di microrganismo utilizzato, la modalità e le condizioni di crescita (pH, inoculo, presenza di ossigeno e temperatura). Altrettanto numerose però sono le metodologie con cui un composto può portare ad un'inibizione della crescita microbica, alcuni ad esempio disturbano le funzioni della membrana cellulare, impedendo l'adsorbimento delle sostanze nutritive presenti all'interno del mezzo di coltura, altri inattivano il meccanismo di riproduzione cellulare o alterano l'attività di alcuni enzimi presenti all'interno della cellula o sulla membrana cellulare.

Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi ed importanti progressi per ottenere concentrazioni più elevate di zuccheri dal processo di idrolisi, così da diminuire l'impatto complessivo degli inibitori fermentativi e migliorare anche la fermentabilità degli idrolizzati lignocellulosici. Un ulteriore progresso però può essere ottenuto studiando dei processi che, oltre ad aumentare la concentrazione degli zuccheri, portino ad una riduzione della quantità di inibitori presenti all'interno dell'idrolizzato. Le resine a scambio ionico, il trattamento con carbone attivo, la disintossicazione enzimatica, trattamenti alcalini e over-liming con idrossido di calcio sono alcune delle strategie utilizzate per la disintossicazione degli idrolizzati di seconda generazione da questi inibitori.²⁷

Ci sono diversi metodi di disintossicazione, che si distinguono per la natura stessa del processo di purificazione adottato, si differenziano quindi in processi "fisici" (evaporazione, separazione con membrana), "chimici" (neutralizzazione, overliming con idrossido di calcio, trattamento con carboni attivi, resine a scambio ionico, estrazione con acetato di etile) e "biologici" (disintossicazione enzimatica mediata con laccasi o lignina perossidasi). Nella seguente tabella vengono riassunti i principali metodi di purificazione e disintossicazione degli idrolizzati lignocellulosici.

²⁶ Parawira, W. & Tekere, M. (2011) Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review;

²⁷ Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida, E. & Silva, J.B. (2006) . Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production;

Idrolizzato	Metodo di purificazione	Variazioni nella composizione dell'idrolizzato
Bagassa da zucchero di canna	Neutralizzazione	NA
<i>Saccarum spontaneum</i>	Over-liming	Furfurali - 42 %, fenoli -33%, riduzione degli zuccheri 7%
Legno di quercia	Carboni attivi	Fenoli -65%
Paglia di frumento	Resina a scambio ionico e Over-liming	Furfurali -90%, fenoli -77%, acido acetico -96%
Paglia di frumento	Estrazione con Acetato di etile e Over-liming	Furfurali -60%, fenoli -48%, acido acetico -92 %
Pioppo	Rotovaporizzazione	Acido acetico -54 %, furfurali -100%, venillio -29%
Abete	Filtrazione con membrana	Acido acetico -60%

Tabella 5: Esempi degli effetti di alcuni sistemi di purificazione per idrolizzati di seconda generazione²⁸;

1.3.1. Metodi fisici

1.3.1.1. Evaporazione

L' evaporazione sotto vuoto è in grado di eliminare i composti volatili come l'acido acetico, il furfurale e vanillina dall'idrolizzato lignocellulosico. Tuttavia, questo metodo non risulta efficace per ridurre la concentrazione di composti tossici non volatili (principalmente estratti e derivati della lignina). In letteratura sono presenti numerosi dati sperimentali riguardanti l'efficacia di questo metodo per l'eliminazione dei composti volatili. Palmqvist et al. [1996] riportano la totale eliminazione della frazione volatile contenuta in emicellulosa idrolizzata da legno di salice (10 % v/v) utilizzando un roto-evaporatore.²⁹ Wilson et al. [1989] riscontrano una diminuzione della concentrazione di acido acetico (54

²⁸ FONTE: Chandel, A.K., Singh, O.V. & Rao, L.V. (2010). Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art;

²⁹ Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M. & Zacchi, G. (1996). The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

%), furfurale (100 %) e vanillina (29 %).³⁰ Larsson et al. [1999] osservano la rimozione di furfurale (90 %) e HMF (4 %) tramite evaporazione sotto vuoto di emicellulosa derivante da idrolizzato di legno.³¹

1.3.1.2. Separazioni con membrana

Le membrane assorbenti microporose hanno gruppi funzionali superficiali legati alle loro pareti interne, che possono eliminare alcuni degli inibitori derivati dai processi di idrolisi acida. Wickramasinghe & Grzenia [2008], utilizzando questo sistema di purificazione per la biomassa idrolizzata, osservano prestazioni migliori nella rimozione dell'acido acetico rispetto a quelle ottenute utilizzando resine a scambio ionico. L'effetto delle varie fasi organiche diluite (Alamine 336, aliquat 336) per la rimozione di acido acetico (60 %) da paglia del mais idrolizzati con Alamine 336 è stato ulteriormente studiato da Grzenia et al. [2008].

In seguito, Grzenia nel 2010 ha utilizzato l'estrazione con membrana per la rimozione di acido solforico contenuto in idrolizzati emicellulosici di paglia del mais. Utilizzando Alamine 336 ed ottanolo come fase organica, è stata riscontrata la riduzione della concentrazione di acido solforico, acido acetico, acido formico e levulinico, nonché di furfurale e 5-HMF.³²

1.3.2. Metodi chimici

1.3.2.1. Neutralizzazione

A causa della natura altamente acida degli idrolizzati emicellulosici, la neutralizzazione è un passaggio che viene sempre effettuato prima di utilizzare l'idrolizzato in un processo di fermentazione. I composti alcalini più utilizzati per la neutralizzazione di idrolizzati sono l'idrossido di calcio o l'idrossido di sodio (pH 6,0-7,0). Durante il processo, i furfurali e i fenoli vengono rimossi mediante precipitazione.

1.3.2.2. Over-liming con idrossido di calcio

Questa metodologia è stata considerata per lungo tempo come un metodo di disintossicazione promettente per idrolizzati di biomassa lignocellulosica pretrattati con acido solforico diluito. È stato

³⁰ Wilson, J.J., Deschatelets, L. & Nishikawa, N.K. (1989). Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis*;

³¹ Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N. & Jonsson, L.J. (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce;

³² Grzenia, D.L., Schell, D.J. & Wickramasinghe, S.R. (2008). Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. *J. Membr. Sci.*; Grzenia, D.L., Schell, D.J. & Wickramasinghe, S.R. (2010). Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

dimostrato come questo processo permetta la rimozione di composti inibitori volatili come furfurale e idrossimetil furfurale (HMF) dall'idrolizzato, causando tuttavia una lieve perdita di zucchero (circa 10 %) per adsorbimento.³³

1.3.2.3. *Trattamento con carbone attivo*

La purificazione di idrolizzati emicellulosici attraverso l'utilizzo di carboni attivi è noto per essere un metodo efficace, mostrando un'elevata capacità di assorbimento dei composti inibitori, senza tuttavia intaccare i livelli di zuccheri nell'idrolizzato. L'efficacia del trattamento con carbone attivo dipende da diverse variabili di processo quali pH, tempo di contatto, la temperatura e il rapporto tra il volume di carbone attivo e il volume di idrolizzato liquido.

1.3.2.4. *Le resine a scambio ionico*

Il trattamento con resine a scambio ionico è stato principalmente utilizzato in ragione della capacità nell'eliminare gli inibitori principali della fase di fermentazione (acido acetico e furfurali).

Il trattamento con resine consente infatti di rimuovere la maggior parte degli inibitori (cioè acido levulinico, acetico, formico, furfurale e 5-HMF). Villarreal et al. (2006) ha studiato l'effetto di quattro diverse resine a scambio ionico (cationiche ed anioniche) per la purificazione di biomasse emicellulosiche idrolizzate derivanti da eucalipto, utilizzate successivamente nella produzione di xilitolo da *Candida guilliermondii*. La purificazione con resine a scambio ionico ha drasticamente migliorato la fermentabilità del idrolizzato. Dopo 48 h di fermentazione è stata raggiunta una concentrazione totale di xilitolo di 32,7 g/L, corrispondenti ad una produttività volumetrica di 0,68 g/L·h e un fattore di rendimento di circa 0,57 g/g di xilitolo.³⁴

1.3.2.5. *Estrazione con acetato di etile*

L'estrazione di inibitori della fermentazione utilizzando acetato di etile è stata sfruttata per aumentare la resa di etanolo in fermentazione di *P. stipitis* da 0 al 93 %. La procedura di estrazione porta alla riduzione della concentrazione di acido acetico (56 %), furfurale (100 %), vanillina e acido 4-idrossibenzoico.³⁵

³³ Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F. & Ingram, L.O. (2000) Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates;

³⁴ Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida, E. & Silva, J.B. (2006) . Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production;

³⁵ Wilson, J.J., Deschatelets, L. & Nishikawa, N.K. (1989). Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis*;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Utilizzando il processo di estrazione con acetato di etile o dietil-etero, circa l'84 % dei composti fenolici sono stati efficacemente rimossi dall'idrolizzato derivante da emicellulose di eucalipto.³⁶

1.3.3. Processi biotecnologici per la disintossicazione

I processi di purificazione biotecnologici comprendono quelle metodologie che prevedono l'applicazione di microrganismi e/o enzimi per la disintossicazione di idrolizzati lignocellulosici. I metodi biologici di disintossicazione sono più sostenibili rispetto ai processi chimico-fisici, comportano un minor numero di reazioni collaterali, in ragione della loro maggiore selettività, ed un minore fabbisogno energetico. A rendere tuttavia poco attraenti queste metodologie di purificazione sono il tempo di reazione, molto lungo, e la consistente perdita di zuccheri fermentabili.³⁷

1.3.3.1. Disintossicazione microbica in-situ

La purificazione di idrolizzati lignocellulosici utilizzando microrganismi, prevede la crescita di questi all'interno dell'idrolizzato e la disintossicazione dello stesso attraverso processi di bio-conversione degli inibitori ad opera dei microrganismi stessi.

Sono stati fatti tentativi per disintossicare gli idrolizzati lignocellulosici direttamente con lieviti, funghi e batteri *wild-type*³⁸ o microrganismi ricombinanti in grado di esprimere le proteine laccasi e perossidasi. Palmqvist et al. [1997] hanno usato *Trichoderma reesei* per degradare gli inibitori contenuti in una biomassa emicellulosica derivante dall'idrolisi di legno di salice, ottenendo consistenti miglioramenti nella produttività e nella resa di etanolo.³⁹

Più tardi Larsson [1999] ha usato lo stesso microrganismo (*T. reesei*) per la purificazione di un idrolizzato derivante dall'idrolisi acida di legno di abete ed ha riscontrato risultati migliori rispetto a quelli ottenuti attraverso processi di purificazione con resine a scambio anionico, over-liming o trattamento con enzima laccasi, tuttavia, tale processo di purificazione ha comportato un notevole consumo di zuccheri fermentabili (oltre 35 %).⁴⁰

³⁶ Cruz, J.M., Dominguez, J.M., Dominguez, H. & Parajo, J.C. (1999) Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity;

³⁷ Yang, B. & Wyman, C.E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic Ethanol;

³⁸ la versione di un microrganismo più comune in natura, senza quindi alcuna modificazione genetica;

³⁹ Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G. & Reczey, K. (1997) Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicelluloses hydrolysates obtained after steam pretreatment;

⁴⁰ Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N. & Jonsson, L.J. (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Okuda et al. [2008] hanno studiato la disintossicazione biologica di biomassa derivante da scarti di legno (WHW), utilizzando un batterio termofilo *Ureibacillus thermosphaericus*. Un'analisi cromatografica ha confermato che tale batterio ha degradato i composti fenolici presenti negli idrolizzati WHW. Il batterio inoltre, crescendo molto rapidamente, consuma meno del 5% di zuccheri fermentabili presenti all'interno dell'idrolizzato. ⁴¹

1.3.3.2. Purificazione enzimatica

Il processo di disintossicazione enzimatica è generalmente la via biotecnologica preferita per la purificazione da inibitori. Laccasi e perossidasi sono enzimi derivati da funghi *white-rot* (*Trametes versicolor*, *Phenorchete chrysosporium*, *Cythus Bulleri*, *C. stercoreous*, e *Pycnoporous cinnabarinus*) ritenuti efficaci per la rimozione di composti fenolici dagli idrolizzati lignocellulosici. Jonsson et al. [1998] ha utilizzato gli enzimi laccasi e perossidasi, derivanti dal fungo *T. versicolor*, per disintossicare l'idrolizzato derivante da legno di salice, riscontrando una rimozione di circa l'80 % dei composti fenolici. ⁴²

L'effetto dell'enzima laccasi derivato da *C. Bulleri* è stato anche testato per la detossificazione di biomasse derivanti da bagassa di canna da zucchero ed ha mostrato una rimozione dei composti fenolici di circa il 77%.

Considerando quindi l'efficienza di produzione di etanolo utilizzando idrolizzati trattati con laccasi rispetto ad idrolizzati non trattati, si riscontra un aumento della resa da 0,22 g/g a 0,37 g/g, per una concentrazione di etanolo totale di circa 6,50 g/L anzi che 3,46 g/L. ⁴³

La maggior parte dei metodi presentati, al livello di sviluppo attuale, non possiede un utilizzo a livello industriale, tuttavia, previo opportuni studi e sperimentazioni, potrebbe essere efficacemente ottimizzato su tale scala per la disintossicazione di idrolizzati lignocellulosici.

⁴¹ Okuda, N., Sonuera, M., Ninomiya, K., Katakura, Y. & Shioya, S. (2008) Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production;

⁴² Jonsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N-O. & Hahn-Hagerdal, B. (1998) Detoxification of wood hydrolysate with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *T. versicolor*;

⁴³ Chandel, A.K., Chan, E.C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V., & Ravindra, P. (2007); Economics and environmental impact of bioethanol production technologies;

BIBLIOGRAFIA

- [1] ENEA: Rapporto Energia Ambiente 2009-2010;
- [2] Renewables Information 2012, International Energy Agency (IEA);
- [3] Energia dalle Biomasse, Le tecnologie, i vantaggi per processi produttivi, i valori economici e ambientali; AREA Science Park (2006);
- [4] Energy for Climate in Europe, An assessment of energy policies;
- [5] www.parlamento.it/home, Obiettivi dell'Unione europea e provvedimenti nazionali di attuazione
- [6] The state of renewable Energy in Europe, EurObserv'ER, 2012;
- [7] EurObserv'ER, barometro della biomassa solida;
- [8] EurObserv'ER, barometro delle energie rinnovabili;
- [9] Speciale, Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile, 2013, ENEA anno 59;
- [10] Biotecnologie per la bioenergia, Vito Pignatelli, ENEA anno 59;
- [11] Energia dalle Biomasse, Le tecnologie, i vantaggi per processi produttivi, i valori economici e ambientali; AREA Science Park (2006);
- [12] The biological degradation of cellulose, Beguin and Aubert (1994). FEMS Microbiol Rev. 1994 Jan;13(1):25-58.;
- [13] Comparison of SO₂ and H₂SO₄ imregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production; Tengborn C. and Galbe M. (2001). Applied Biochemistry and Biotechnology Spring 1998, Volume 70-72, Issue 1, pp 3-15;
- [14] Process for ethanol from lignocellulosic materials: Acid-based hydrolysis process; Tazadad M.J. and Karim K. (2007). Bio Resources, Vol 2, No3;
- [15] Fermentability of the sugars from steam-exploded softwood; Bousaid A., Robinson J., Cai Y.J., Greg D.J. and Saddler J.R. (1999). BIOTECH PR, 17(5), 2001, pp. 887-892;
- [16] Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility; Chundawat S.P., Venkatesh B. and Dale B.E. (2007). Biotechnol Bioeng. 2007 Feb 1;96(2):219-31;
- [17] Biotecnologie ambientali per la valorizzazione integrata di residui organici dell'industria agro-alimentare (biowaste biorefinery) a sostegno della "zero waste strategy", Alberto Scoma, Lorenzo Bertin, Fabio Fava;
- [18] Handbook for the Prevention and Minimisation of Waste and Valorisation of by-products in European Agro-Food Industries; AWARENET(2004);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- [19] Olive Oil Wastewater as a Renewable Resource for Production of Polyhydroxyalkanoates, F. Valentino, M. Villano, L. Bertin, M. Beccari, M. Majone. (2011). HOBOKEN, NJ, John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 175 - 219;
- [20] Drop-in Versus Novel Chemicals, Chemical week Blog;
- [21] Un mondo senza Petrolio, MiniWatt.it;
- [22] <http://www.iea.org/statistics/topics/renewables>;
- [23] http://it.wikipedia.org/wiki/Enzima#Applicazioni_industriali;
- [24] Biologia, la scienza della vita, 2012; Zanichelli;
- [25] Tappe rilevanti per lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante;
- [26] http://it.wikipedia.org/wiki/Organismo_geneticamente_modificato;
- [27] Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends, Eurobarometer 64.3;
- [28] Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved Bioethanol production; Anuj K. Chandel, Silvio Silvèrio da Silva and Om V. Sigh (2012). Bioenerg. Res;
- [29] Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art; Chandel, A.K., Singh, O.V. & Rao, L.V. (2010). Sustainable biotechnology: renewable resources and new perspectives. Springer, Dordrecht, pp 63–81;
- [30] Economics and environmental impact of bioethanol production technologies; Chandel, A.K., Chan, E.C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V., & Ravindra, P. (2007). Biotechnol Mol Biol Rev 2:14–32;
- [31] Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review; Parawira, W. & Tekere, M. (2011). Crit Rev Biotechnol. 2011 Mar;31(1):20-31;
- [32] Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production; Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida, E. & Silva, J.B. (2006). Enzyme and Microbial Technology Volume 40, Issue 1, 6 December 2006, Pages 17–24;
- [33] The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation; Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M. & Zacchi, G. (1996). Enzyme and Microbial Technology 19; 470-476;
- [34] Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis*; Wilson, J.J., Deschatelets, L. & Nishikawa, N.K. (1989);
- [35] Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce; Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N. & Jonsson, L.J. (1999). Applied Microbiology and Biotechnology October 1999, Volume 31, Issue 5-6, pp 592-596;
- [36] Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates; Grzenia, D.L., Schell, D.J. & Wickramasinghe, S.R. (2008). Journal of Membrane Science Volume 322, Issue 1, 1 September 2008, Pages 189–195;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- [37] Detoxification of biomass by reactive membrane extraction; Grzenia, D.L., Schell, D.J. & Wickramasinghe, S.R. (2010). [37] Detoxification of biomass by reactive membrane extraction; Grzenia, D.L., Schell, D.J. & Wickramasinghe, S.R. (2010);
- [38] Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates; Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F. & Ingram, L.O. (2000). *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 69 (5) Sep 5, 2000;
- [39] Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis*; Wilson, J.J., Deschatelets, L. & Nishikawa, N.K. (1989). *Applied Microbiology and biotechnology*, 31:592-596;
- [40] Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity; Cruz, J.M., Dominguez, J.M., Dominguez, H. & Parajo, J.C. (1999). *Food Chemistry* Volume 67, Issue 2, November 1999, Pages 147–153;
- [41] Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic Ethanol; Yang, B. & Wyman, C.E. (2008). *Biofuels bioresour technol* 83: 1-11;
- [42] Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicelluloses hydrolysates obtained after steam pretreatment; Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G. & Reczey, K. (1997). *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 20, Issue 4, March 1997, Pages 286–293;
- [43] Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production; Okuda, N., Sonuera, M., Ninomiya, K., Katakura, Y. & Shioya, S. (2008). *J Biosci Bioeng.* 2008 Aug;106(2):128-33.;
- [44] Detoxification of wood hydrolysate with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *T. versicolor*; Jonsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N-O. & Hahn-Hagerdal, B. (1998). *Applied Microbiology and Biotechnology* June 1998, Volume 49, Issue 6, pp 691-697;

2. MATERIALI E METODI

Nella prima parte di questo capitolo verranno quindi illustrate le caratteristiche dei due principali protagonisti di tutta l'attività sperimentale svolta, ovvero il microrganismo utilizzato nelle procedure di crescita microbica (*E.coli* MG1655) e l'idrolizzato PROESA® utilizzato come fonte di zuccheri per la crescita del suddetto microrganismo. Verranno quindi illustrate le metodologie di analisi dei liquidi utilizzati ed ottenuti durante le prove sperimentali.

Nella seconda parte quindi verranno descritte le strumentazioni utilizzate per tutte le prove effettuate all'interno del laboratorio biotecnologico. In seguito, verranno presentate anche le descrizioni delle procedure relative alle attività condotte all'interno di questi laboratori, nonché la descrizione delle tecniche e dei software sfruttati per effettuare l'analisi dei dati ottenuti.

Nell'ultima parte verranno invece illustrati i differenti metodi di purificazione studiati in scala di laboratorio e pilota, illustrando le differenti specifiche dei sistemi testati ed adottati e le tecniche di elaborazione dei dati.

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (abbreviato *E. coli*) è un batterio Gram-negativo⁴⁴ ed è la specie più nota del genere *Escherichia*: al suo interno si distinguono almeno 171 sierotipi⁴⁵ caratterizzati da diverse combinazioni degli antigeni O, H, K, F. Il nome deriva dal suo scopritore, il tedesco-austriaco Theodor Escherich.

Appartiene al gruppo degli enterobatteri ed è usato comunemente come organismo modello dei batteri in generale.

⁴⁴ I microrganismi Gram negativo hanno una parete cellulare sottile con solo 1-2 strati di peptidoglicano;

⁴⁵ Analogo di una "sottospecie" nel regno animale;

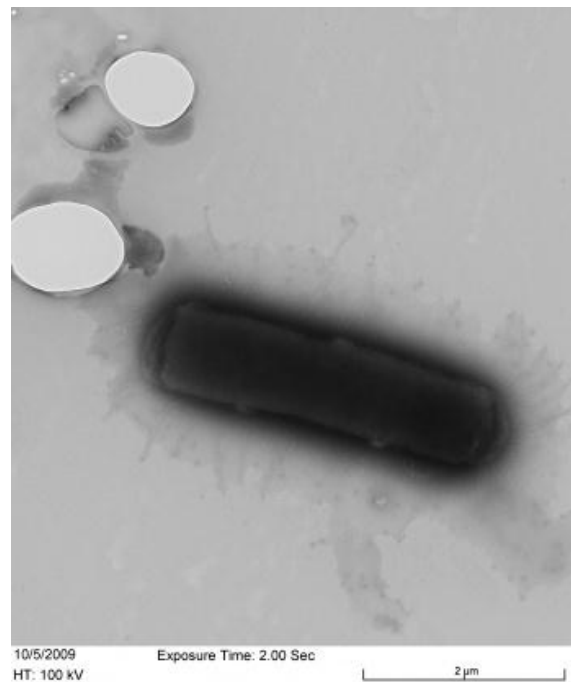


Figura 13: *E.coli* colorato negativamente con ammonio molibdato e analizzato al microscopio elettronico⁴⁶;

La specie *Escherichia coli* è un microrganismo a forma di bastoncello, con dimensioni di circa 0,5 micron di larghezza da 2 micron di lunghezza, aerobio e anaerobio facoltativo⁴⁷, non sporigeno, che cresce alla temperatura di 44,5 °C, lattosio-fermentante.

Qui di seguito è specificata la tassonomia della specie *Escherichia coli*:

- ✓ Bacteria;
- ✓ Proteobacteria;
- ✓ Gammaproteobacteria;
- ✓ Enterobacteriales;
- ✓ Enterobacteriaceae;
- ✓ *Escherichia*.

Esistono diversi ceppi di *E.coli* utilizzati per la ricerca di base in laboratorio, la maggior parte dei quali deriva dai due ceppi: K-12 e B. Le motivazioni principali che spingono i ricercatori ad utilizzare questi due particolari ceppi, sono legate principalmente alla notevole conoscenza derivata dall'utilizzo di questi due

⁴⁶ Christos Savva (Microscopia Imaging Center) e Thomas Wood (Dipartimento di Ingegneria Chimica) presso la Texas A&M University;

⁴⁷ Non necessita di ossigeno, ma cresce meglio in presenza di ossigeno;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

cappi già dai primi del novecento (1922). Proprio grazie alla sua lunga storia di coltura in laboratorio e la sua facilità di manipolazione *E. coli* gioca un ruolo importante nella moderna ingegneria biologica e microbiologia industriale. Questo microrganismo inoltre è stato uno dei primi organismi ad avere completamente sequenziato il proprio genoma (*E. coli* K-12, MG1655 nel 1977).

Considerato un “host”⁴⁸ molto versatile per la produzione di proteine eterologhe⁴⁹, *E. coli* permette la produzione di massa di proteine attraverso processi di fermentazione industriale. Una delle prime applicazioni utili della tecnologia del DNA ricombinante è stata la manipolazione di *E. coli* a produrre insulina umana. Varianti geneticamente modificate di *E. coli* sono state utilizzate nello sviluppo dei vaccini e la produzione di enzimi immobilizzati, o per produrre proteine credute difficile se non impossibile per *E. coli*, come quelle contenenti legami disolfuro⁵⁰ o quelli che richiedono modificazione post-traduzionale di stabilità o funzione.

L'E.coli è spesso utilizzato come organismo modello negli studi di microbiologia. Proprio per queste ragioni il ceppo di *E.coli* K-12 MG1655 è stato selezionato come microrganismo per gli studi effettuati all'interno di questo progetto di tesi. Il microrganismo MG1655 (chiamato così da Mark Guyer) deriva da un ceppo W1485, a sua volta ottenuto in laboratorio da Joshua Lederberg da un discendente della sub-cultura dell'originale K-12, precedentemente ottenuto da un campione di feci di un paziente affetto da difterite a Palo Alto, California, nel 1922.

Per meglio comprendere i risultati di questa tesi, riportiamo qui di seguito l'andamento della crescita di *E.coli* effettuata all'interno di una beuta con i frangiflutti in un terreno di crescita commerciale al quale è stato aggiunto glucosio sintetico ad una concentrazione finale di 20g/L⁵¹.

⁴⁸ Microrganismo “ospite” in un processo di trasferimento di DNA;

⁴⁹ Proteina eterologa: una proteina che l'organismo da cui l'hai isolata normalmente non dovrebbe produrre;

⁵⁰ A causa dell' ambiente cellulare, normalmente troppo riducente nei confronti dei legami disolfuro;

⁵¹ Terreno di coltura [100ml]: 20 ml di M9(5x), 0,2 g di YE e 8 ml di glucosio sintetico (50%).

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

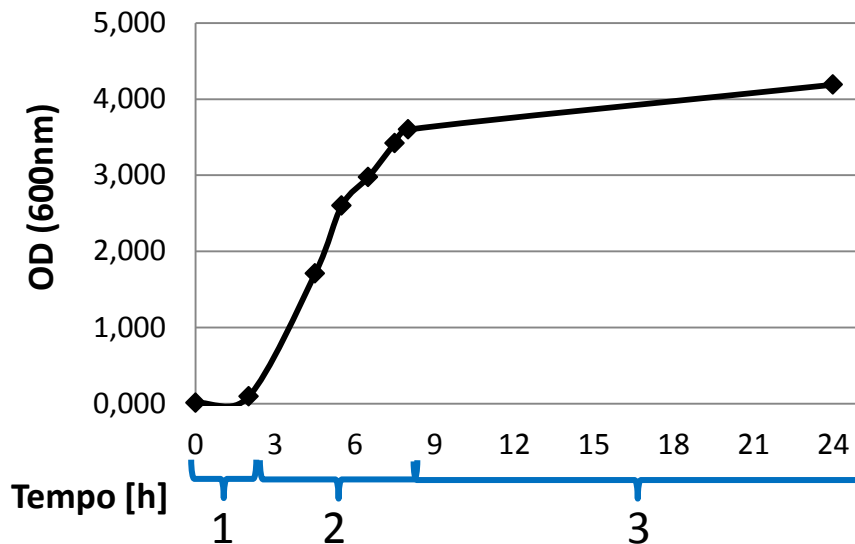


Figura 14: Crescita E.coli in M9YE con glucosio sintetico (20g/L);

Osservando i dati relativi alla densità ottica misurata allo spettrofotometro (lunghezza d'onda 600 nm) è possibile distinguere tre differenti fasi della crescita del microrganismo. La misura della densità ottica è una metodologia utilizzata generalmente per l'osservazione della crescita di una popolazione microbica, essa infatti è proporzionale al numero di microrganismi presenti all'interno della coltura.

Nella prima fase (1), definita *fase di latenza*, il microrganismo non presenta alcuna crescita. Quando infatti una popolazione batterica viene inoculata in un terreno fresco di solito la crescita non inizia immediatamente, ma soltanto dopo un certo periodo di tempo generalmente dipendente, oltre che dal tipo di microrganismo, dalle differenze tra il terreno dal quale è stato inoculato e quello fresco; terminata la fase di adattamento (1-2 ore) il microrganismo cresce in maniera esponenziale (fase 2) senza alcuna limitazione, tale fase viene denominata *fase esponenziale* proprio in ragione della velocità di crescita della popolazione batterica; al termine della fase esponenziale di crescita quindi si raggiunge un plateau dal quale ha inizio la *fase stazionaria* (3), in questa fase non si ha né un aumento né diminuzione della popolazione batterica. Queste tre fasi di crescita sono riscontrabili nella crescita di qualunque microrganismo.

Alcune delle informazioni principali che possono essere dedotte analizzando il grafico della misurazione della densità ottica in funzione del tempo sono quindi:

- ✓ Tempo di latenza: la misura in ore del tempo di adattamento, ovvero il tempo intercorso tra l'inoculo e l'inizio della crescita microbica all'interno del terreno di coltura;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Velocità di crescita (μ): la misura della velocità della crescita della popolazione batterica all'interno del terreno di coltura nella fase esponenziale di crescita (2). Essa viene misurata attraverso la proporzione del logaritmo naturale della densità ottica lungo la fase di crescita esponenziale ed il tempo intercorso tra le due misurazioni:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{OD_{600}(t_1)}{OD_{600}(t_2)} \right)}{(t_1 - t_2)}$$

2.2. Idrolizzato PROESA®

Per meglio comprendere i risultati sperimentali ottenuti durante questo lavoro sperimentale, è bene sottolineare che tutte le prove eseguite hanno utilizzato come fonte di zuccheri un unico liquido, prodotto attraverso il sistema PROESA®, brevettato dall'azienda Biochemtex Italia s.p.a..

Questo liquido deriva dalla lavorazione di una biomassa di seconda generazione di paglia di frumento. La biomassa di origine, di carattere lignocellulosico, ha subito il pretrattamento del sistema PROESA® al fine di permettere la separazione delle tre componenti, cellulosa, emicellulosa e lignina, e l'idrolisi enzimatica di cellulosa ed emicellulosa. Al termine del processo di idrolisi quindi l'idrolizzato attraversa un processo di filtrazione al fine di rimuovere i solidi e viene successivamente concentrato.

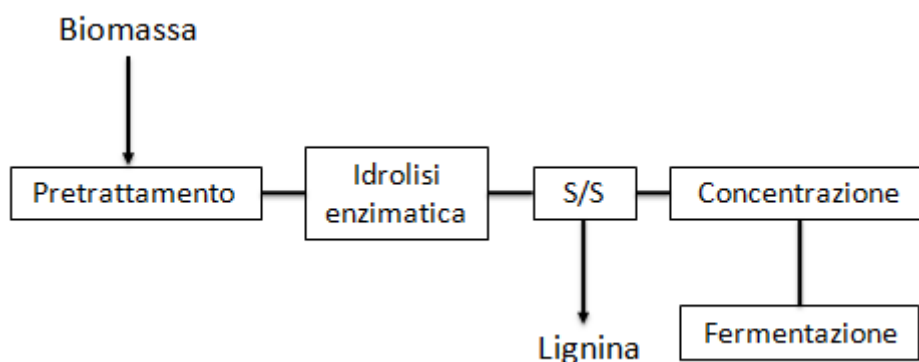


Figura 15: Schematizzazione degli stadi di produzione ed utilizzo dell'idrolizzato PROESA®;

2.2.1. Pretrattamento biomasse lignocellulosiche PROESA®

Come accennato nel capitolo precedente tra i fattori che incidono sull'idrolisi della cellulosa sono riconosciuti l'accessibilità della matrice alle cellulasi⁵², il grado di cristallinità delle fibre di cellulosa e il contenuto di emicellulose e lignina, queste ultime infatti, proteggendo i polimeri di cellulosa, rendono difficoltoso l'accesso enzimatico riducendo l'efficienza idrolitica.

Lo scopo del pretrattamento è proprio quello di destrutturare la matrice lignocellulosica, separandola nelle componenti polimeriche principali, rendendole accessibili all'azione degli enzimi prevista nello stadio successivo. La Biochemtex ha sviluppato un nuovo metodo di pretrattamento che prevede l'autoidrolisi della biomassa lignocellulosica tramite l'utilizzo di vapor d'acqua saturo (*Steam Explosion*) e consente di ottenere il rilascio dei polisaccaridi in modo rapido, con basso consumo energetico e senza l'aggiunta di prodotti chimici (es. acidi). Questo tipo di pretrattamento minimizza la formazione di prodotti di degradazione delle biomasse lignocellulosche, come ad esempio acido organici, furfurale o idrossimetilfurfurale (5-HMF), che agiscono come inibitori del processo fermentativo.

Tra i vari processi di pretrattamento, la *Steam Explosion* è generalmente riconosciuto come il più efficace considerando l'elevata resa di idrolisi mostrata, il basso consumo di additivi chimici e valutando anche fattori economici e ambientali.

tipo di pretrattamento	resa di zuccheri fermentabili	degradazione in sostanze inibitrici	uso di agenti chimici	produzione di scarti	costi di investimento
acido debole	++	--	--	-	+/-
acido forte	++	--	--	-	-
<i>steam-explosion</i>	+	--	++	+	-
solventi organici	++	++	--	+	--
metodi meccanici	-	++	++	++	+
estrazione alcalina	++/+	++	--	-	++

Tabella 6: comparazione di diversi tipi di pretrattamenti⁵³;

Il materiale è caricato all'interno di una camera di reazione, dove viene riscaldato usando vapore ad alta pressione (20-50 bar, 210-290° C) per pochi minuti, una volta raggiunta la temperatura e la pressione desiderata, il materiale viene trasferito in una camera di espansione, dove la reazione viene interrotta da un'improvvisa espansione a pressione atmosferica.

⁵² Enzima che catalizza l'idrolisi dei legami 1,4-β-D-glicosidici nella cellulosa;

⁵³ Fonte: I. DE BARI, ENEA, 2008

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

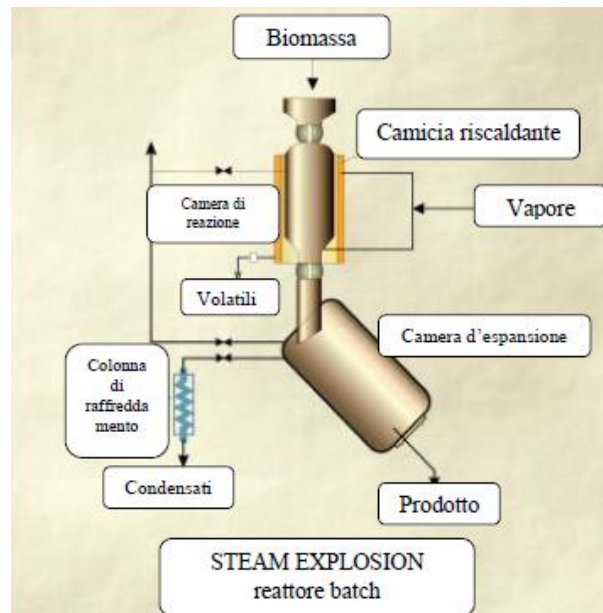


Figura 16: Schematizzazione del processo di steam explosion;⁵⁴

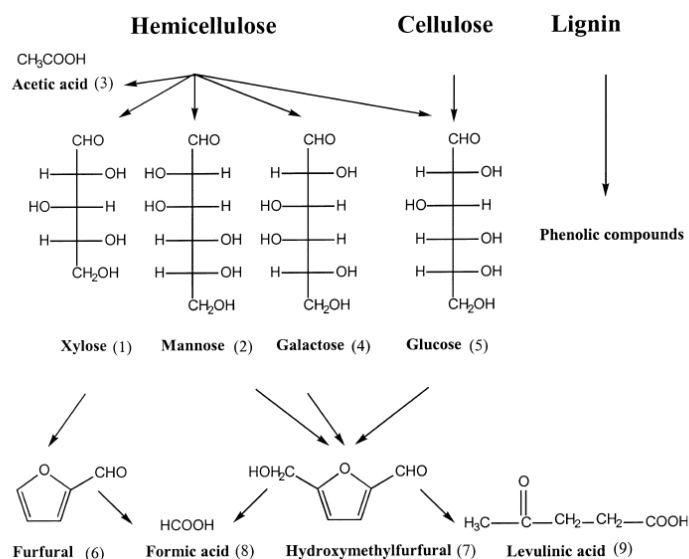
I limiti della *steam explosion* consistono nella degradazione di parte degli xilani, destrutturazione incompleta della matrice protettiva formata da lignina e polisaccaridi e generazione di composti inibitori.

Durante il pretrattamento sopra descritto viene formata una varietà di composti solubili, potenziali inibitori della crescita microbica e dell'attività fermentativa. Queste sostanze causano un allungamento della fase lag di fermentazione, improduttiva, ritardando drasticamente l'inizio dell'attività dei microrganismi e nelle fasi successive della fermentazione possono comportare una riduzione della resa cellulare complessiva.

Alcuni studi hanno mostrato come l'effetto inibente dei prodotti rilasciati nel corso del pretrattamento sembra limitato al solo stadio di fermentazione, non sembra quindi influenzare l'attività dell'idrolisi enzimatica.

La quantità, la natura e il danno potenziale degli inibitori varia molto in base al materiale di partenza, alle condizioni di pretrattamento (tempo, temperatura, pressione, pH, condizioni redox e presenza di catalizzatori) e al microrganismo fermentante usato.

⁵⁴ FONTE: Divisione Fonti Rinnovabili e Cicli Avanzati di Energia - Sezione Biomasse, —Overview of the bioethanol production F. Zimbardi, E. Viola, A. Gallifuoco;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Figura 17: schematizzazione dei meccanismi di produzione dei principali inibitori;

Il taglio dei legami glicosidici per autoidrolisi dell'emicellulosa libera glucosio, galattosio, xilosio, mannosio e acido acetico, mentre dalla cellulosa viene rilasciato esclusivamente glucosio.

Una tale degradazione, interessante per la destrutturazione delle catene polisaccaridiche, è indesiderata per via dei composti che ne possono derivare. Tra questi, il 5-idrossimetilfurfurale (5-HMF) si forma a partire da glucosio e altri esosi (galattosio, mannosio), mentre dalla degradazione dello xilosio, sottoposto ad elevate temperature, si genera furfurale.

L'acido formico deriva dalla rottura di 5-HMF e furfurale. L'HMF viene ulteriormente degradato in acido levulinico e composti fenolici quali l'acido idrossibenzoico, la vanillina, l'alcol diidroconiferilico derivano invece dalla degradazione della lignina. L'acido acetico è inoltre legato alle catene dell'emicellulosa e rilasciato in soluzione in seguito ad autoidrolisi. Acidi idrocarbossilici quali l'acido glicolico e l'acido lattico sono comuni prodotti di degradazione derivati dal trattamento con alcali di carboidrati.

2.2.2. Idrolisi enzimatica della biomassa lignocellulosica

L'idrolisi è lo stadio del processo necessario ad ottenere zuccheri semplici dai polisaccaridi, presenti naturalmente nelle biomasse lignocellulosiche e liberati con il passaggio di pretrattamento. La tipologia di idrolisi scelta è l'idrolisi enzimatica, favorita dalle condizioni del materiale in uscita dal pretrattamento. L'idrolisi è effettuata da un cocktail di enzimi cellulolitici che permettono di ottenere dalla frazione cellulosica zuccheri esosi (a 6 atomi di carbonio) come il glucosio, mentre la frazione composta dall'emicellulosa viene scissa in una miscela di zuccheri pentosi, dove xilosio e arabinosio sono i componenti più abbondanti.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Un cocktail idrolitico efficiente è composto da diversi enzimi che svolgono ognuno un'azione specifica sulle varie componenti delle biomasse lignocellulosiche. Per scindere la cellulosa a zuccheri semplici infatti sono necessari almeno tre diversi enzimi: endocellulasi, esocellulasi e β -glucosidasi. Ognuno di questi enzimi taglia il polimero di cellulosa in un punto specifico ed è solo la loro azione combinata che permette di ottenere gli zuccheri monomerici. L'emicellulosa, diversamente dalla cellulosa, è un eteropolimero ramificato, per essere idrolizzata efficacemente necessita quindi non solo degli enzimi responsabili dell'idrolisi a monomero xilosio, che ne forma lo scheletro, ma anche di altre attività enzimatiche accessorie, che scindono i legami tra lo xilosio e gli altri zuccheri presenti.

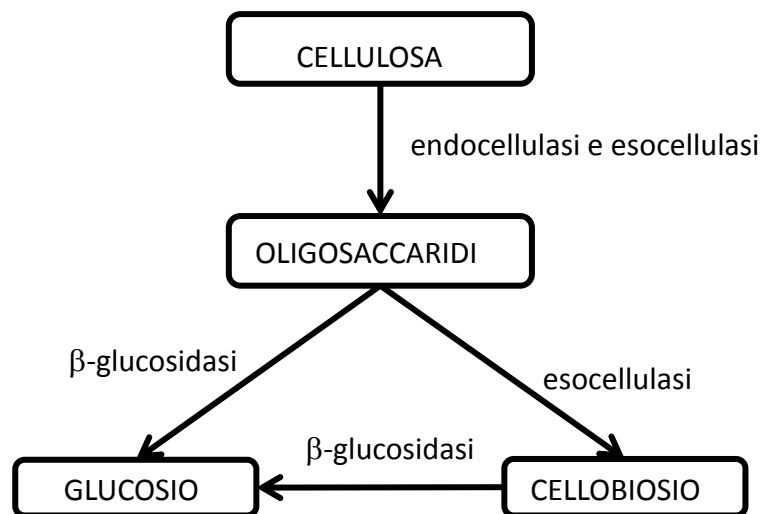


Figura 18: Schematizzazione della funzione degli enzimi endocellulasi, esocellulasi e β -glucosidasi sulla degradazione della cellulosa;

2.2.3. Composizione

Al termine del processo PROESA®, l'idrolizzato prodotto appositamente per la realizzazione di questo elaborato è stato analizzato sfruttando i metodi analitici HPLC ed IC (2.4.1). La composizione dell'idrolizzato PROESA® è riportata nella seguente tabella:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Analisi HPLC		Idrolizzato PROESA®
Xilobiosio	g/L	0,31
Glucosio	g/L	70,56
Xilosio	g/L	39,90
Arabinosio	g/L	1,67
Glicerolo	g/L	0,52
Acido formico	g/L	0,60
Acido lattico	g/L	0,00
Acido acetico	g/L	2,79
Etanolo	g/L	0,00
5-HMF	g/L	0,04
Furfurale	g/L	0,08

Analisi IC		
Cloruro	g/L	0,41
Nitrato	g/L	0,28
Solfato	g/L	0,34
Fosfato	g/L	0,45
Sodio	g/L	0,08
Ammonio	g/L	0,01
Potassio	g/L	3,79
Magnesio	g/L	0,15
Calcio	g/L	0,53

Figura 19: Analisi ad HPLC ed IC dell'idrolizzato PROESA®,⁵⁵

Osservando i dati relativi alla concentrazione dei diversi componenti dell'idrolizzato al termine del pretrattamento e del processo di idrolisi è facile identificare come ad un'elevata concentrazione di zuccheri corrisponda anche una consistente quantità di acidi organici (acido acetico e formico), mentre per quanto riguarda gli ioni presenti in soluzione all'interno dell'idrolizzato la concentrazione complessiva è di 6,04 g/L, il cui 63% è rappresentato dagli ioni potassio (K⁺), questo in ragione dell'aggiunta di potassa (KOH) a seguito del processo di auto idrolisi.

Per comprendere le caratteristiche fisiche dell'idrolizzato PROESA® utilizzato in questo elaborato è utile considerare anche alcuni altri dati relativi alle caratteristiche fisiche di questo liquido:

⁵⁵ NOTA: i valori riportati con "0,00" indicano una concentrazione del composto al di sotto della specifica minima della macchina, ovvero una presenza del composto in ragione di pochi ppm; un valore assente indica l'effettiva assenza del composto analizzato all'interno del campione; il simbolo "/" rappresenta invece un'analisi non effettuata;

Densità [kg/L]	1,04
Contenuto solido [%]	14
Contenuto liquido [%]	86
pH	4,4
gradi brix [°B]	11,6

Tabella 7: Caratteristiche fisiche dell'idrolizzato PROESA®;

2.3.Terreni

Come già accennato un microrganismo per poter crescere, oltre che agli zuccheri contenuti all'interno dell'idrolizzato (fonte di carbonio), necessita di molti altri elementi indispensabili per l'espressione di tutte le proteine e gli enzimi necessari per la sua crescita e per la sintesi dei prodotti di interesse, esiste infatti la possibilità che, soprattutto per la produzione di proteine eterologhe, il microrganismo necessiti di cofattori che non apportano alcun beneficio effettivo al processo di crescita, ma sono indispensabili per l'espressione di tali proteine. L'apporto di tali sostanze nutritive al microrganismo viene garantito dall'utilizzo di terreni di tipo commerciale o prodotti all'interno dei laboratori proprio per garantire al microrganismo gli elementi nutritivi essenziali.

In questo paragrafo verranno descritti i tre terreni utilizzati durante la parte sperimentale di questo progetto:

- ✓ M9YE
- ✓ LB
- ✓ FERM-M

2.3.1. M9YE

Il terreno di crescita denominato M9YE è in realtà l'unione di un terreno minimale commerciale M9 ad estratto di lievito (yeast extract – YE). Il terreno commerciale "M9 salt minimal" della SIGMA-ALDRICH è un mezzo di crescita microbica, utilizzato generalmente come riferimento per la crescita di *E.coli*. Questo mezzo minimo microbico contiene una soluzione tampone, sali e fonte di azoto, quindi è tradizionalmente integrato con glucosio, amminoacidi e vitamine secondo necessità. La composizione di tale terreno è riportata qui di seguito:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ 33,9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 15 g/L KH_2PO_4
- ✓ 5 g/L NH_4Cl
- ✓ 2,5 g/L NaCl

Il componente commerciale “Yeast Extract” della SIGMA-ALDRICH viene utilizzato proprio come fonte di amminoacidi e vitamine. L’estratto di lievito infatti è la parte idrosolubile derivante dalla liofilizzazione di lievito, contiene una miscela di amminoacidi, peptidi, vitamine idrosolubili e carboidrati.

La preparazione di questo terreno composito, in ragione di un volume totale di 1 L, prevede l’aggiunta di 56 g di “M9 salt minimal” e di 10 g di “Yeast Extract” a 800 mL di acqua demineralizzata. La soluzione viene quindi messa sotto costante agitazione sino alla completa solubilizzazione dei due componenti del terreno e rabboccata sino a raggiungere un volume totale di 1 L. Il terreno così composto corrisponde ad una dose cinque volte concentrata e prende la denominazione di M9YE 5x, per essere utilizzato quindi deve essere opportunamente diluito (per ottenere un terreno di 100 mL di M9YE saranno necessari 20 mL di M9YE 5x e 80 mL di acqua demineralizzata)

2.3.2. LB

Il terreno di coltura LB è invece un terreno definito “ricco”. Il “Luria Broth (LB), Miller (1900)” della SIGMA-ALDRICH è un terreno formato da cloruro di sodio (0,5 g/L), triptone (10 g/L) ed estratto di lievito (5 g/L) tipicamente in combinazione con agar⁵⁶ (15 g/L) utilizzato principalmente per coltura delle famiglie Enterobacteriace.

La preparazione di questo terreno, in ragione di un volume totale di 1L, prevede l’aggiunta di 20 g di “Luria Broth(LB), Miller (1900)” ad 800 mL di acqua demineralizzata. La soluzione viene quindi messa sotto costante agitazione sino alla completa solubilizzazione dei due componenti del terreno e rabboccata sino a raggiungere un volume totale di 1L.

⁵⁶ L’Agar-Agar è un polimero costituito principalmente da unità di D-galattosio;

2.3.3. FERM-M

Si tratta del terreno utilizzato dalla Biochemtex s.p.a. per la crescita di *E.coli* nelle prove che utilizzano idrolizzato come fonte di zuccheri. Esso contiene una fonte di ammonio, di solfato, di fosfato, di sali e di metalli in tracce. I composti utilizzati per la costruzione di questo terreno di coltura sintetico sono:

- ✓ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ✓ K_2HPO_4
- ✓ $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ Yeast Extract
- ✓ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{Fe}_3^+ \cdot y\text{NH}_3$
- ✓ Trace element

2.4. Analisi

Nel seguente paragrafo verranno illustrati i diversi sistemi utilizzati per l'analisi dei campioni raccolti durante la parte sperimentale di questo progetto di tesi .

Per quanto riguarda l'analisi composizionale dei campioni sono stati sfruttati due sistemi, un HPLC per la misurazione della concentrazione (g/L) dei componenti principali dei liquidi uscenti dal ciclo PROESA[®], ed un IC per la misurazione della concentrazione (g/L) degli ioni contenuti in tali liquidi.

Per quanto riguarda le misurazioni effettuate in maniera diretta durante la parte sperimentale, esse riguardano principalmente la misurazione dei parametri di crescita di una popolazione batterica, attraverso la misura della densità ottica e del peso cellulare secco (g/L), di tali metodologie verrà data una spiegazione più accurata, comprensiva delle procedure eseguite.

2.4.1. Cromatografia

Le metodologie strumentali della cromatografia liquida ad alta pressione (*High-performance liquid chromatography* - HPLC) e della cromatografia liquida a scambio ionico (IC), sono entrambe frutto dell'evoluzione tecnologica delle tecniche di cromatografia su colonna.

Le sostanze separate sono trascinate lungo la colonna e raccolte per la determinazione qualitative e quantitativa (rilevazione).

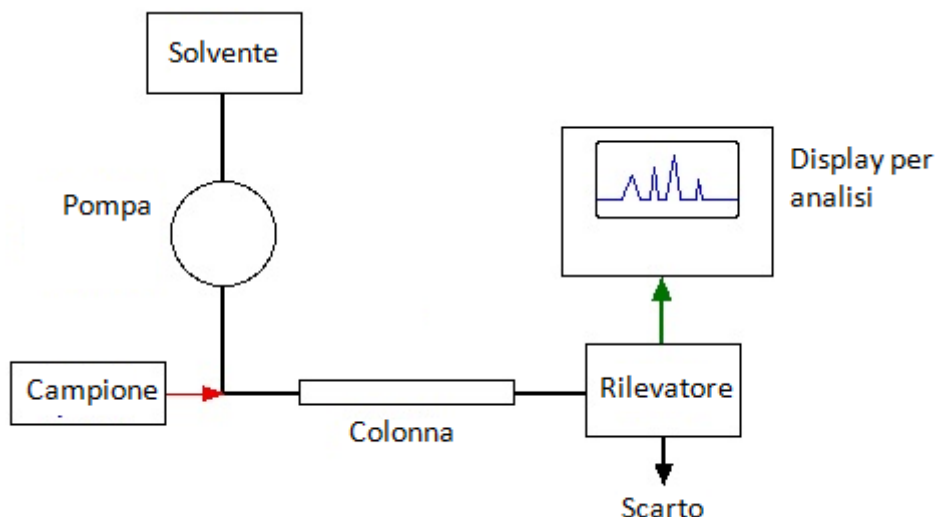


Figura 20: Schematizzazione impianto per analisi cromatografica;

La strumentazione utilizzata dalla Biochemtex s.p.a. per l'analisi HPLC è denominata "HPLC Ultimate 3000" prodotta dalla Dionex, che utilizza due differenti colonne:

- ✓ Varian Metacarb 67H (300x6,5mm);
- ✓ Biorad Aminex HPX-87P (300x7,8mm);

e due differenti sistemi di rilevazione:

- ✓ Rilevatore IR
- ✓ Rilevatore UV (210 nm)

Le due colonne sono utilizzate separatamente per l'analisi di componenti differenti, nella seguente tabella viene riportato il tempo di ritenzione ed i sistemi di rilevazione dei diversi componenti per le due colonne divisi per congeneri⁵⁷.

⁵⁷ Congenere: gruppo di molecole dello stesso genere ma non isomere;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

CONGENERE	TEMPO DI RITENZIONE (min)	RIVELATORE
Cellobiosio	4,29	Indice di rifrazione
Xilobiosio	4,55	Indice di rifrazione
Glucosio	5,28	Indice di rifrazione
Xilosio	5,65	Indice di rifrazione
Arabinosio	6,18	Indice di rifrazione
Acido lattico	7,33	Indice di rifrazione
Glicerolo	7,63	Indice di rifrazione
Acido formico	7,73	UV (210nm)
Acido acetico	8,61	Indice di rifrazione
Acido levulinico	9,47	Indice di rifrazione
Etanolo	11,85	Indice di rifrazione
5-HMF	17,11	UV (280nm)
2-furfurale	23,22	UV (280nm)

Tabella 8: tempi di ritenzione per la colonna Varian Metacarb 67H;

CONGENERE	TEMPO DI RITENZIONE (min)	RIVELATORE
Glucosio	20,66	Indice di rifrazione
Xilosio	22,62	Indice di rifrazione
Arabinosio	26,81	Indice di rifrazione

Tabella 9: tempi di ritenzione per la colonna Biorad Aminex HPX-87P;

La cromatografia a scambio ionico, o semplicemente cromatografia ionica (IC), invece è il tipo di cromatografia che si basa sul principio di attrazione tra gli ioni di carica opposta. Si tratta quindi di un processo cromatografico in cui la fase stazionaria è costituita da una resina a scambio ionico, ossia un supporto organico al quale sono legati dei gruppi ionici o ionizzabili (ad esempio $-SO_3^-$, $-COO^-$, $-NR_3^+$). I gruppi ionici della resina trattengono per mezzo di interazioni elettrostatiche, contro-ioni di carica opposta che possono essere scambiati con gli ioni presenti nella fase mobile. Il meccanismo di separazione è basato perciò sulla diversa affinità che i diversi soluti (ionici) presentano nei confronti dei gruppi attivi della resina.

La strumentazione utilizzata dalla Biochemtex s.p.a. per l'analisi HPLC è denominata "ICS-900" prodotta dalla Dionex che utilizza due differenti colonne:

- ✓ Una per gli anioni AS11-HC;
- ✓ Una per i cationi CS12 A

Le due colonne sono utilizzate separatamente per l'analisi di componenti differenti, nella seguente tabella viene riportato il tempo di ritenzione ed i sistemi di rilevazione dei diversi componenti per le due colonne.

ione	Tempo di ritenzione [min]
Cloruro	7,88
Nitrato	8,57
Solfato	13,55
Fosfato	17,52

Tabella 10: Tempi di ritenzione per la colonna AS11-HC;

ione	Tempo di ritenzione [min]
Sodio	4,29
Ammonio	4,89
Potassio	6,09
Magnesio	10,28
Calcio	12,86

Tabella 11: Tempi di ritenzione per la colonna CS12 A;

2.4.2. Densità ottica

Come accennato la misura della densità ottica è una metodologia utilizzata generalmente per l'osservazione della crescita di una popolazione microbica, poiché l'assorbanza del liquido di coltura è proporzionale al numero di microrganismi presenti all'interno della coltura.

L' OD_{600} del mezzo di crescita viene quindi misurato attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro a doppio raggio, così da monitorare la crescita del microrganismo attraverso la misura della densità ottica della coltura in riferimento ad un campione la cui densità ottica nota.

Le analisi di assorbanza sono state effettuate sfruttando lo spettrofotometro a doppio raggio Scan 100 della CARY. Uno spettrofotometro a doppio raggio misura il rapporto dell'intensità luminosa di due diversi percorsi della luce, uno che attraversa il campione e l'altro che attraversa il riferimento.

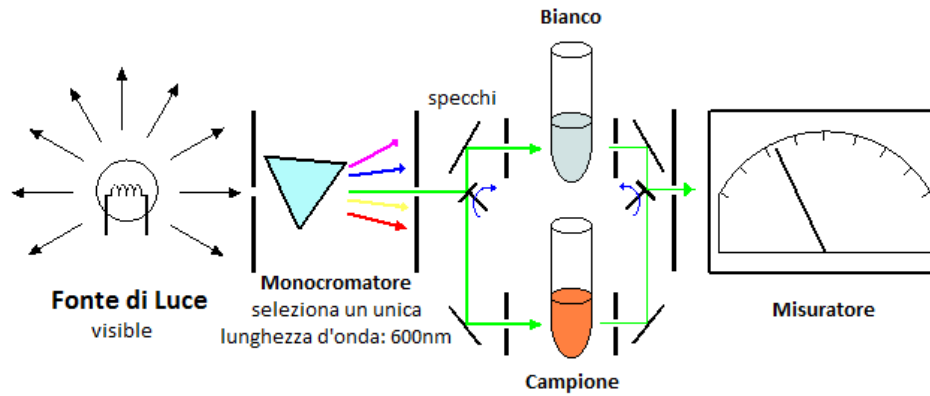


Figura 21: Schematizzazione di uno spettrofotometro a doppio raggio;

La spettrofotometria della regione del visibile (tra ca. 400 e ca. 700 nm), viene usata estesamente nella misurazione dell'assorbanza. L'assorbanza (o densità ottica, indicata con OD) in spettroscopia è definita come il logaritmo dell'inverso della trasmittanza, ovvero della frazione di luce incidente (ad una data lunghezza d'onda) che attraversa un campione;

$$T = 100 \times \frac{\text{emissione luce "bianco"}}{\text{emissione luce "campione"}}$$

$$A_{10} = -\log T$$

La misura dell'OD₆₀₀ di una coltura batterica viene effettuata prelevando 2 mL del terreno di crescita sotto una cappa biologica, tale accorgimento è necessario per ridurre al minimo le possibilità di contaminazione del terreno di crescita durante il prelievo del campione da analizzare. Il volume prelevato viene poi trasferito all'interno di un'apposita cella, denominata "campione", e la misura della sua assorbanza viene paragonata a quella di una analoga cella contenente il campione di terreno non inoculato, denominato "bianco", così da avere la misura dell'OD₆₀₀ relativo alla sola differenza di assorbanza tra il "campione" ed il "bianco".

2.4.3. Peso cellulare secco

Un'ulteriore analisi che può essere effettuata per calcolare la quantità di microrganismi presenti all'interno di una coltura batterica è la valutazione del peso cellulare secco (*dry cell weight-DCW*), ovvero il peso in grammi dei microrganismi contenuti in un litro del mezzo di coltura.

Per effettuare tale misurazione vengono prelevati 5 ml dell'ambiente di crescita ai quali vengono aggiunti 10 ml di acqua demineralizzata in una provetta il cui peso sia noto. Il campione diluito viene quindi

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

centrifugato alla velocità di 4000 rpm per 15 minuti, così che all'interno del campione vengano separati una fase surnatante ed una fase solida umida. La fase liquida viene accuratamente eliminata, mentre la fase solida viene ulteriormente diluita con 10 ml di acqua demineralizzata. Il campione diluito viene quindi agitato con un vortex (provetta shaker) per 2 minuti, quindi nuovamente centrifugato alla velocità di 4000 rpm per 15 minuti. La fase surnatante del campione viene eliminata e la fase solida trasferita per 72 ore in una stufa pre-riscaldata a 80°C.

Il calcolo della quantità di microrganismo presente al termine dell'essiccamento della frazione solida avviene sottraendo al peso della provetta contenente il campione (P_{lorido}), il peso della provetta vuota (P_{tara}).

$$DCW = \frac{P_{lorido}[g] - P_{tara}[g]}{0,005 [L]}$$

2.5. Strumentazione Bio-Laboratorio

Nel seguente paragrafo vengono descritte le principali strumentazioni utilizzate all'interno del bio-laboratorio della Biochemtex Italia s.p.a..

2.5.1. Incubatore agitante

In biologia, un incubatore è un dispositivo utilizzato per crescere e mantenere colture microbiologiche o colture cellulari. L'incubatore mantiene la temperatura ottimale, umidità e altre condizioni come il biossido di carbonio (CO₂) e il contenuto di ossigeno dell'atmosfera all'interno. Gli incubatori sono essenziali per gran parte del lavoro sperimentale in biologia cellulare, microbiologia e biologia molecolare e vengono utilizzati per cultura sia batterica che eucariotiche.

Un incubatore agitante, oltre a mantenere costanti parametri come temperatura, umidità e composizione dell'aria, permette di mantenere le colture in agitazione ad una velocità costante (rpm), tale accorgimento risulta necessario quando si intende condurre la sperimentazione mantenendo il mezzo di coltura omogeneo o si vuole consentire una minima ossigenazione al mezzo.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica



Figura 22: Orbital Shaker SHKE8000-8EC, MaxQ;

I laboratori della Biochemtex Italia s.p.a. sfruttano una incubatore agitato prodotto dalla MaxQ con denominazione *Orbital Shaker SHKE8000-8EC* le cui specifiche sono riportate nella seguente tabella:

Intervallo di velocità	Da 25 a 400 rpm \pm 1 rpm
Timer	Cronometro o timer (da 1 min. a 200 ore.)
Display	LED: Time, Speed, Temperature (“attuale” e “setpoint”)
Capacità	12 beute da 2 L
Cabinet	Heavy-gauge cold-rolled steel
Camera	Type 304 stainless steel
Interno	60,5 x 118,6 x 30 cm
Esterno	84,6 x 143,5 x 63,5 cm
Motore	1/3 hp DC brushless

Tabella 12: Specifiche dell’Orbital Shaker SHKE8000-8CE;

All’interno di ciascun incubatore è possibile alloggiare una piastra forata delle dimensioni di 75 cm di lunghezza per 46 cm di larghezza, in grado di alloggiare sino a dodici supporti per beute da 2 L, la piattaforma alloggiata in appositi binari può essere portata in agitazione a velocità costante dal motore brushless.



Figura 23: Piattaforma e supporti per beute;

2.5.2. Bioreattore

Il Bioreattore utilizzato all'interno dei laboratori biotecnologici della Biochemtex s.p.a. è un Univassel 2 L BIOSTAT della Sartorius, il cui schema è riportato nella pagina seguente.

Il bioreattore è formato da un recipiente di 3 L in vetro borosilicato doppio, dalla forma cilindrica smussata (T1) incamiciato (T2) e alla cui sommità è montato il supporto in acciaio (T3) per l'alloggiamento della testa del bioreattore (T4). Per garantire l'agitazione del mezzo di coltura al centro della testa del bioreattore viene montato un albero motore (T5), che permette all'asta della girante, inserita all'interno del recipiente, di ruotare attorno al proprio asse. A mettere effettivamente in moto il mezzo sono due dischi a sei lame (T6) posizionati rispettivamente a 6 cm e a 10 cm dal fondo interno del recipiente di vetro. Alla testa del bioreattore è collegato anche un condensatore (T7). Le dimensioni di questo bioreattore, compreso della testa, ma senza albero motore e condensatore, sono di una lunghezza ed una larghezza di 400 mm ed un'altezza di 480 mm, tali caratteristiche ed il materiale di cui sono composte le diverse sezioni del bioreattore, lo rendono "autoclavabile", ovvero la cui sterilizzazione può avvenire per mezzo di un'autoclave standard.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

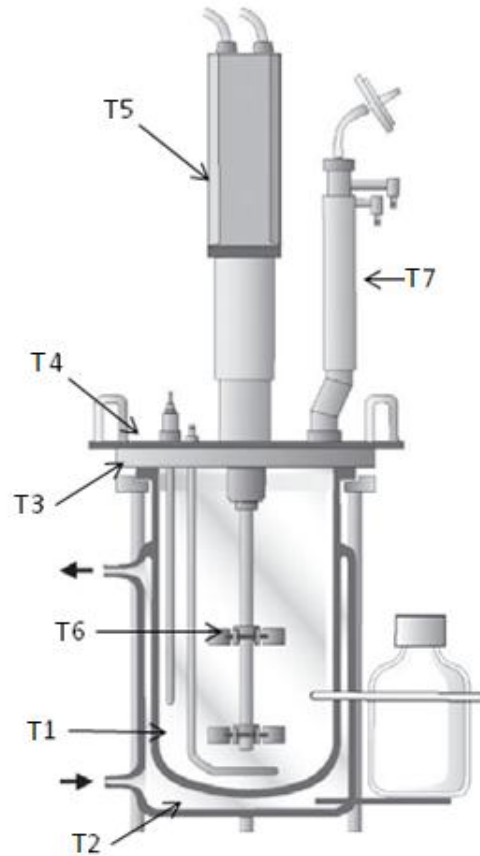
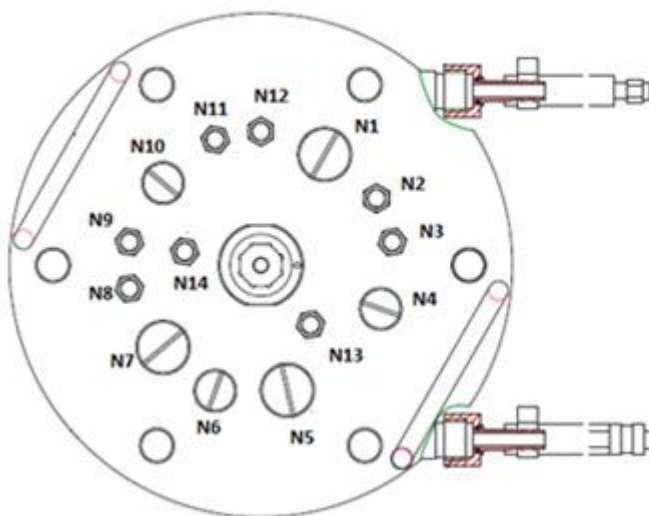


Figura 24: Schema del bioreattore utilizzato nelle sperimentazioni;

La testa del bioreattore presenta quattordici fori di dimensioni differenti, le cui disposizioni e funzioni sono riportate nella figura e nella tabella seguenti.



N1	Condensatore
N2	Sensore di temperatura
N3	Sensore Antischiuma
N4	Sensore pH
N5	Setto per "quattrovie"
N6	Non utilizzato
N7	Non utilizzato
N8	Insero per prelievo/scarico
N9	Non utilizzato
N10	Sensore pO ₂
N11	Non utilizzato
N12	Insero per armatura frangiflutti
N13	Insero per prelievo/scarico
N14	Insero per sparger

Figura 25: Schema della testa bioreattore e relativa legenda;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

I sensori montati sulla testa del bioreattore sono quattro:

- ✓ Sensore di temperatura (N2: Pt-100, type 200-4, for UniVessel 2 L, BIOSTAT Bplus, Insertion depth HE = 211 mm). Una termoresistenza Pt 100, un sensore di temperatura che sfrutta la variazione della resistività del platino (Pt), al variare della temperatura, per misurare indirettamente la temperatura del sistema;
- ✓ Sensore per il livello della schiuma (antischiama) (N3: Level probe for UniVessel 2 L, BIOSTAT Bplus, insertion height HE = max. 122 mm). Le sonde di antischiama sono degli elettrodi combinati che funzionano secondo il principio di conducibilità. Le parti in acciaio inox rivolte all'interno del recipiente di coltura funzionano come un elettrodo, quando schiuma o il liquido entrano in contatto con la sonda, provocano un salto di conducibilità. Questo salto di corrente nel segnale di misura attiva il controllore designato;
- ✓ Sensore per il pH (N4: pH Electrode EF-12/200 K8-HM UniVessel 2 L, for BIOSTAT Bplus; Electrode length 200 mm). Elettrodi combinati sterilizzabili a ponte di elettroliti vengono utilizzati per misurare il pH. I vantaggi di questi sensori gel-filled (Hamilton) derivano dalla pressurizzazione in fabbrica, che consentono di lavorare in pressione fino a 2,5 bar (max. pressione interna ammissibile per UniVessel è 1,3 bar) e quindi anche la sterilizzazione del sensore;
- ✓ Sensore per la pO_2 (N10: pO_2 Electrode 12/215-L-HM UniVessel 2 L, for BIOSTATR Bplus Polarographic electrode (Hamilton) Electrode length 215 mm). L'ossigeno disciolto è misurato come pressione parziale di ossigeno (pO_2) nel mezzo di coltura. Gli elettrodi pO_2 funzionano sul principio polarografico. Sono costituiti da un anodo in Ag e un catodo di Pt, separati da una membrana polimerica permeabile ai gas. Un elettrolita con spessore definito tra membrana e catodo, collega quest'ultimo all'anodo. Applicando una determinata tensione di polarizzazione, l'ossigeno, diffondendo attraverso la membrana, sarà ridotto completamente dal catodo, questa reazione chimica produce una corrente elettrica in mA-gamma, direttamente proporzionale alla pressione parziale di ossigeno.

Al bioreattore possono essere collegate diverse bottiglie in vetro borosilicato (B1), tramite tubi in marprene con un diametro interno di 1,4 mm (B6). Per permettere la sterilizzazione delle bottiglie e mantenerne il contenuto sterile durante la movimentazione, queste bottiglie sono dotate di un particolare tappo a vite forato (B4) in cui può essere inserito un setto dotato di due vie (B3). Una via permette lo sfiato della bottiglia verso l'esterno, tramite un tubo in silicone (diametro interno 3 mm) collegato ad un filtro per l'aria

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

in nylon da 0,2 μm (B5), mentre la seconda via permette il prelievo/scarico dalla bottiglia tramite un tubo in teflon posto nella parte interna della bottiglia (B7) ed un tubo in marprene posto nella parte esterna della bottiglia (B6).

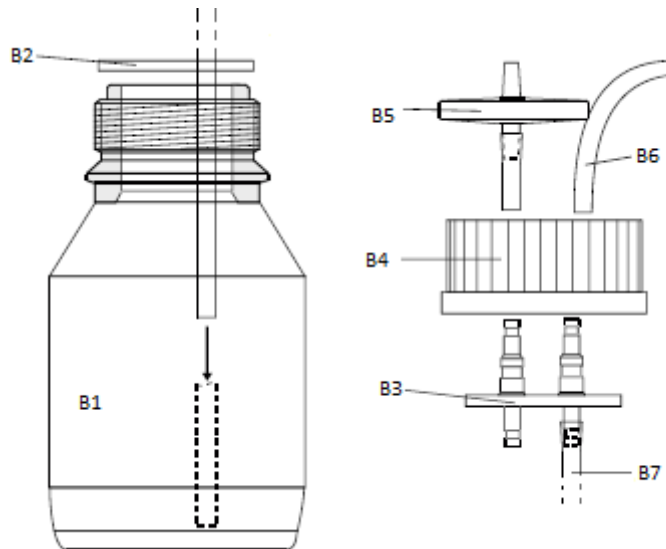


Figura 26: bottiglia per prelievo/scarico dal bioreattore;

Al bioreattore sono collegate cinque bottiglie di dimensioni differenti:

- ✓ Bottiglia in vetro da 2 L per “feed”: La bottiglia è collegata alla testa del bioreattore, ugello N8, da un tubo in marprene della lunghezza di 300 cm, passante attraverso una testa pompante monocanale a quattro rulli 114DV della Watson-Marlow serie 120 (17 in figura 34);
- ✓ Bottiglia in vetro da 500 mL per “base”: La bottiglia è collegata al setto 4 vie N5 presente sulla testa del bioreattore da un tubo in marprene della lunghezza di 180 cm, passante attraverso una testa pompante monocanale a due rulli Watson-Marlow serie 114 (12 in figura 34);
- ✓ Bottiglia in vetro da 500 mL per “Anti-foam”: La bottiglia è collegata al setto 4 vie N5 presente sulla testa del bioreattore da un tubo in marprene della lunghezza di 180 cm, passante attraverso una testa pompante monocanale a due rulli Watson-Marlow serie 114 (11 in figura 34);
- ✓ Bottiglia in vetro da 500 mL per “prelievo”: La bottiglia è collegata alla testa del bioreattore, ugello N13, da un tubo in marprene della lunghezza di 180 cm, passante attraverso una testa pompante monocanale a due rulli Watson-Marlow serie 114 (10 in figura 34). Tale bottiglia durante la prova

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

viene mantenuta in un bagno di ghiaccio, per abbassare rapidamente la temperatura del campione prelevato ed arrestare la crescita del microrganismo contenuto nel mezzo di coltura;

- ✓ Bottiglia in vetro da 1 L per “scarico”: La bottiglia è collegata al condensatore apposto sulla testa del bioreattore, ugello N1, da un tubo in silicone della lunghezza di 80 cm a cui, prima dell’ingresso nella bottiglia per lo scarico, è applicato un filtro per l’aria in nylon da 0,2 µm;

Per permettere l’ossigenazione del mezzo vengono utilizzati tre dispositivi. Il mezzo viene mantenuto in costante agitazione attraverso l’albero motore ed i dischi rotanti, in grado di sviluppare una velocità tra gli 150 e i 2000 rpm, così da permettere la diffusione efficace dell’ossigeno all’interno del mezzo di coltura, tale ossigenazione è favorita inoltre dalla presenza di un armatura con i frangiflutti (N12), che viene posizionata all’interno del reattore per aumentare la turbolenza del mezzo durante l’agitazione. Per insufflare all’interno del mezzo aria viene utilizzato un apposito sparger (N14), la cui forma anulare con microfori permette la diffusione efficace del gas quando si allinea la stessa ai dischi rotanti posti lungo l’albero motore.



Figura 27: Sparger anulare con microfori;

Nella figura seguente (figura 34) viene quindi riportata la schematizzazione dell’impianto esterno del bioreattore, in cui è possibile visualizzare le sue diverse componenti ed i controllori. Il controllo di tutte le portate del sistema e la misurazione di tutti i parametri è affidata al software Biostat Bplus, dal quale è possibile impostare i valori di setpoint di tutti i parametri del sistema.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

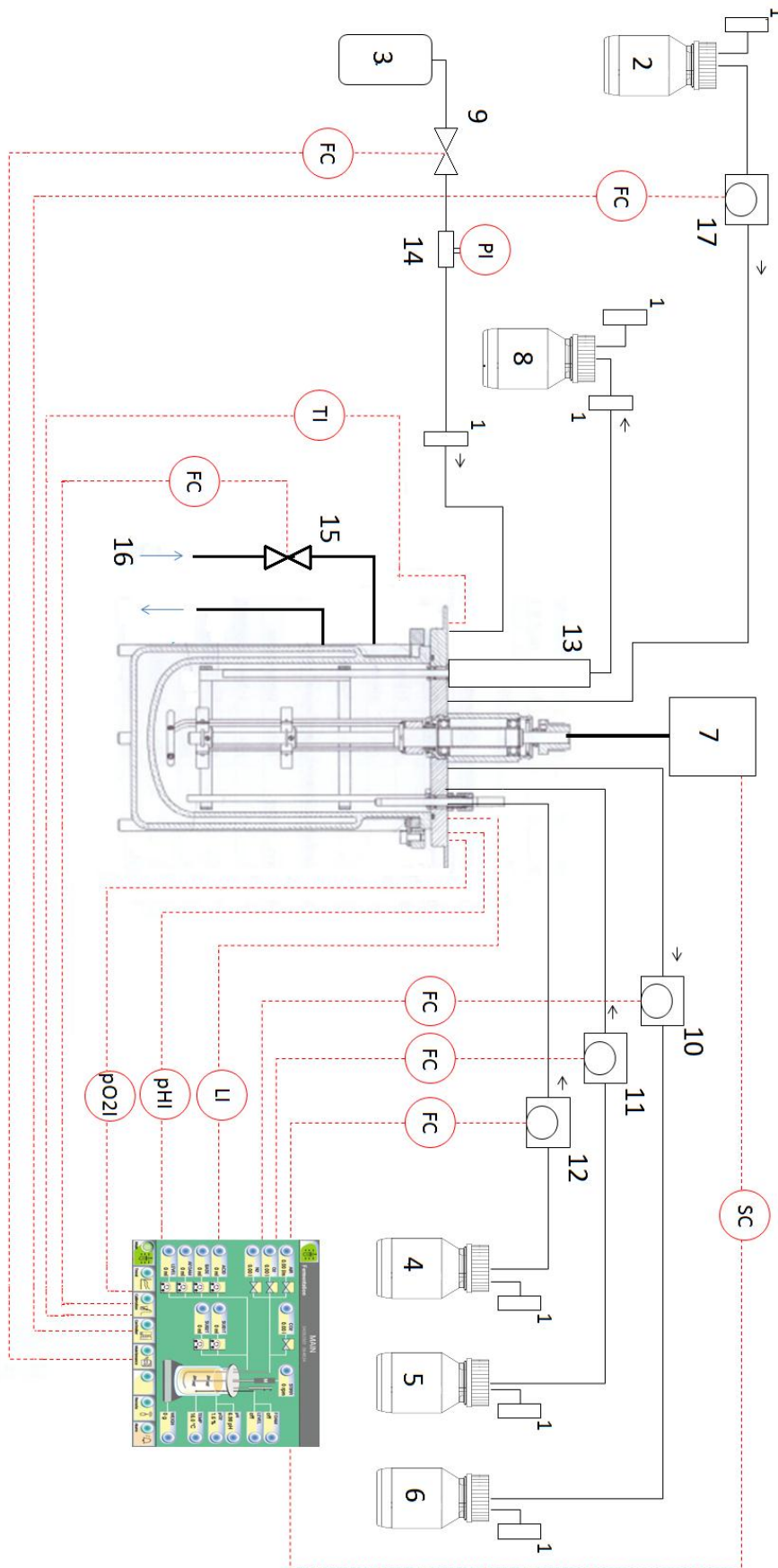


Figura 28: schematizzazione impiantistica esterna del bioreattore;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Controllo pH: il pH viene regolato tramite l'aggiunta di NH_4OH (28%)⁵⁸, esso viene quindi regolato solo quando si trova al di sotto del setpoint fissato per tale controllore (pHI). Il dosaggio della base è regolato dal controllore (FC) della pompa denominata "base" (12), che preleva dalla bottiglia della *base* (4);
- ✓ Controllo ossigeno disciolto: la quantità di ossigeno disciolto (%) viene controllata tramite la velocità di rotazione dell'albero motore (rpm). Qual'ora il valore di ossigeno disciolto misurato dalla sonda per la pO_2 si trovasse sotto il setpoint (pO_2I), l'aumento della velocità di agitazione del mezzo di coltura, ne aumenta la turbolenza e quindi l'efficienza di dissoluzione dell'ossigeno insufflato. La velocità di rotazione dell'albero motore (7) viene regolata dal controllore di velocità (SC);
- ✓ Controllo presenza di schiuma: l'eventuale presenza di schiuma viene controllata tramite il dosaggio di Antischiuma B⁵⁹, nel caso il volume del mezzo superasse quello imposto dalla posizione dell'indicatore di livello (LI). Il dosaggio dell'antischiuma è regolato dal controllore (FC) della pompa denominata "antischiuma" (11) che preleva l'antischiuma dalla bottiglia *antischiuma* (5);
- ✓ Controllo della temperatura: la temperatura del mezzo di reazione viene regolata tramite la temperatura dell'acqua all'interno della camicia del bio-reattore, che viene scaldata e raffreddata a seconda del valore impostato al misuratore della temperatura (TI). Il flusso di acqua all'interno della camicia viene regolato dalla valvola (15) sulla linea in ingresso alla camicia (16) e la sua temperatura regolata da un controllore di temperatura (TC);
- ✓ Flusso di aria: Il "gas flow" viene regolato dall'apposito controllore di flusso (FC) che regola l'apertura della valvola (9) sulla linea della bombola contenente la miscela di aria (3). La pressione della linea viene ulteriormente monitorata da un manometro (14)(PI), sulla linea è presente un filtro per l'aria in nylon da 0,2 μm (1). L'aria viene insufflata all'interno del bioreattore attraverso lo sparger;
- ✓ Scarico: Gli eventuali composti volatili che non vengono ricondensati dal condensatore (13), vengono inviati alla bottiglia di scarico (8). Sulla linea che collega il condensatore alla bottiglia di scarico è presente un filtro per l'aria in nylon da 0,2 μm (1);

⁵⁸ Soluzione di idrossido di ammonio, "ACS reagent, 28.0-30.0% NH_3 basis" (Sigma-Aldrich);

⁵⁹ Soluzione acquosa contenente il 10% (v/v) di un siliconico attivo concentrato, denominato Antischiuma A (Sigma-Aldrich);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Alimentazione: il dosaggio di zuccheri viene regolato tramite un controllore di flusso (FC) denominato SUBA, che regola la portata della pompa SUBA (17) che permette il prelievo della bottiglia denominata *feed* (2).
- ✓ Prelievo: durante il funzionamento del bioreattore, è possibile effettuare un prelievo in remoto, impostando il relativo controllore SUBB della pompa denominata SUBB (10), che permette di eseguire un prelievo dal mezzo di reazione in sterilità, scaricando il liquido nella bottiglia *prelievo* (6);

I valori dei parametri misurati all'interno del bioreattore, come i setpoint di tutte le variabili controllate dal sistema, vengono visualizzati ed impostati attraverso il software BIOSTAT Bplus, la cui schermata è riportata nella seguente figura.

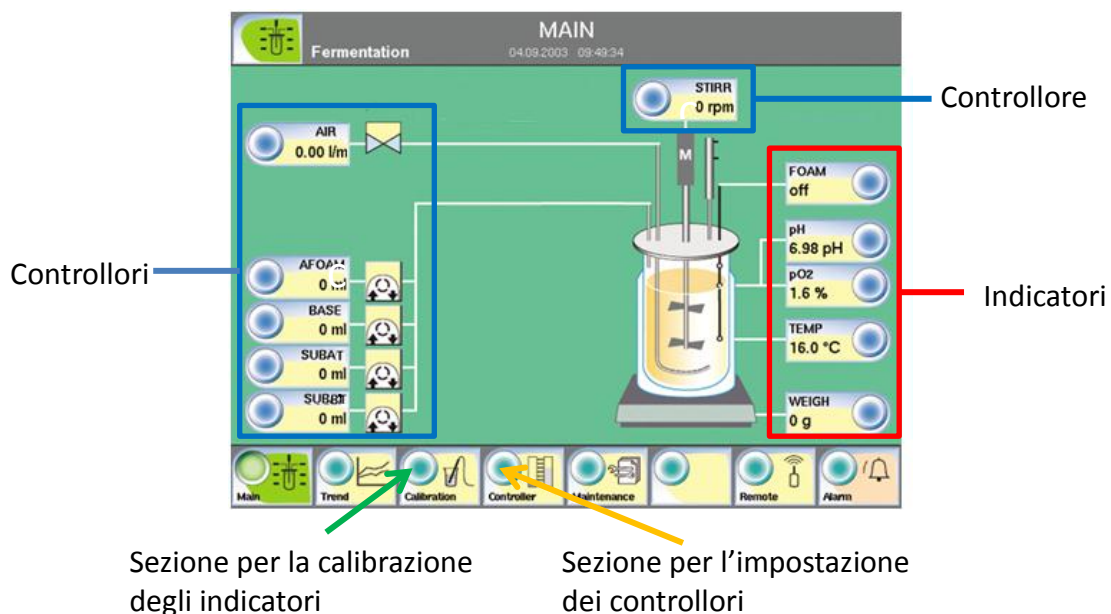


Figura 29: Schematizzazione del display dei controlli e degli indicatori del bioreattore;

Come è possibile notare dalla figura 29, sul display possono essere visualizzati i valori riportati dagli indicatori utilizzati all'interno del bioreattore (livello, pH, pO₂, temperatura e peso) e i valori impostati per i diversi controllori (SUBA e SUBB, Base, Antischiuma, Air e Stirring), nonché i valori cumulativi dei diversi controllori (SUBAT, SUBBT, BASE ed antischiuma). È possibile operare la calibrazione dei diversi indicatori attraverso l'apposita sezione "calibration" (freccia verde), mentre nella sezione "controller" (freccia arancione) è possibile impostare, oltre ai setpoint dei controllori, anche le variabili da cui essi possono

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

essere regolati (esempio: il dosaggio della base è regolato dal pH misurato, la velocità di agitazione invece dall'ossigeno disciolto nel mezzo).

2.6. Valutazione effetto delle specie inibenti la crescita batterica

Al termine del processo di pretrattamento ed idrolisi enzimatica, l'idrolizzato utilizzato per alimentare i microrganismi durante i processi di fermentazione in bioreattore, viene concentrato in una colonna di distillazione al fine di raggiungere una concentrazione finale di zuccheri totali di circa 500 g/L (generalmente vengono considerati solamente glucosio e xilosio).

La crescita del microrganismo viene condotta operando un meccanismo di tipo fed-batch, esso viene quindi inoculato in un terreno composto da un mezzo per coltura batterica al quale viene addizionato l'idrolizzato concentrato così da ottenere una concentrazione di zuccheri pari a 10 g/L in un piede di 800 ml. Per le prime ore dopo l'inoculo nel bioreattore quindi la crescita avviene senza l'addizione di ulteriori nutrienti (fase batch).

Durante il normale processo di crescita batterica il microrganismo *E.coli* MG1655 produce alcuni metaboliti secondari (es: acetato) che portano il mezzo di crescita ad una graduale acidificazione, tale abbassamento del pH però è controllato tramite l'addizione di una soluzione di idrossido d'ammonio (NH₄OH al 28%), che oltre a basificare il terreno per mantenere il pH ad un valore di setpoint di 6,9, addiziona al terreno di crescita azoto, un elemento essenziale per la crescita dei microrganismi.

All'esaurimento delle fonti di carbonio il pH del mezzo sale rapidamente sino a raggiungere valori superiori a 7,15, ciò è dovuto principalmente ad una produzione di ioni d'ammonio da parte della popolazione batterica⁶⁰. Tale innalzamento del pH è utilizzato come indice dell'esaurimento degli zuccheri all'interno della coltura di crescita e viene utilizzato quindi come segnale per determinare l'inizio del dosaggio di idrolizzato concentrato come ulteriore fonte di zuccheri (fase fed-batch).

⁶⁰ High cell-density culture of *Escherichia coli*; Sang Yup Lee (1996);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

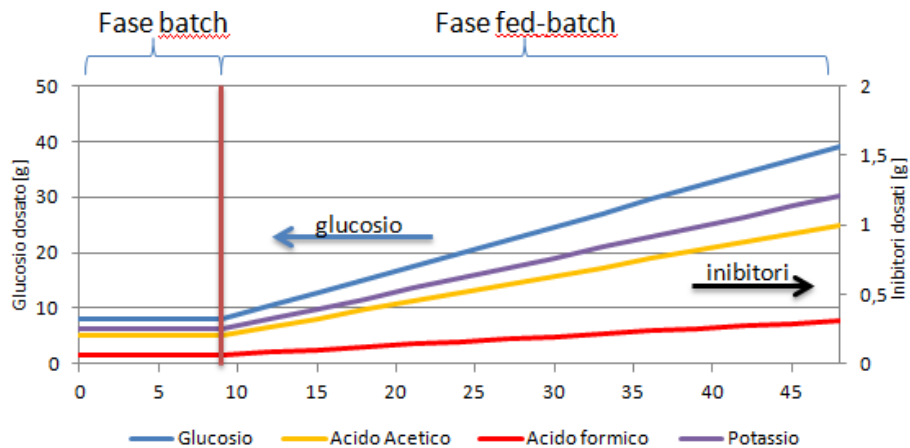


Figura 30: andamento qualitativo di glucosio ed inibitori durante la crescita in fermentatore;

Con il dosaggio dell'idrolizzato oltre a mantenere il terreno ricco dei nutrienti necessari per la crescita del microrganismo, vengono inevitabilmente dosati anche gli inibitori presenti all'interno dell'idrolizzato concentrato, aumentandone progressivamente la loro concentrazione.

Se tali inibitori quindi erano presenti in concentrazioni tollerabili nella fase batch, con il proseguire della fase fed-batch questi possono raggiungere concentrazioni non tollerabili dal microrganismo, pregiudicandone la crescita e diminuendo quindi le rese ottenibili dal processo di fermentazione, quale che sia il prodotto di interesse.

Al fine di comprendere quindi l'effetto inibente dei tre principali inibitori del processo di crescita del microrganismo contenuti all'interno dell'idrolizzato PROESA® (ione potassio, acido acetico ed acido formico), sono state elaborate una serie di prove in beuta, nelle quali si è cercato di riprodurre una iniziale fase di adattamento del microrganismo (fase batch) ed un successivo rapido aumento della concentrazione di inibitori all'interno del terreno di crescita, con l'aggiunta al mezzo di coltura di una soluzione sintetica di inibitori concentrati (seconda fase batch).

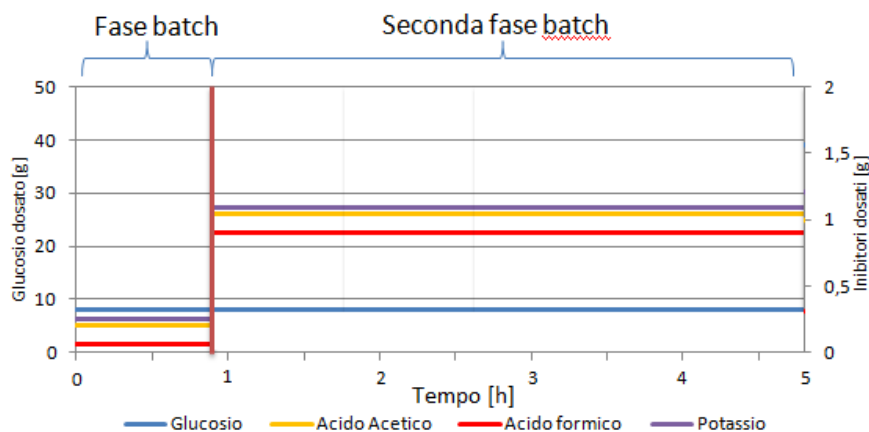


Figura 31: andamento qualitativo di glucosio ed inibitori durante la crescita in beuta;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

A tale scopo quindi sono state selezionate differenti concentrazioni “finali” per ogni inibitore (C_f), in ragione della concentrazione di questi tre componenti nell'idrolizzato concentrato (C_i), che verrebbe effettivamente riscontrata nelle fasi finali di un processo di crescita in bioreattore, utilizzando un idrolizzato concentrato a differenti gradi di purificazione (g_p). Considerando quindi un idrolizzato concentrato a 500 g/L di zuccheri totali, una concentrazione di zuccheri nella fase batch di 10 g/L per un piede con un volume complessivo di 0,8 L, e l'ulteriore dosaggio di 1 L di idrolizzato concentrato nella fase fed-batch, la concentrazione finale di ogni inibitore, in ragione del relativo grado di purificazione sarà:

$$C_f [g/L] = \frac{\left(\frac{10 [g/L] \times 0,8 [L]}{500 [g/L]} + 1 [L] \right) \times C_i [g/L] \times (1 - g_p)}{1,8 [L]}$$

	Acido Acetico [g/L]	Acido Formico [g/L]	Potassio [g/L]
Nessuna purificazione (-0%)	5,58	1,74	6,73
Purificazione lieve (-30%)	4,46	1,39	5,39
Purificazione media (-50%)	2,79	0,87	\
Purificazione elevata (-65%)	1,95	0,61	3,37
Purificazione spinta (-80%)	1,12	0,35	1,35

Tabella 13: Concentrazioni di acido acetico, acido formico e potassio a diversi gradi di purificazione;

Le combinazioni possibili dei tre inibitori alle concentrazioni selezionate, generano una matrice di 100 differenti prove, ciascuna delle quali sarebbe in grado di determinare non solo l'effetto della riduzione di un singolo componente inibente, ma anche l'effetto sinergico che tale componente mostra in presenza di concentrazioni differenti degli altri addizionati.

Nel seguente paragrafo verranno illustrate le procedure delle differenti prove in beuta che sono state condotte all'interno dei biolaboratori. Oltre alle procedure eseguite verranno illustrati anche i metodi di calcolo utilizzati per l'elaborazione dei dati sperimentali ottenuti da ogni prova.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Le prove in beuta si dividono in due fasi differenti:

- ✓ Espansione inoculo: Il microrganismo *E.coli*, conservato criogenizzato in cryovial, viene inoculato all'interno di una beuta contenente un terreno di coltura ricco denominato LB. L'espansione di tale inoculo procede per 17-18 ore all'interno di un incubatore agitato alla temperatura di 34°C;
- ✓ Crescita: Il microrganismo *E.coli*, propagato, viene inoculato all'interno del terreno di crescita M9YE al quale viene addizionato l'idrolizzato PROESA® in ragione della quantità di zuccheri finale;

2.6.1. Espansione inoculo

Il microrganismo *E.coli* MG1655 viene conservato all'interno di cryovial da 1,4 ml ciascuno. Tali colture criogenizzate sono mantenute in stato quiescente all'interno di un apposito frigo alla temperatura di -80°C, per permettere quindi la crescita del microrganismo è necessaria un'espansione dello stesso in un terreno di crescita ricco.

Il terreno di espansione è composto da un terreno commerciale definito ricco, denominato LB. 150 ml del terreno di crescita LB vengono versati all'interno di una beuta da 500 ml dotata di frangiflutti, alla cui sommità è posizionato un tappo di garza e cotone, avvolto da un doppio strato di alluminio. La beuta così preparata viene quindi sterilizzata attraverso il processo di autoclavazione (15 minuti a 120°C), in modo che l'ambiente di cultura sia perfettamente sterile.

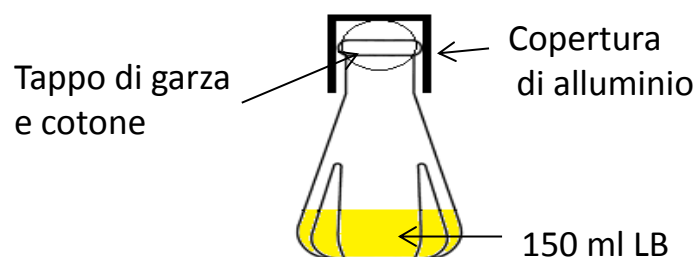


Figura 32: Schematizzazione beuta per espansione;

Una volta sterilizzata e raffreddata la beuta da 500 ml contenente il mezzo LB viene trasferita all'interno della cappa di sicurezza biologica, all'interno della quale è possibile effettuare l'inoculo, trasferendo, all'interno della beuta, 0,5 ml della popolazione batterica di *E.coli* MG 1655 conservata all'interno del cryovial. La beuta di espansione quindi, una volta richiusa con il tappo in garza e la copertura di alluminio, viene trasferita all'incubatore agitante.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

L'espansione del microrganismo procede all'interno dell'incubatore per 17 ore. La temperatura di incubazione per l'espansione del microrganismo è di 34°C.

2.6.2. Crescita

Il microrganismo propagatosi nella beuta di espansione è quindi pronto per essere inoculato all'interno di un nuovo terreno fresco. Questo viene preparato all'interno di una beuta da 500 mL dotata di frangiflutti, utilizzando un terreno di coltura minimale denominato M9 con l'aggiunta di estratto di lievito (20 ml M9YE 5x). Alla sommità della beuta viene posizionato un tappo di garza e cotone, avvolto da un doppio strato di alluminio. La beuta così preparata viene quindi sterilizzata attraverso il processo di autoclavazione (15 minuti a 120°C), in modo che l'ambiente di cultura sia perfettamente sterile.

La fonte di zuccheri necessaria per la crescita microbica proviene dall'idrolizzato PROESA®, che non potendo essere sterilizzato attraverso il processo di autoclavazione, viene filtrato con un filtro per la sterilizzazione (0,2 µm). All'interno della cappa di sicurezza biologica, al terreno di crescita contenuto nella beuta da 500 mL viene quindi aggiunto l'idrolizzato PROESA® sterilizzato, in ragione di una concentrazione finale di glucosio pari a 20 g/L (circa 28 ml di idrolizzato PROESA®), quindi il volume di coltura viene portato a 100 ml tramite l'aggiunta di acqua demineralizzata sterilizzata (circa 52 mL).

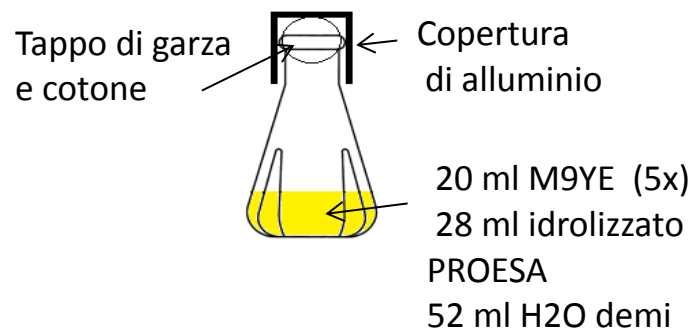


Figura 33: Schematizzazione beuta per crescita;

Una volta preparato il terreno, si verifica la misura dell' OD_{600} della beuta di espansione utilizzando lo spettrofotometro. Al terreno di crescita viene quindi aggiunta una quantità di terreno espanso [$V_{inoculo}$] pari al rapporto tra l' OD_{600} della beuta di espansione e quello desiderato per il terreno di crescita ($OD_{crescita} = 0,1$), moltiplicato per il volume contenuto all'interno della beuta di crescita [$V_{crescita}$]:

$$V_{inoculo} [ml] = \frac{OD_{crescita}}{OD_{espansione}} V_{crescita} [ml]$$

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

La beuta di crescita viene quindi inoculata con l'opportuna quantità di terreno espanso sotto la cappa di sicurezza biologica, quindi una volta richiusa con il tappo in garza e la copertura di alluminio, viene trasferita all'incubatore agitante. La temperatura di incubazione per la crescita del microrganismo è di 37°C. L'OD₆₀₀ delle beute di crescita viene misurato utilizzando lo spettrofotometro, quando quindi questo raggiunge un valore compreso tra 1-1,5, alle beute vengono aggiunti 12 mL di una soluzione contenente acido acetico, acido formico e potassio, aumentando considerevolmente la concentrazione degli inibitori all'interno del mezzo di crescita. L'OD₆₀₀ della beuta di crescita viene quindi misurato ripetutamente con lo spettrofotometro a distanza di 1 o 2 ore, così da monitorare la crescita del microrganismo dopo l'aggiunta degli inibitori sintetici attraverso la misura della densità ottica.

2.6.3. Elaborazione dei dati

In seguito all'aggiunta della soluzione sintetica di inibitori, la curva di crescita della popolazione batterica subisce una variazione proporzionale all'inibizione indotta dai componenti aggiunti. Se la concentrazione finale di inibitori all'interno del terreno di coltura supera la tolleranza del microrganismo infatti, l'andamento della curva di crescita a seguito dell'aggiunta di inibitori mostrerà una flessione.

L'inibizione dovuta all'aggiunta di tali composti può manifestarsi principalmente in tre modi:

- ✓ Tempo di adattamento: la curva di crescita, a seguito dell'aggiunta degli inibitori sintetici, mostra un andamento stazionario, quindi al termine di questa seconda fase di latenza la crescita riprende con una velocità (μ), paragonabile a quella che la popolazione batterica avrebbe senza l'aggiunta degli inibitori (crescita standard);

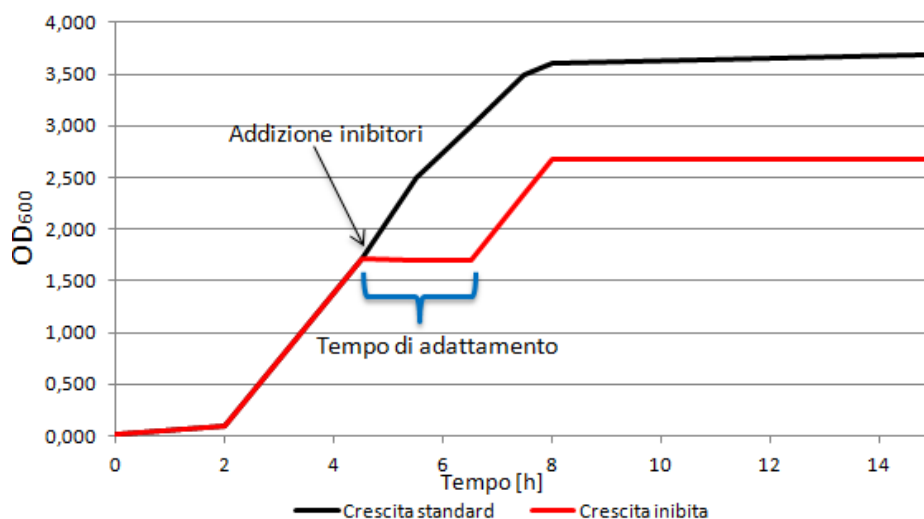


Figura 34: Andamento qualitativo di una crescita standard (nero) e di una crescita inibita (rosso) che presenta un "tempo di adattamento";

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Velocità di crescita ridotta: la curva di crescita, a seguito dell'aggiunta degli inibitori sintetici, mostra una velocità di crescita (μ) inferiore a quella che la popolazione batterica avrebbe senza l'aggiunta di inibitori;

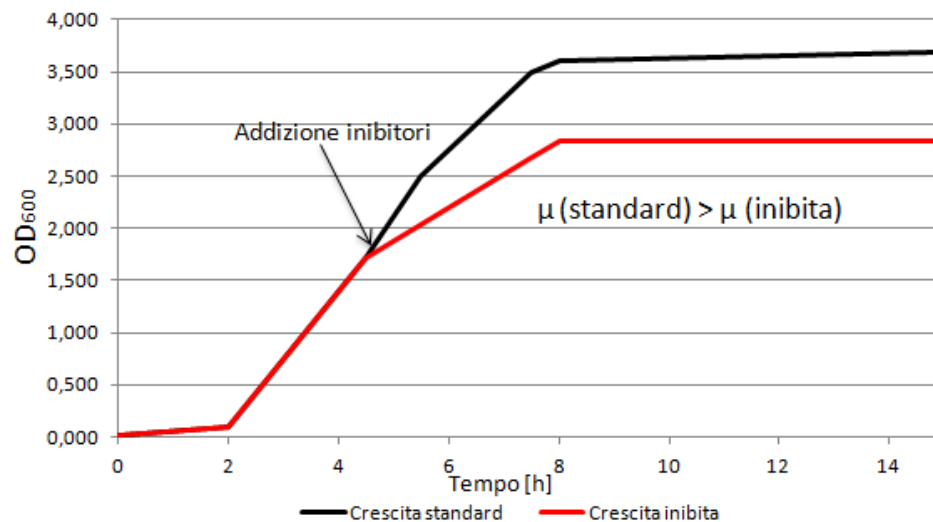


Figura 35: Andamento qualitativo di una crescita standard (nero) e di una crescita inibita (rosso) che presenta una "velocità di crescita ridotta";

- ✓ Arresto della crescita: la curva di crescita a seguito dell'aggiunta degli inibitori sintetici mostra un andamento a stazionario sino al termine della prova;

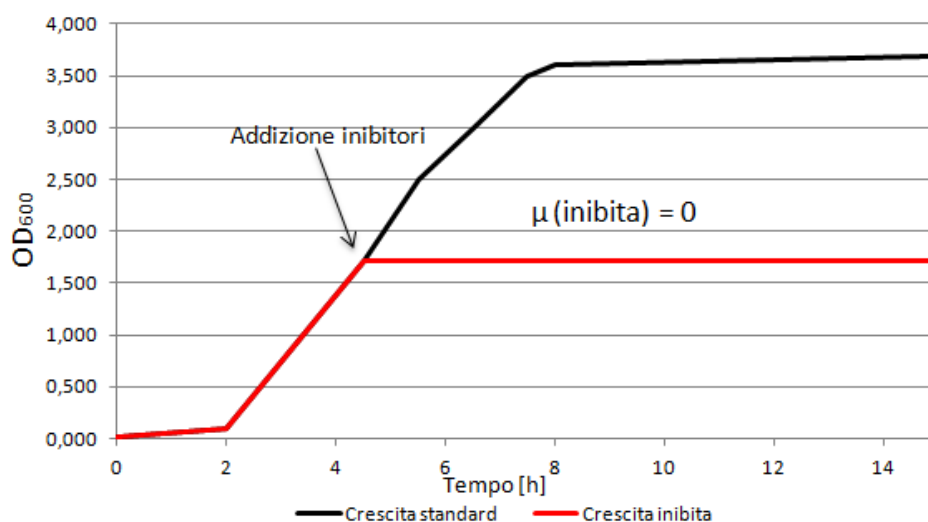


Figura 36: Andamento qualitativo di una crescita standard (nero) e di una crescita inibita (rosso) che presenta un "arresto della crescita";

Ai fini della produzione tramite fermentazione in bioreattore, le differenti tipologie di inibizione non comportano sostanziali differenze, ciò che infatti influenza maggiormente la produzione è la riduzione della

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

resa cellulare complessiva, ovvero la diminuzione della popolazione batterica finale al termine della fase esponenziale di crescita. È possibile quindi generalizzare tale fattore di inibizione considerando la differenza dell'area sottesa dalla curva di crescita inibita con quella sottesa dalla curva di arresto della crescita, facilmente calcolabile per qualunque popolazione batterica. Tale metodologia permette di paragonare curve di crescita di prove effettuate nelle medesime condizioni macroscopiche (temperatura, volume di reazione, microrganismo utilizzato), ma che possiedono differenze microscopiche, come ad esempio il cryovial utilizzato per l'espansione in beuta, le condizioni di lavaggio delle beute utilizzate per la prova di crescita o le tempistiche di campionamento delle differenti prove, condizioni che non sarebbe possibile riprodurre in maniera perfetta in prove eseguite in tempi differenti.

Il "grado di inibizione" ottenuto tramite l'aggiunta della soluzione di inibitori sintetici quindi sarà inversamente proporzionale all'area compresa tra la curva reale di crescita inibita e la corrispondente crescita arrestata.

Sottraendo quindi l'area sottesa dalla curva reale di crescita inibita, all'area sottesa dalla curva di arresto di crescita, si può ottenere un valore che descrive efficacemente il grado di inibizione dovuto all'aggiunta della soluzione di inibitori, maggiore sarà il valore di tale area, minore sarà il grado di inibizione dovuto a tale concentrazione dei tre composti presi in considerazione.

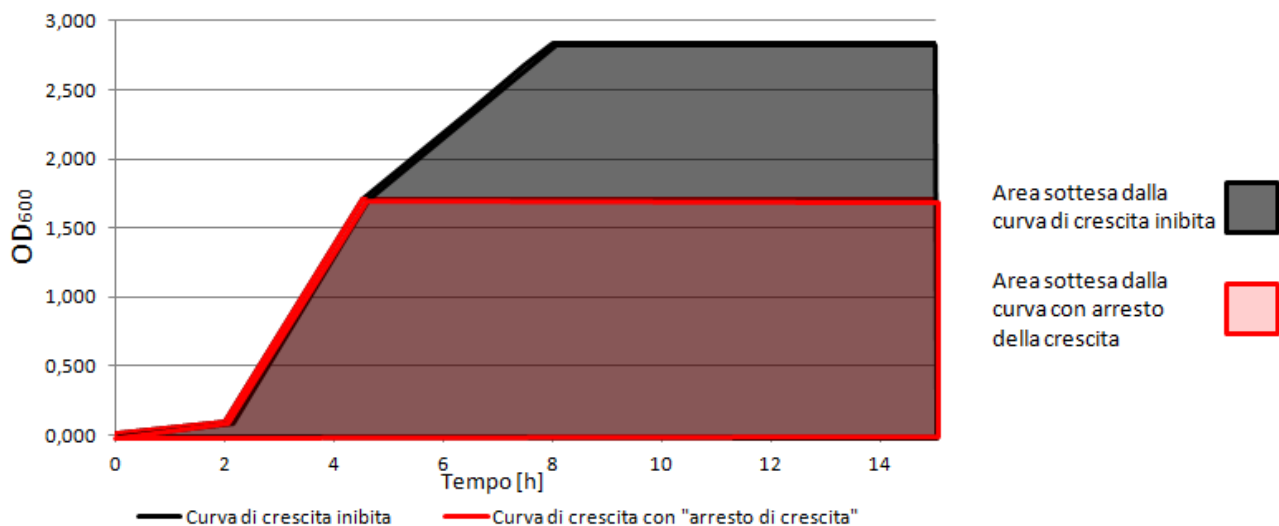


Figura 37: rappresentazione delle aree sottese dalla curva di crescita inibita e dalla curva con arresto della crescita;

Il valore di tale area può variare quindi tra 0, ovvero una curva di inibizione che corrisponde ad un arresto della crescita, a valori sempre maggiori a seconda del grado di inibizione dovuto alla concentrazione di

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

composti che si è voluto testare durante la prova in beuta. Eseguendo differenti prove è stato possibile comprendere gli intervalli di variabilità di tale area, attribuendo ad ogni intervallo di valori un corrispondente grado di inibizione, così da poter ottenere dei dati qualitativi dell'effetto della variazione di concentrazione di un singolo componente e dell'effetto sinergico dato da tale componente rispetto ad una concentrazione maggiore degli altri due.

È stata stabilita quindi una corrispondenza tra alcuni intervalli e il corrispondente "grado di inibizione", assegnando ad ogni grado di inibizione un valore cromatico:

Grado di inibizione	Valore numerico	Valore cromatico
lieve inibizione	> 20	Verde
inibizione moderata	8 - 20	Giallo
inibizione elevata	2 - 8	Arancione
inibizione non accettabile	< 2	Rosso

Tabella 14: gradi di inibizione e corrispondenti valori numerici e cromatici;

Per ogni prova eseguita quindi è stato possibile calcolare, attraverso la misura della densità ottica allo spettrofotometro, la differenza tra l'area sottesa dalla curva di crescita e la corrispondente area sottesa dalla curva con arresto della crescita, ottenendo così un valore numerico al quale è stato possibile assegnare un grado di inibizione ed un valore cromatico.

2.7. Prove in bio-reattore

Sebbene le prove in beuta possano dare un'indicazione degli effetti di un eventuale processo di purificazione sull'idrolizzato, per comprendere i reali benefici di un tale processo, una volta individuato, è necessario testare un idrolizzato purificato PROESA® in scala di laboratorio, attraverso una prova di crescita in bioreattore.

La crescita in bioreattore sfrutta un sistema di tipo fed-batch, durante il quale grazie ai sistemi di controllo e di misurazione del bioreattore presentati in questo capitolo (2.5.3.) vengono mantenute le seguenti condizioni di crescita:

- ✓ Temperatura: attraverso il controllo della temperatura dell'acqua di servizio inviata alla camicia di raffreddamento del bioreattore, la temperatura del sistema viene mantenuta a 34°C. Tale parametro è misurato dalla termoresistenza;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Ossigenazione: attraverso il controllo della velocità di agitazione ed un flusso di aria costante (1 L/min), la percentuale di ossigeno disciolto all'interno del mezzo di coltura viene mantenuta al 30%. Tale parametro è misurato dalla sonda per la pO_2 ;
- ✓ pH: attraverso il controllo della portata di NH_4OH , il valore del pH del mezzo di coltura viene mantenuto a 6,9. Tale parametro è misurato dalla sonda del pH. Non viene effettuato un controllo del pH tramite un acido perché durante la crescita di *E.coli* MG 1655 il mezzo tende unicamente ad acidificarsi, inoltre l'innalzamento del pH è utilizzato come indice dell'esaurimento delle fonti di carbonio primarie (glucosio o xilosio) contenute nel mezzo di crescita, per cui la presenza di un controllore acido impedirebbe la visione di tale picco di pH;
- ✓ Presenza di schiuma: l'eventuale eccesso di schiuma all'interno del volume del bioreattore viene eliminato attraverso il dosaggio di antischiuma tipo B. Il livello di schiuma viene monitorato dalla sonda antischiuma;

Come accennato, l'esaurirsi della fonte principale di carbonio (glucosio o xilosio) porta ad una rapida basificazione del mezzo di crescita batterica, l'aumento del pH oltre il valore di 7,15 è utilizzato quindi come indicatore dell'esaurimento dello zucchero presente nel piede di crescita e determina il passaggio tra una fase batch e la fase successiva. Ogni processo di fermentazione in bioreattore infatti è diviso in quattro differenti fasi:

- ✓ Prima fase batch: Nella prima fase di crescita della popolazione batterica il volume di reazione viene mantenuto costante. Il piede iniziale è costituito da un terreno contenente i nutrienti necessari alla crescita del microrganismo per tutta la durata della prova (FERM-M) ed una quantità di idrolizzato sufficiente a garantire una concentrazione totale di zuccheri iniziale di 15 g/L. In questa prima fase, all'interno del bioreattore è alimentata unicamente la corrente d'aria che permette il mantenimento della percentuale di ossigeno disciolto nel mezzo desiderata.
- ✓ Fase di alimentazione esponenziale: All'innalzamento del pH oltre la soglia di 7,15 inizia la seconda fase di crescita. L'idrolizzato concentrato utilizzato come fonte di zuccheri viene dosato seguendo un andamento esponenziale, per garantire alla popolazione batterica la corretta dose di zuccheri.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

La fase esponenziale di alimentazione ha una durata fissa di 3 ore. Il calcolo della portata di idrolizzato concentrato nel tempo segue la seguente legge di distribuzione esponenziale⁶¹:

$$F \left[\frac{L}{h} \right] = \left(\frac{\mu S_0 V_0}{S_{feed}} \right) \times e^{(\mu t)}$$

Dove:

- μ è la velocità di crescita in fase esponenziale del microrganismo MG 1655, calcolata tramite precedenti esperimenti e fissata a $0,5 \text{ h}^{-1}$;
- S_0 è la concentrazione di zuccheri iniziale (g/L) utilizzata durante la prima fase batch, 15 g/L;
- V_0 è il volume contenuto all'interno del bioreattore al termine della prima fase batch, 0,8 L;
- S_{feed} è la concentrazione di zuccheri (g/L) all'interno dell'idrolizzato concentrato utilizzato come fonte di zuccheri per le fasi fed-batch di crescita;
- t è il tempo (h) intercorso dall'inizio della fase di alimentazione esponenziale;

Anche durante la fase di alimentazione esponenziale il flusso di aria insufflata all'interno del bioreattore viene mantenuto costante, per garantire l'ossigenazione del mezzo di crescita.

- ✓ Seconda fase batch: al termine della fase di alimentazione esponenziale, viene interrotta l'alimentazione di zuccheri al bioreattore e mantenendo il volume costante si permette alla popolazione batterica di esaurire gli zuccheri dosati durante la fase precedente. Questa seconda fase batch permette una prima valutazione della crescita batterica nelle fasi precedenti, in base al tempo necessario alla popolazione microbica per esaurire le fonti di zucchero dosate. Anche durante la seconda fase batch il flusso di aria insufflata all'interno del bioreattore viene mantenuto costante, per garantire l'ossigenazione del mezzo di crescita.
- ✓ Fase di alimentazione costante: All'innalzamento del pH oltre la soglia di 7,15 inizia la quarta fase di crescita. L'idrolizzato concentrato utilizzato come fonte di zuccheri viene dosato con una portata costante, per garantire alla popolazione batterica la corretta dose di zuccheri. La fase di alimentazione costante ha una durata variabile a seconda del tempo di prova totale. Il calcolo della portata di idrolizzato concentrato nel tempo segue la seguente legge di distribuzione lineare⁶²:

⁶¹ High cell-density culture of Escherichia coli; Sang Yup Lee (1996);

⁶² High cell-density culture of Escherichia coli; Sang Yup Lee (1996);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

$$F \left[\frac{L}{h} \right] = \frac{S_c V_0}{S_{feed}}$$

Dove:

- S_c è la concentrazione di zuccheri desiderata durante la fase di alimentazione costante, 15 g/L;
- V_0 è il volume contenuto all'interno del bioreattore al termine della prima fase batch, 0,8 L;
- S_{feed} è la concentrazione di zuccheri (g/L) all'interno dell'idrolizzato concentrato utilizzato come fonte di zuccheri per le fasi fed-batch di crescita;

Anche durante la fase di alimentazione costante il flusso di aria insufflata all'interno del bioreattore viene mantenuto costante, per garantire l'ossigenazione del mezzo di crescita.

La corretta alternanza tra le fasi di crescita, nonché il controllo dei parametri misurati all'interno del bioreattore e la gestione dei controllori è effettuata da un software BIOPAT MFCS/WIN 3.0, appositamente programmato per i bioreattori BIOSTAT utilizzati all'interno dei laboratori della Biochemtex.

Le prove in bioreattore si dividono in tre fasi differenti:

- ✓ Preparativa: la prima fase di una prova in bioreattore si divide ulteriormente in due parti, l'espansione del microrganismo criogenizzato e il montaggio del bioreattore. Il microrganismo *E.coli*, conservato criogenizzato in cryovial, viene inoculato all'interno di una beuta contenente un terreno di tipo M9YE e glucosio sintetico, l'espansione di tale inoculo procede per 5 ore all'interno di un incubatore agitato alla temperatura di 34°C. Il montaggio del bioreattore e la sua sterilizzazione avvengono in questo stesso lasso di tempo;
- ✓ Crescita: Il microrganismo *E.coli*, propagato, viene inoculato all'interno del terreno di crescita FERM-M al quale è stato addizionato l'idrolizzato PROESA® in ragione della quantità di zuccheri desiderata nella prima fase batch ed il programma per il controllo delle fasi successive viene avviato;
- ✓ Elaborazione dati: al termine della prova i dati sperimentali raccolti vengono elaborati attraverso un foglio excel appositamente costruito;

2.7.1. Preparativa

Il microrganismo *E.coli* MG1655 viene conservato all'interno di cryovial da 1,4 ml ciascuno. Tali colture criogenizzate sono mantenute in stato quiescente all'interno di un apposito frigo alla temperatura di -80°C,

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

per permettere quindi la crescita del microrganismo è necessaria un'espansione dello stesso in un terreno di crescita ricco.

Il terreno di espansione è composto da un terreno composito M9YE, questo viene preparato all'interno di una beuta da 250 ml dotata di frangiflutti (10 ml M9YE 5x). Alla sommità della beuta viene posizionato un tappo di garza e cotone, avvolto da un doppio strato di alluminio. La beuta così preparata viene quindi sterilizzata attraverso il processo di autoclavazione (15 minuti a 120°C), in modo che l'ambiente di cultura sia perfettamente sterile. La fonte di zuccheri per la prova di espansione è una soluzione di glucosio sintetico al 50% (500 g/L), che, non potendo essere sterilizzato attraverso il processo di autoclavazione, deve essere precedentemente filtrato con un filtro per la sterilizzazione (0,2 µm).

Una volta sterilizzata e raffreddata la beuta viene nuovamente trasferita sotto la cappa biologica dove viene aggiunto 1 ml di soluzione di glucosio sintetico al 50% (500 g/L), quindi il volume di coltura viene portato a 50 ml tramite l'aggiunta di acqua demineralizzata sterilizzata (circa 39 ml).

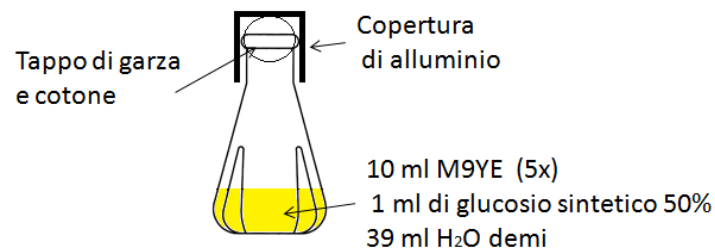


Figura 38: Schematizzazione beuta per espansione;

All'interno della cappa di sicurezza biologica si procede quindi all'inoculo, trasferendo, all'interno della beuta da 250 ml, 1,4 ml della popolazione batterica di *E.coli* MG 1655 conservata all'interno del cryovial. La beuta quindi viene richiusa con il tappo in garza e la copertura di alluminio e trasferita all'incubatore agitante.

La temperatura di incubazione per l'espansione del microrganismo è di 34°C. L'espansione quindi procede all'interno dell'incubatore per 5 ore (la procedura generalmente viene effettuata alle 9 del mattino, così da avere la coltura espansa pronta per l'inoculo alle 15), ovvero il tempo necessario stimato per il raggiungimento di un OD tra 1,8 e 2,2, al quale è stata calcolata corrispondere la massima velocità di crescita batterica.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Terminata la preparazione della beuta dell'espansione dell'inoculo per la prova in bioreattore, si procede alla preparazione del bioreattore stesso. Come accennato nel paragrafo dedicato (2.5.3.) un bioreattore è composto da differenti componenti, che devono essere montate separatamente, autoclavate e quindi collegate tra loro sotto la cappa di sicurezza biologica.

- ✓ Preparazione bioreattore: La testa del bioreattore viene montata così che siano presenti tutti i sistemi di misurazione, i canali di alimentazione e le strumentazioni presentate nella figura 31. Prima di montare la sonda del pH è necessario procedere alla sua calibrazione⁶³. Il terreno di coltura FERM-M viene preparato in ragione di un volume tale che, a seguito dell'addizione dell'idrolizzato come fonte di zuccheri, il piede all'interno del bioreattore abbia un volume di 800 ml e le concentrazioni richieste dei vari componenti. La testa del bioreattore viene quindi posizionata sopra il reattore di vetro borosilicato e ancorata all'apposito supporto, così che l'interno del bioreattore sia sigillato. Al condotto di alimentazione dell'idrolizzato concentrato ed al condotto di prelievo, vengono collegati tubi in silicone di 4 cm, al termine di quale viene apposta un morsetto metallico per sigillare i tubi; all'uscita del condensatore ed al condotto di alimentazione dell'aria (sparger) viene collegato un tubo in silicone dotato di filtro per l'aria in nylon (0,2 µm); Le quattro uscite del setto "quattro vie" vengono sigillate con tubi di silicone di 4 cm dotati di morsetti di metallo;
- ✓ Preparazione bottiglie ausiliarie: le bottiglie di *base*, *antischiuma*, *prelievo*, *feed* e *scarico* vengono montate così come presentato nel paragrafo 2.5.3, all'interno delle bottiglie in vetro borosilicato, ad eccezione di quella per l'*antischiuma*, vengono versati 50 ml di acqua demineralizzata, mentre all'interno della bottiglia dell'*antischiuma*, vengono caricati 200 ml di antischiuma B. Ai tubi in marprene collegati ai setti doppi delle bottiglie in vetro borosilicato viene sigillata l'uscita con un morsetto metallico;

Il materiale così preparato viene quindi sterilizzato per mezzo di autoclavazione (15 minuti a 121°C), il processo richiede circa 2 ore e mezzo al termine delle quali i vari componenti del bioreattore vengono messi sotto la cappa di sicurezza biologica per raffreddare ad aria e nel contempo ridurre al minimo i rischi di contaminazione batterica. L'interno del bioreattore, come di tutte le bottiglie ausiliarie, grazie ai filtri per l'aria ed i morsetti metallici sono perfettamente sigillate e ciò garantisce di mantenere la sterilità ottenuta con l'autoclavazione anche durante il trasporto della macchina all'interno del laboratorio.

⁶³ La calibrazione prevede due condizioni, utilizzando una soluzione buffer acida (4,00) viene calibrato il punto corrispondente a pH 4, mentre utilizzando una soluzione buffer basica (7,00) viene calibrato il punto corrispondente a pH 7;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Una volta che le componenti del bioreattore si sono raffreddate (tempo necessario: 1 ora circa), è possibile effettuare i collegamenti tra la testa del bioreattore e le bottiglie ausiliarie. Tale operazione consiste nel rimuovere i tubi di silicone presenti sui condotti di alimentazione e prelievo e quelli apposti per sigillare due delle vie del setto “quattrovie”. Al condotto di alimentazione viene quindi collegata la bottiglia *feed*, al condotto di prelievo la bottiglia *prelievo*, mentre alle due vie del setto quattro vie le bottiglie di *antischiuma* e *base*. La bottiglia *scarico* viene quindi collegata all’uscita del condensatore. Per ridurre al minimo i rischi di contaminazione è opportuno che l’operatore utilizzi dell’alcool etilico per sterilizzare la superficie dei guanti in lattice che utilizzerà per tali operazioni di collegamento.

Una volta collegate tutte le bottiglie ausiliarie alla testa del bioreattore è possibile caricare 300 ml di una soluzione di idrossido di ammonio (NH₄OH 28%) all’interno della bottiglia *base*, tale soluzione trovandosi a pH 11,6 è considerata sterile, poiché non potrebbe avvenire alcuna contaminazione in un ambiente con pH maggiore di 11,5.⁶⁴ L’idrolizzato concentrato (non sterilizzato), viene invece caricato nella bottiglia *feed* in ragione di un volume compreso tra 1 L e 1,5 L, tale liquido non ha subito alcun processo di sterilizzazione, ne per via termica ne per via meccanica, tuttavia se ritenuto non contaminato, le operazioni eseguite prima del riempimento della bottiglia *feed* e l’elevata concentrazione zuccherina (circa 500 g/L) consentono di abbassare notevolmente il rischio di contaminazione esterna di tale liquido.

Una parte dell’idrolizzato concentrato viene diluito in ragione di un rapporto di diluizione 1:2, quindi filtrata tramite un filtro di sterilizzazione (nylon o PES) da 0,2 µm, così da operare una sterilizzazione meccanica. Un volume V_i dell’ idrolizzato sterilizzato, a concentrazione di zuccheri Z_b , viene quindi addizionato al terreno contenuto nel bioreattore, così che la concentrazione finale di zuccheri desiderata nel piede di crescita sia di 15 g/L per un volume totale di 800 ml.

$$V_i[L] = \frac{15 \left[\frac{g}{L} \right] \times 0,8 [L]}{Z_b \left[\frac{g}{L} \right]}$$

Una volta eseguite tali operazioni è possibile trasferire il bioreattore e le bottiglie ausiliarie all’esterno della cappa di sicurezza biologica, così da poter collegare i misuratori all’apposita colonna di controllo e impostare ai controllori le condizioni richieste.

Una volta avviata l’agitazione del mezzo, impostando inizialmente un setpoint per l’agitazione di circa 300 rpm, è possibile avviare la procedura di calibrazione della sonda della pO₂⁶⁵, in seguito a tale calibrazione sarà possibile impostare il controllore della percentuale di ossigeno disciolto nel mezzo.

⁶⁴ Microbiologia Industriale, la crescita batterica, C. Cristiani, A. Giarrusso (2012);

⁶⁵ La calibrazione prevede due passaggi, prima attraverso un flusso di solo azoto viene calibrato il punto zero, corrispondente ad una pO₂ dello 0%, quindi con un flusso d’aria viene calibrato il punto cento, corrispondente ad una pO₂ dello 100%;

2.7.2. Crescita

Il bioreattore viene quindi mantenuto sotto agitazione. A seguito della calibrazione della sonda della pO_2 la percentuale di ossigeno presente all'interno del mezzo corrisponde al 100%, in assenza di microrganismi e con un flusso di aria costante quindi tale valore verrà mantenuto stazionario. Una volta effettuato l'inoculo, il rapido abbassamento della quantità di ossigeno disciolto nel mezzo sarà utilizzato come indicatore dell'inizio del processo di crescita microbica.

Una volta che la coltura contenuta all'interno della beuta di espansione avrà raggiunto il valore di OD_{600} desiderato (1,8-2,2), si potrà procedere all'inoculo. 20 ml della coltura espansa verranno addizionati al terreno di crescita all'interno del bioreattore. Tale processo non può essere condotto sotto la cappa di sicurezza biologica, poiché è necessario controllare i parametri del bioreattore e mantenere quest'ultimo sotto costante agitazione, il trasferimento della coltura espansa all'interno del bioreattore dovrà quindi essere eseguito utilizzando una pipetta sterilizzata ed adottando tutte le precauzioni necessarie per ridurre al minimo le possibilità di contaminazione della coltura all'interno del bioreattore.

Una volta inoculato il microrganismo *E.coli* MG1655 all'interno del bioreattore è possibile avviare il programma BIOPAT MFCS/WIN 3.0 per il controllo dei parametri del sistema e della procedura di crescita della popolazione batterica.

Osservando un grafico esemplificativo di alcuni dei parametri monitorati durante la prova è possibile identificare i segnali che condizionano l'andamento e le fasi del processo di crescita batterica.

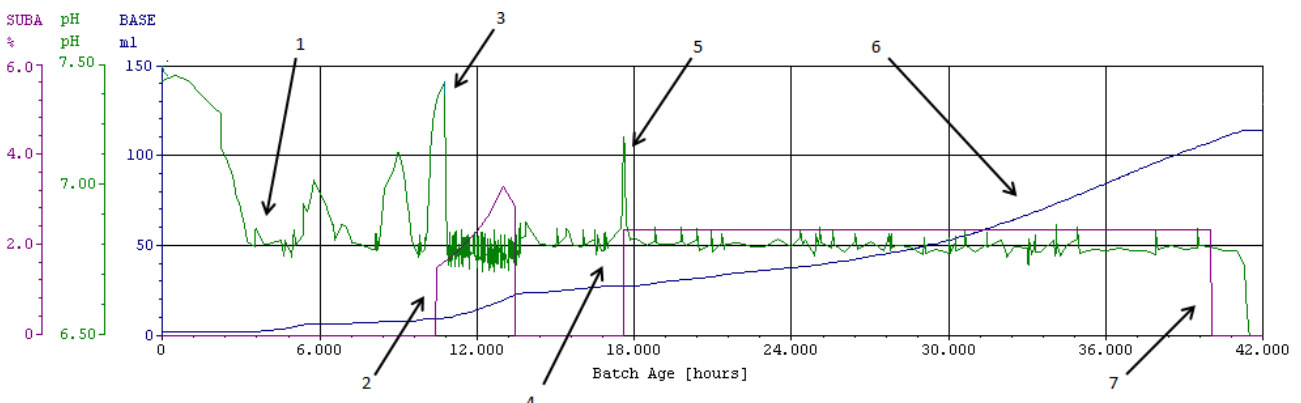


Figura 39: grafico dell'andamento di SUBA, pH e BASE durante una prova di crescita di *E.coli* MG1655;

Osservando l'andamento del pH (verde) durante la prova di crescita del microrganismo *E.coli* MG1655 è possibile notare come inizialmente il pH della coltura sia 7,4, ma venga rapidamente acidificato sino a

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

raggiungere il valore di 6,9, impostato come setpoint dal controllore del pH (1), il dosaggio opportuno della base da parte dell'apposito controllore impedisce al pH di scendere sotto la soglia imposta. L'inizio della fase esponenziale di alimentazione (2), denominata *exponential fed-batch* (EFB), coincide con l'esaurimento delle fonti di carbonio principali, indicato dall'innalzamento del pH oltre il valore di 7,15 (2). Il pH della coltura scende nuovamente una volta che, grazie all'apporto di zuccheri, la crescita microbica riprende⁶⁶. La fase di alimentazione esponenziale termina dopo tre ore, portando la coltura in una seconda fase batch. All'esaurimento della fonte di carbonio principale, che determina l'inizio della fase di alimentazione costante (4), denominata *constant fed-batch* (CFB), si riscontra un secondo picco di pH oltre la soglia di 7,15 (5), anche in questo secondo caso si nota come il pH tenda rapidamente a ritornare verso il proprio setpoint una volta ripresa la crescita del microrganismo all'interno del mezzo di coltura. Per tutta la durata della prova, ad eccezione dei momenti finali delle due fasi batch, è riscontrabile un continuo e costante dosaggio di base, indice della costante acidificazione del mezzo di crescita, è tuttavia necessario sottolineare però che durante la fase di alimentazione, parte dell'acidificazione del mezzo è indotta dal pH acido dell'idrolizzato utilizzato come fonte di zuccheri (6). La prova di crescita ha quindi termine con la fine della fase di alimentazione costante (7).

Durante la prova vengono effettuati prelievi di 50 ml del mezzo di crescita, che vengono denominati in maniera differente a seconda del momento in cui viene effettuato tale prelievo.

- PRE-EFB: il campione viene prelevato qualche istante prima dell'inizio della fase di alimentazione esponenziale;
- POST-EFB: il campione viene prelevato qualche istante dopo il termine della fase di alimentazione esponenziale;
- PRE-CFB: il campione viene prelevato qualche istante prima dell'inizio della fase di alimentazione costante;
- CFB: il campione viene prelevato durante la fase di alimentazione costante;
- POST-CFB: il campione viene prelevato qualche istante dopo il termine della fase di alimentazione costante;

Su ognuno dei campioni viene effettuata un'analisi all'HPLC, un'analisi IC, la misura del pH, della densità ottica allo spettrofotometro e il calcolo del peso cellulare secco del campione.

⁶⁶ tale effetto è dovuto sia all'acidificazione del mezzo da parte del microrganismo che alla natura acida dell'idrolizzato concentrato (pH ≈ 5);

2.7.3. Elaborazione dei dati

Le analisi all'HPLC ed all'IC effettuate su ogni campione permettono di effettuare un bilancio massivo delle specie coinvolte nel processo di crescita, sebbene l'analisi fornisca infatti il valore della concentrazione (g/L) delle componenti analizzate, noto il volume del mezzo di coltura (L) al momento del prelievo del campione è possibile calcolare la massa di ciascun componente (g). Fondamentale ai fini di questo elaborato è la quantità massiva delle seguenti componenti:

- ✓ Glucosio: fonte principale di carbonio nel mezzo di crescita, permette il calcolo della quantità totale di glucosio presenti nel volume di crescita ($G_{presente}$). Conoscendo inoltre la quantità di glucosio dosata (G_{dosato}) al momento del campionamento, è possibile calcolare la quantità di glucosio metabolizzata dal microrganismo ($G_{consumato}$):

$$G_{consumato}[g] = G_{dosato}[g] - G_{presente}[g]$$

- ✓ Xilosio: fonte principale di carbonio nel mezzo di crescita, permette il calcolo della quantità totale di xilosio presenti nel volume di crescita ($X_{presente}$). Conoscendo inoltre la quantità di xilosio dosata (X_{dosato}) al momento del campionamento, è possibile calcolare la quantità di xilosio metabolizzata dal microrganismo ($X_{consumato}$):

$$X_{consumato}[g] = X_{dosato}[g] - X_{presente}[g]$$

- ✓ Arabinosio: sebbene non si tratti di una fonte di carbonio metabolizzabile da *E.coli*, permette il calcolo della quantità totale di zuccheri presenti nel volume di crescita;
- ✓ Acido acetico: Inibitore, permette di calcolare la quantità di questo inibitore all'interno del volume di crescita e verificare la tolleranza di *E.coli* MG1655 a questo componente. Metabolita secondario prodotto durante la crescita di *E.coli* quando all'interno del mezzo di crescita è presente una quantità di glucosio elevata⁶⁷ (> 2 g/L) o in condizioni di crescita limitanti.⁶⁸ Al fine di poter ottenere un dato confrontabile dell'acido acetico prodotto durante la crescita della popolazione batterica, è utile riportare la concentrazione di acido acetico presente ($A_{presente}$) al peso cellulare secco (DCW) al momento del campionamento (AAPB, acido acetico per grammo di biomassa):

$$AAPB \left[\frac{g \text{ di acido}}{g \text{ di biomassa}} \right] = \frac{A_{presente} \left[\frac{g}{L} \right]}{DCW \left[\frac{g}{L} \right]}$$

⁶⁷ effetto Crabtree;

⁶⁸ High cell-density culture of *Escherichia coli*; Sang Yup Lee (1996);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Acido formico: Inibitore, permette di calcolare la quantità di questo inibitore all'interno del volume di crescita e verificare la tolleranza di *E.coli* MG1655 a questo componente;
- ✓ Etanolo: inibitore e metabolita secondario. Indice di crescita in carenza di ossigeno, permette una valutazione qualitativa del processo di crescita. Viene inoltre utilizzato come indicatore di un eventuale contaminazione esterna;
- ✓ Ammonio: nutriente essenziale per la crescita della popolazione batterica;
- ✓ Fosfato: nutriente essenziale per la crescita della popolazione batterica;
- ✓ Potassio: Inibitore, permette di calcolare la quantità di questo inibitore all'interno del volume di crescita e verificare la tolleranza di *E.coli* MG1655 a questo componente;
- ✓ Magnesio: nutriente del quale l'idrolizzato concentrato purificato viene impoverito;
- ✓ Calcio: nutriente del quale l'idrolizzato concentrato purificato viene impoverito;

La misura del peso cellulare secco di ogni campione analogamente, fornisce la concentrazione di biomassa (g/L) presente all'interno del volume di reazione, questo dato tuttavia, contrariamente ad una normale concentrazione molecolare, non assume maggiore significato in termini massivi.

La misurazione della densità ottica inoltre, richiede una correzione in termini di volume, essa infatti necessita di essere moltiplicata per il fattore di diluizione della popolazione batterica durante la prova. Considerando il volume iniziale di crescita (800 ml) ed il volume del mezzo di reazione al momento del campionamento (V_t), il valore reale di densità ottica al momento del campionamento viene calcolato come:

$$OD_{600} [reale] = OD_{600} [misurato] \frac{V_t [ml]}{800 [ml]}$$

Osservando l'andamento dei valori del peso cellulare secco e dell' OD_{600} durante la prova è possibile comprendere le fasi della crescita microbica che il microrganismo *E.coli* MG1655 ha attraversato (vedi paragrafo 2.1), permettendo così di individuare l'arresto della crescita esponenziale (crescita stazionaria). Confrontando le fasi della crescita della popolazione batterica con la quantità massiva di zuccheri presenti e

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

la concentrazione degli inibitori, è possibile fornire un'indicazione dell'eventuale limitazione che ha portato all'arresto della crescita:

- ✓ Limitazione da nutriente: se dai dati analitici viene riscontrata una carenza di uno dei nutrienti fondamentali;
- ✓ Limitazione da substrato: se dai dati analitici viene riscontrata una carenza degli zuccheri ritenuti fonti principali di carbonio per il microrganismo;
- ✓ Limitazione da inibitore: se dai dati analitici non viene riscontrata alcuna carenza di nutrienti o di zuccheri ritenuti fondamentali per la crescita del microrganismo e la concentrazione degli inibitori supera quelle che sono ritenute le soglie di tolleranza.

2.8. Metodologie di Purificazione

Nel seguente paragrafo vengono descritte i metodi utilizzati per la purificazione dell'idrolizzato PROESA®, testati.

2.8.1. Resine di scambio Ionico

Lo scambio ionico è un processo in cui ioni di una data specie sono sostituiti, sulla superficie di un materiale non solubile di scambio (resina a scambio ionico), da ioni di una specie differente disciolti in soluzione.

Le modalità operative possono essere batch o in continuo. Nella modalità batch la soluzione da trattare viene messa in contatto con la resina in un reattore finché la reazione si completa. La resina esausta viene poi rimossa ed adeguatamente rigenerata per un successivo riutilizzo.

Nel processo in continuo le resine sono poste su un letto di scambio o più generalmente in colonne attraverso le quali viene fatto passare il liquido da trattare. Generalmente il refluo fluisce dall'alto verso il basso della colonna. Una volta che la capacità di scambio della resina si è esaurita, si provvede ad un lavaggio per la rimozione di eventuali sedimenti che avessero intasato la colonna e si procede quindi alla rigenerazione della resina.

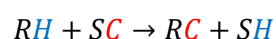
Si distinguono cinque tipi di resine sintetiche a scambio ionico:

- ✓ Resine cationiche forti: si comportano in maniera simile ad un acido forte e vengono fortemente ionizzate sia nella loro forma acida ($R-SO_3H$) che in quella salina ($R-SO_3Na$) in un ampio spettro di valori di pH;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Resine cationiche deboli: hanno un gruppo funzionale acido debole, tipicamente un gruppo carbossilico (COOH). Queste resine si comportano come acidi deboli e come tali hanno un basso grado di dissociazione;
- ✓ Resine anioniche forti: vengono fortemente ionizzate grazie a gruppi basici forti quali l'anione idrossile (OH) e possono essere utilizzate in tutto l'intervallo di pH. Grazie al gruppo idrossile OH⁻ sono spesso utilizzate per la deionizzazione dell'acqua;
- ✓ Resine anioniche deboli: sono portatrici di gruppi basici deboli e pertanto hanno un grado di ionizzazione dipendente dal pH, generalmente ionizzano in intervalli di pH ristretti;
- ✓ Resine selettive chelanti per metalli pesanti: si comportano come resine cationiche forti, presentando però un alto grado di selezione nella capacità di legare i cationi dei metalli pesanti. Spesso il gruppo funzionale di queste resine è l'EDTA e perciò per esse nella forma sodica si usa la simbologia R-EDTA-Na.

Per la comprensione dei risultati ottenuti in questa tesi, è bene analizzare in maggior dettaglio le resine cationiche, che scambiano un idrogenione H⁺ presente sul gruppo funzionale con i cationi presenti in soluzione (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, etc.) . Considerando quindi la reazione tra la resina (R) ricca in ioni idrogeno (H), con la soluzione (S) ricca in cationi (C):



Alla fine della reazione di scambio la soluzione risulterà impoverita dei propri cationi e ricca di ioni idrogeno (pertanto acida).

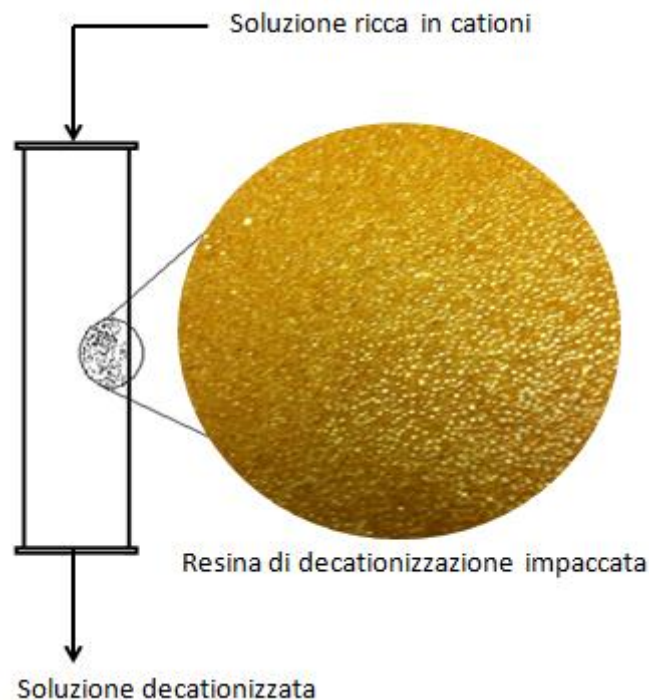
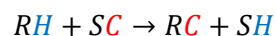


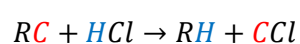
Figura 40: Schematizzazione di una colonna di decationizzazione;

Si noti che le reazioni di scambio ionico sono delle vere e proprie reazioni chimiche di equilibrio e come tali reversibili. In tal ottica quindi il ciclo lavorativo di una resina si compone di due fasi:

- ✓ la fase di esercizio detta anche di “esaurimento” durante la quale si ha la sostituzione degli ioni presenti sui gruppi funzionali della resina con quelli presenti in soluzione. Al termine di questa fase si ha quindi la completa saturazione di tutti i gruppi funzionali, che non sono quindi più in grado di scambiare ioni idrogeno con i cationi della soluzione.



- ✓ la fase di ricarica della resina detta anche “rigenerazione” nella quale la resina viene trattata con soluzioni acide, tipicamente a base di acidi forti (HCl, H₂SO₄), così che i gruppi funzionali della resina cationica possano scambiare i cationi con ioni idrogeno.



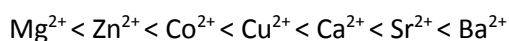
L'elevata concentrazione di ioni H⁺, determina lo spostamento della reazione generale a sinistra con conseguente ricarica delle resine e rilascio in soluzione degli ioni, che nella fase di esaurimento erano stati

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

assorbiti dalle resine. Si ottiene così un eluato generalmente composto da cloruri di vari metalli (come visto nel caso si utilizzi HCl, lo ione H^+ ricarica la resina, mentre lo ione Cl^- si lega al catione rilasciato).

La selettività di una resina, cioè il fatto che scambi uno ione presente in soluzione, piuttosto che un altro, dipende dalla natura e dalla valenza dello ione, dal tipo di resina, dalla sua saturazione, nonché dalla concentrazione di uno specifico ione in soluzione. Generalmente tale selettività resta valida in un ristretto intervallo di pH.

Tipicamente la scala di selettività (o di affinità di scambio) delle resine cationiche risulta essere:



La capacità di scambio di una resina viene misurata ponendo la resina in una condizione nota. Ad esempio una resina cationica viene prima trattata con un acido forte in modo da caricare tutti i siti di scambio con ioni H^+ , successivamente sulla resina viene fatta passare una soluzione a concentrazione conosciuta di uno ione di scambio (ad esempio Ca^{2+}) finché tutta la resina si è saturata, misurando così la quantità di ioni scambiati. La capacità di scambio delle resine viene espressa in termini di grammi di $CaCO_3$ per L di resina (g/L) o equivalenti per L (eq/L).

La resina di de-cationizzazione, utilizzata nel laboratorio di catalisi per la purificazione dell'idrolizzato PROESA®, è una resina cationica con gruppi funzionali solfonici denominata RELITE EXC 14 prodotta dalla Resindion s.r.l..

Matrice	Copolimero granulare stirolo-DVB
Gruppo funzionale	Solfonico
Colore e forma	Sfere trasparenti giallo bruno
Distribuzione granulometrica	0,3-1,18 [mm]
Diametro effettivo	0,4 [mm]
Coefficiente d'uniformità	1,6 x
Capacità totale di scambio	2,2 [eq/L]
Umidità	41-48 [%]
Campo di stabilità pH	0 - 14
Stabilità termica	sino a 120 °C

Tabella 15: caratteristiche principali RELITE EXC 14;

2.8.2. Filtrazione con membrane

I processi di separazione che sfruttano la tecnologia delle membrane sono ampiamente impiegate nei processi farmaceutici e biotecnologici in ragione del basso costo energetico e dell'elevata efficienza di separazione che questa tecnologia può vantare.

È possibile definire una membrana come una barriera semipermeabile che consente in maniera completa o parziale la diffusione di alcune particolari specie, permettendo così di dividere il flusso in ingresso (alimentazione), in due correnti, una contenente le specie alla quale è impedito il passaggio (ritentato) e una che contiene le specie che invece possono attraversare la membrana (permeato). Questa membrana viene quindi detta appunto "barriera selettivamente permeabile", poiché consente il passaggio ad alcuni composti, ritenendone altri, tale selettività è generalmente associata al peso molecolare, alla dimensione dei pori della membrana, alla diffusività del soluto e la carica ionica associata ad esso.

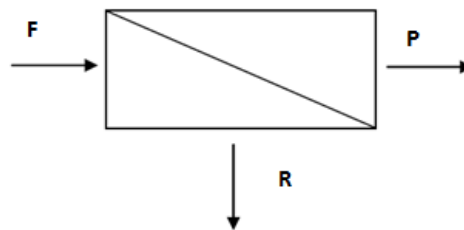


Figura 41: Schematizzazione della ripartizione dei flussi attraverso un processo di filtrazione con membrana;

Generalmente il flusso in ingresso alla membrana viene indicato con la lettera F e la concentrazione nel componente i esimo con C_F , si indica poi con la lettera R il retentato, la cui concentrazione nel medesimo componente è C_R e con la lettera P il permeato, la cui concentrazione della specie i è C_P .

La principale differenza con cui vengono classificate le membrane riguarda la loro conformazione:

- ✓ membrane porose: paragonabili ad un setaccio, separano le diverse sostanze in base ad una relazione tra il peso molecolare dei composti in soluzione e la dimensione dei pori della membrana, fattori come la viscosità della soluzione influenzano in maniera considerevole le prestazioni di questo tipo di membrane. Tali membrane si distinguono ulteriormente in membrane porose simmetriche, che mostrano una dimensione dei pori pressoché costante lungo lo spessore della

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

membrana, e membrane porose asimmetriche, che mostrano invece una dimensione dei pori crescente lungo lo spessore della membrana;

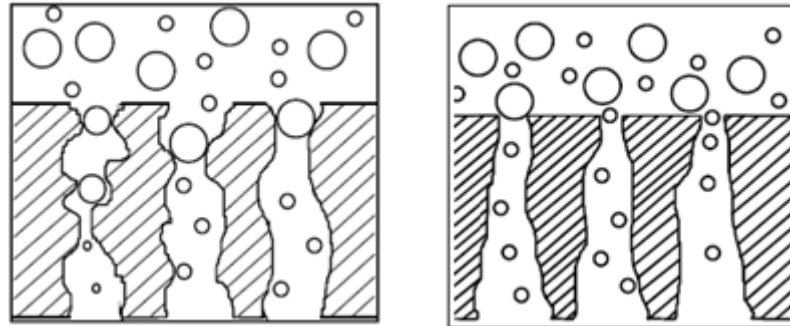


Figura 42: Membrane porose simmetriche (sinistra) e asimmetriche (destra);

- ✓ membrane dense: sono compatte e vengono attraversate solo da composti con cui hanno una determinata affinità, impedendo il passaggio ad altri, caratteristiche come la carica ionica di un composto o la sua polarità influenzano in maniera considerevole il funzionamento di questo tipo di membrane, caratterizzate generalmente da un bassissimo flusso di permeato;

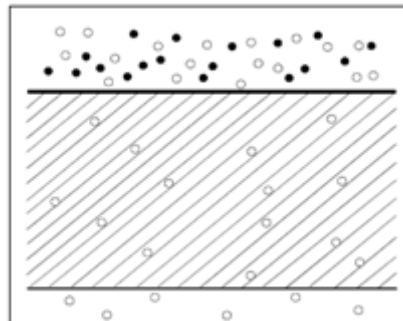


Figura 43: Membrane dense;

Una classificazione diversa dei tipi di membrana può quindi essere fatta considerando non la loro conformazione ma la loro composizione, vengono distinte due differenti categorie di materiali adatti alla costruzione di membrane: materiali organici, come acetato di cellulosa (CA), poliammidi (PA), polisulfurati (PS) o polivinilidenefluoruro (PVDF) e materiali inorganici, come ceramiche o metalli.

Le membrane organiche offrono uno spettro molto più ampio per quanto riguarda le dimensioni e le forme che è possibile ottenere dall'unione di vari polimeri, ma hanno lo svantaggio di poter lavorare solo in determinati intervalli di temperatura e pH. Queste limitazioni, sebbene non siano spesso problematiche durante i processi di filtrazione, possono risultare molto più limitanti per i processi di lavaggio della

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

membrana stessa, infatti generalmente per lavare questi filtri si utilizzano soluzioni fortemente basiche ad alta temperatura.

La classificazione più generica delle membrane però rimane quella relativa al taglio che esse effettuano, riguardante principalmente il peso molecolare minimo che permea attraverso la membrana stessa.

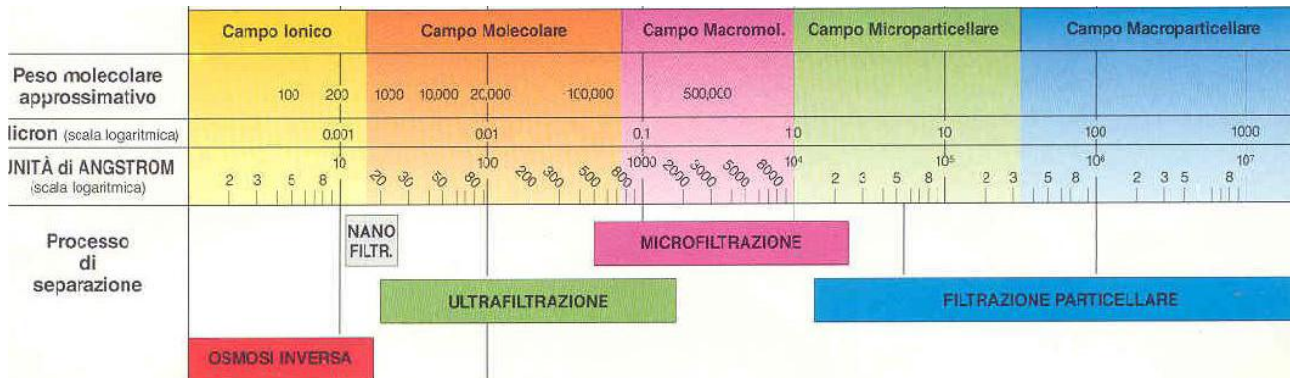


Figura 44: Classificazione delle membrane in relazione al peso molecolare permeato;

- ✓ *Microfiltrazione:* La microfiltrazione viene utilizzata per separare le particelle sospese ed i batteri mediante l'applicazione di pressioni dell'ordine di 1 bar. Le membrane per microfiltrazione sono porose e sono disponibili commercialmente con diametro medio dei pori variabile da 0.1 μm fino a più di 10 μm ;
- ✓ *Ultrafiltrazione:* L'ultrafiltrazione viene impiegata per separare i colloidi e le macromolecole (massa molecolare da ca. 1000 a ca. 2000000 Dalton) da soluti a bassa massa molecolare e dal solvente. Le pressioni impiegate nell'ultrafiltrazione sono approssimativamente tra 1 bar e 7 bar. Le membrane da ultrafiltrazione sono porose ed agiscono prevalentemente come un setaccio trattenendo le specie disciolte, emulsionate o disperse con dimensione superiore a quella dei pori delle membrane (100-200 nm), consentendo invece il passaggio delle altre specie e ovviamente del solvente;
- ✓ *Nanofiltrazione:* La nanofiltrazione separa soluti con massa molecolare dell'ordine di quella di un disaccaride (ad es. saccarosio) o gli ioni bivalenti esempio o acidi dissociati (250-400 Da). Le membrane utilizzate in questo processo hanno pori molto piccoli (dell'ordine di 1-2 nm) e sono generalmente dotate di cariche elettriche (gruppi ionici fissi).

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Il meccanismo di separazione nelle membrane da NF avviene quindi non solo in base alla dimensione dei pori ma anche alla repulsione elettrostatica verso gli ioni che presentano lo stesso segno di carica della membrana. Le pressioni impiegate non superano 10-20 bar;

- ✓ *Osmosi inversa*: L'osmosi è il processo attraverso il quale un solvente (ad esempio acqua) passa spontaneamente attraverso una membrana semipermeabile verso un'altra soluzione (oppure passa, sempre spontaneamente, attraverso la membrana da una soluzione più concentrata in una soluzione più diluita). Il passaggio si arresta quando si raggiunge l'equilibrio, cioè l'eguale concentrazione in entrambi i lati della membrana. Ad equilibrio raggiunto la differenza di pressione tra i due lati della membrana è la pressione osmotica. Se si applica una pressione superiore alla pressione osmotica il flusso della soluzione si inverte. In tal modo si riesce a separare ioni o soluti di bassa massa molecolare (approssimativamente inferiore a 500 Dalton) da una soluzione diluita ad una concentrata.

La caratteristica principale che distingue un processo con membrana da una comune filtrazione è la direzione del flusso da separare, mentre in un processo di filtrazione classico il flusso viene diretto perpendicolarmente al setaccio e la soluzione ritentata viene raccolta nella camera contenente il filtro stesso, in un processo a membrana la soluzione da separare viene diretta tangenzialmente alla membrana, il permeato è raccolto quindi lungo un lato della membrana, mentre la soluzione ritentata scorre lungo la membrana. Il flusso concentrato quindi, scorrendo tangenzialmente alla superficie di filtrazione, riduce il deposito dei solidi sospesi nella soluzione ed il fenomeno di *blocking*, dovuto all'accumulo di materiale sulla membrana stessa.

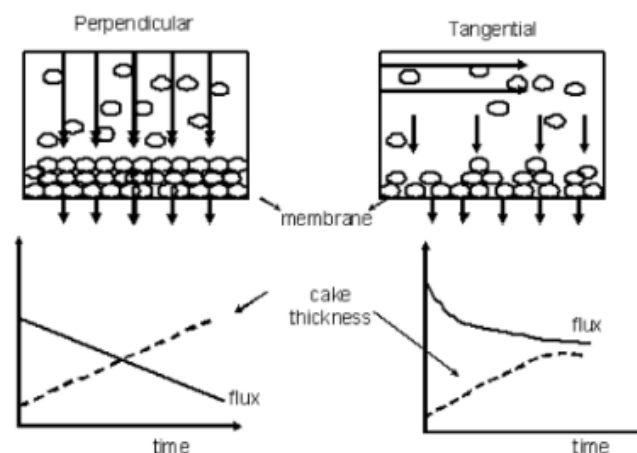


Figura 45: Confronto di un normale processo di filtrazione ed un processo di filtrazione con membrana;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Il meccanismo che governa i processi di separazione a membrana è molto complesso, molte variabili come la composizione della membrana, il metodo di separazione o di fabbricazione della membrana, l'interazione tra la membrana e il fluido permeato, la pressione applicata, la viscosità del fluido e la sua velocità, influenzano in maniera significativa il processo di filtrazione. Si possono però distinguere due fattori principali che governano questo processo: la dimensione dei pori della membrana (separazione meccanica) e le interazioni chimiche tra la soluzione e la membrana stessa (separazione chimica).

Contrariamente alla filtrazione più classica infatti, il meccanismo con membrana non può discernere dalle interazioni tra il fluido e la membrana stessa, alcune particelle con particolari affinità possono infatti arrivare a legarsi alla membrana stessa con legami di tipo Van Der Waals, oppure essere persino adsorbite sulla superficie della membrana stessa. Diventa quindi fondamentale la relazione tra il tipo di soluzione da separare (polare o non polare) e il tipo di membrana che viene utilizzata (idrofilica o idrofobica), si è potuto infatti notare che per solventi polari il flusso che attraversa la membrana è significativamente più elevato (8-10 volte), rispetto a quello che si avrebbe con solventi non polari, quando si utilizzano membrane idrofiliche, mentre il flusso di solventi non polari è più elevato (2-4 volte) di quello di solventi polari, in presenza di membrane idrofobiche.⁶⁹

Fattori che permettono una buona caratterizzazione del processo di membranazione sono il coefficiente di ritenzione (R) ed il rapporto di concentrazione in volume (VCR), il primo può essere definito con la seguente equazione:

$$R = 100 \times \left(1 - \frac{C_p}{C_r}\right)$$

dove C_p è la concentrazione del componente i nel permeato e C_r la concentrazione del medesimo componente nel ritentato. Esso indica quindi in quale percentuale un determinato composto viene trattenuto dalla membrana stessa. Un valore di R pari al 100% indica un composto che viene completamente trattenuto, mentre un valore di 0% indica che un composto è completamente permeato.

Il valore del rapporto di concentrazione in volume (VCR) indica invece il grado di concentrazione di una soluzione al termine del processo di membranazione, esso viene calcolato come il rapporto tra il volume iniziale (alimentato) e il volume finale del ritentato (concentrato), per cui:

$$VCR = \frac{V_{\text{alimentato}}}{V_{\text{concentrato}}}$$

⁶⁹ Effect of pressure and pH in ammonium retention for nanofiltration and reverse osmosis membranes to be used in recirculation aquaculture systems (RAS); B. C. Madariagaa, C. F. Hurtadob, R. Ruby (2011);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Il tipo di membrana utilizzata nell'impianto pilota PROESA® e testato nello studio riportato in questa tesi è a osmosi inversa (RO) denominate RO98 e prodotte dalla Alfa Laval. Gli elementi sono costituiti da unica membrana porosa simmetrica in poliestere (PET) ripetutamente avvolta su una struttura centrale, tale conformazione permette, applicando la dovuta sovrappressione, di migliorare le prestazioni della membrana aumentando notevolmente la superficie complessiva di filtrazione.

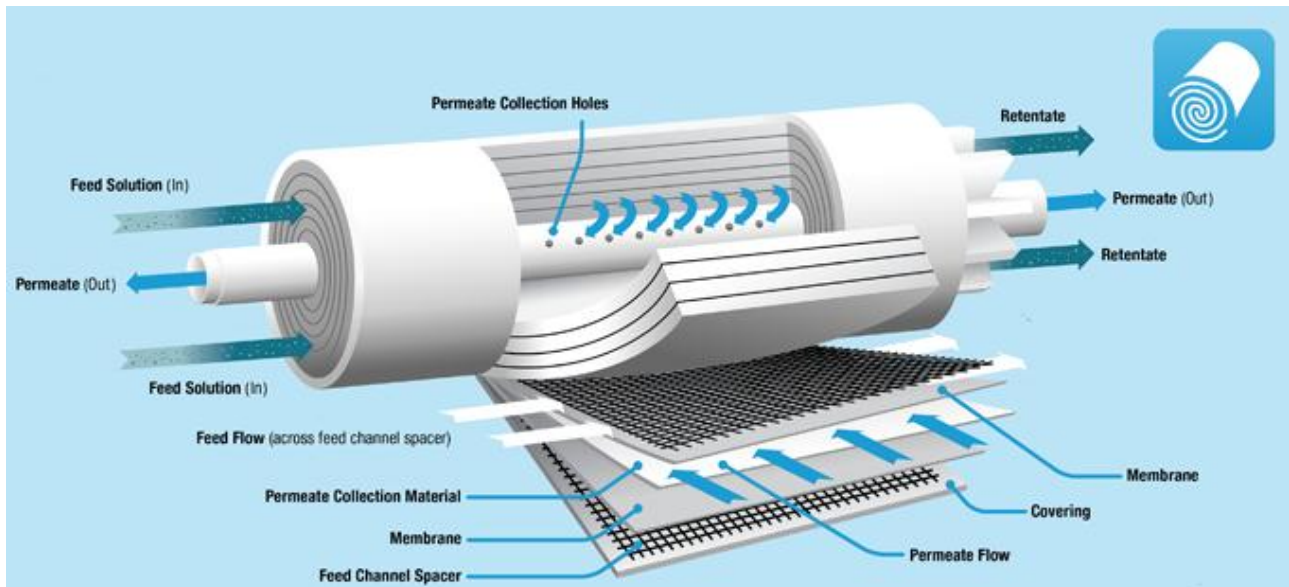


Figura 46: Schematizzazione funzionamento membrana a spirale;

Un parametro con il quale è generalmente caratterizzata una membrana di filtrazione è la ritenzione di NaCl, il codice alfanumerico della membrana RO98 prodotta dalla AlfaLaval infatti indica, oltre alla tipologia di membrana, anche la sua ritenzione di NaCl caratteristica (98%)⁷⁰.

Il sistema di filtrazione a membrana presente nell'impianto pilota PROESA® opera in semi-continuo ed è costituito da una pompa che preleva l'alimento da trattare da un serbatoio tipo batch e lo manda al modulo dove è alloggiata la membrana.

⁷⁰ Misurata su 2000ppm di NaCl alla sovrappressione di 9 bar e alla temperatura di 25°C. Fonte: AlfaLaval;

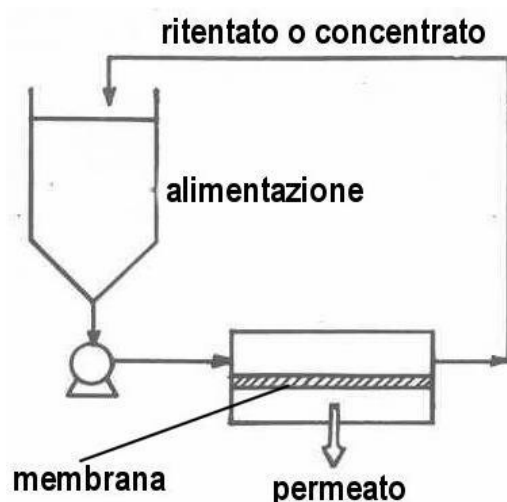


Figura 47: schema del sistema di filtrazione a membrana nell'impianto PROESA®;

Nello schema presentato il permeato viene prelevato continuamente mentre il ritentato (specie trattenute) viene completamente riciclato al serbatoio di alimentazione. La concentrazione del ritentato aumenta così progressivamente sino al raggiungimento dei limiti operativi del processo di membrana.

2.9. Procedure di Laboratorio per la Purificazione

Nel seguente paragrafo verranno descritte le procedure adottate per effettuare i test di purificazione e l'effettivo processo di purificazione condotto con i sistemi descritti nel paragrafo precedente.

2.9.1. Prove in colonna con resine di scambio ionico

Le sperimentazioni utilizzate per la decationizzazione dell'idrolizzato PROESA® mediante resine cationiche si sono divise in due attività differenti, da prima è stata testata l'efficacia della resina RELITE EXC 14 su una colonna in vetro da 200 ml, contenente un volume di resina complessivo di 165 ml, quindi, sfruttando le informazioni dedotte dalla prima attività di laboratorio, si è condotta la purificazione dell'idrolizzato PROESA® in scala di impianto pilota, utilizzando una colonna contenente un volume di resina complessivo di 61 L.

2.9.1.1. Prova in laboratorio

Come accennato le prove in laboratorio sono state necessarie per comprendere l'effettiva efficacia di un processo di decationizzazione sull'idrolizzato PROESA® e l'entità dei volumi di servizio per i processi di lavaggio e rigenerazione della resina. Per tale sperimentazione è stata utilizzata una colonna in vetro

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

borosilicato da 200 ml per cromatografia, dotata nella parte inferiore di un disco filtrante ed una valvola di chiusura. Per la movimentazione dei fluidi all'interno della colonna vengono utilizzati dei tubi in silicone del diametro interno di 1,4 mm, collegati ad una testa pompante multicanale a cassette.

La colonna opera a temperatura ambiente e pressione atmosferica.

Il riempimento della colonna prevede da prima l'idratazione della resina cationica con acqua demineralizzata, 200 ml di resina vengono quindi lasciata a bagno in un beaker per tre ore, quindi la resina umida viene versata all'interno della colonna dall'alto, lasciando la valvola alla base della colonna chiusa. Una volta riempita la colonna così che la resina sia completamente immersa in acqua, è possibile richiudere la sommità della colonna e collegare i condotti di alimentazione (superiore) e prelievo (inferiore), entrambi i condotti vengono collegati alla medesima testa pompante, così che la portata in uscita ed in ingresso alla colonna venga mantenuto uguale. Il condotto di prelievo viene collegato ad un beaker contenente la soluzione che si intende lasciare fluire all'interno della colonna (acqua, idrolizzato o soluzione acida), mentre l'uscita viene collegata ad un collettore di frazioni, impostato così che raccolga frazioni di 20 ml.

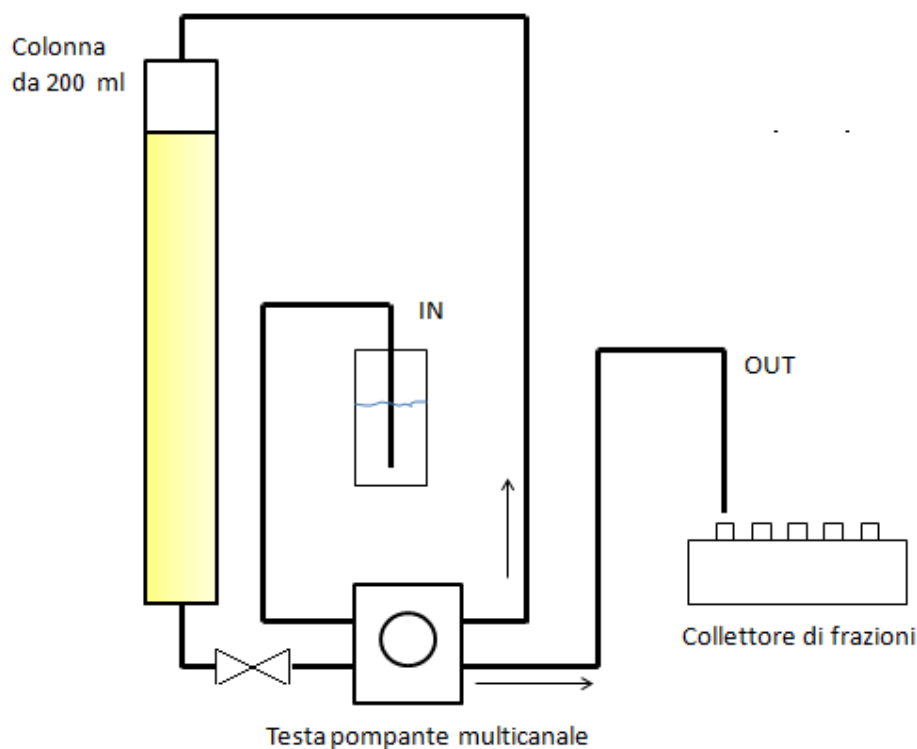


Figura 48: Schematizzazione dell'impianto di laboratorio per la colonna di decationizzazione;

La prova si distingue quindi in quattro fasi, durante le quali, per ogni campione raccolto viene misurato il pH, il peso della frazione raccolta [g], i gradi brix [°B] e la conducibilità elettrica [mS/cm]:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Lavaggio: Inizialmente alla colonna viene inviato un flusso di acqua demineralizzata con una portata 8 BV/L⁷¹. Viene misurato il pH della soluzione in uscita dalla colonna di decationizzazione per ogni frazione raccolta nel collettore di frazioni (20 ml ogni frazione). Il lavaggio ha termine quando il pH della soluzione in uscita è 6,0 (pH neutro). Tale operazione è necessaria per assicurarsi che all'interno della colonna non vi siano residui;
- ✓ Rigenerazione: Al termine del primo lavaggio viene inviato alla colonna un flusso di una soluzione di HCl (1N) con una portata di 4 BV/L. La rigenerazione ha termine quando il pH della soluzione in uscita raggiunge un valore stazionario (pH 1). Durante questa operazione la resina carica i propri gruppi funzionali con ioni idrogeno;
- ✓ Lavaggio: Alla colonna viene nuovamente inviato un flusso di acqua demineralizzata con una portata 8 BV/L. Il lavaggio ha termine quando il pH della soluzione in uscita è 6,0 (pH dell'acqua demineralizzata). Tale operazione è necessaria per assicurarsi che all'interno della colonna non vi siano residui della soluzione acida;
- ✓ Esaurimento: Alla colonna viene inviata la soluzione che si intende decationizzare, con una portata 4 volumi di letto ora. L'esaurimento della resina ha termine quando il pH della soluzione in uscita torna al valore originario (pH della soluzione prima della decationizzazione). In questa fase è possibile distinguere tre sottofasi: la prima in cui la soluzione che si intende decationizzare fluisce all'interno della colonna, ma la soluzione in uscita è diluita dall'acqua di lavaggio ancora presente nella colonna, tale sottofase viene denominata "spostamento acqua" ed è caratterizzata da un rapido abbassamento del pH delle frazioni raccolte. Quando il pH si stabilizza (< 2.00) si ha la sottofase di "produzione", sino a quando, all'esaurimento della resina, il pH non torna a salire rapidamente, dando inizio alla terza sottofase, lo "spostamento del prodotto", all'interno della colonna viene inviata una soluzione ancora ricca in cationi ed in uscita si ha una miscela composta da tale liquido e la soluzione decationizzata;

⁷¹ [BV/L]: unità di misura per la portata generalmente utilizzata per misurare la portata in ingresso/uscita di una colonna di cromatografia, corrisponde al rapporto tra la portata effettiva [L/h] e il volume di resina nella colonna [L];

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Campione	p (g)	V _{TOT} (L)	BV	pH	C (mS/cm)	°B
inizio lavaggio				???		
.....				...		
fine lavaggio				6.00		
inizio rigenerazione				6.00		
.....				...		
fine rigenerazione				1.00		
inizio lavaggio				1.00		
.....				...		
fine lavaggio				6.00		
spostamento acqua				5.00		
spostamento acqua				4.00		
spostamento acqua				2.00		
inizio produzione				1.50		
.....				...		
fine produzione				1.50		
spostamento prodotto				2.00		
spostamento prodotto				3.00		
spostamento prodotto				4.00		

	Lavaggio
	Dosaggio acido (HCl)
	Spostamento acqua
	Produzione
	Spostamento prodotto

Figura 49: Andamento del pH durante le fasi di decationizzazione;

Al termine della fase di esaurimento è possibile quindi comprendere alcune delle caratteristiche principali della resina utilizzata. Da prima viene quindi calcolato il volume di acido necessario per la completa rigenerazione della resina, il volume di soluzione di HCl (1N) dosato viene quindi moltiplicato per la propria normalità (eq/L). Il valore così ottenuto, ovvero il numero di equivalenti dosati, viene diviso per il volume di resina utilizzato, così da ottenere il numero di equivalenti necessari per rigenerare un litro di resina:

$$Rigenerazione \left[\frac{eq}{L} \right] = \frac{V(\text{fine rigenerazione}) - V(\text{inizio rigenerazione})}{V(\text{resina})} \times N \left[\frac{eq}{L} \right]$$

Vengono quindi calcolati anche la proporzione tra il volume della soluzione decationizzata ed il volume della resina utilizzata, tale valore permette di calcolare la quantità di soluzione decationizzabile con un determinato quantitativo di resina cationica.

$$Esaurimento [N^\circ \text{ di volumi di letto}] = \frac{V(\text{fine esaurimento}) - V(\text{inizio esaurimento})}{V(\text{resina})}$$

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Come si evince dal calcolo, tale valore tiene in considerazione il volume delle tre sottofasi della fase di esaurimento, compresa quindi la quantità di soluzione necessaria per lo spostamento dell'acqua di lavaggio e del prodotto al termine della decationizzazione.

2.9.1.2. Prova impianto pilota

Il sistema utilizzato all'interno dell'impianto pilota PROESA® per la decationizzazione, è un impianto della Eurotec per decationizzazione costituita da una singola colonna dell'altezza di 1500 mm e del diametro di 250 mm, adatta al contenimento di 60 L di resina, realizzata in duplex. L'impianto è dotato inoltre di un gruppo di alimentazione sia per l'idrolizzato che per l'acqua demineralizzata alla colonna, costituito da una pompa monovite con portata massima 0,5 m³/h, e gruppo per il dosaggio dell'acido cloridrico (32%), con una pompa a membrana, portata massima 30 L/h.

L'impianto è dotato di un sistema di monitoraggio automatico, che oltre a registrare i valori di pH e conducibilità del prodotto in uscita della colonna, garantisce il corretto alternarsi delle fasi di lavaggio, esaurimento e rigenerazione della resina di decationizzazione. L'alternanza di tali fasi in un processo di decationizzazione a livello pilota tuttavia è differente da quello utilizzato in laboratorio, si esegue infatti da prima la fase di esaurimento, composta dalle sole sottofasi di produzione e spostamento del prodotto, quindi si rigenera la resina con una soluzione di HCl al 32% e si procede al lavaggio della resina con acqua demineralizzata.

Tale procedimento permette di valutare l'effettivo costo di rigenerazione della resina utilizzata per la decationizzazione di un determinato quantitativo di soluzione processata, in termini di eq/L. Avvenuto o meno l'esaurimento della resina infatti, attraverso questo procedimento è possibile valutare la sola quantità di acido cloridrico necessaria per la rigenerazione della resina utilizzata.

2.9.2. Prove con Alfa Laval Pilot Unit 2,5"

Il sistema utilizzato per la filtrazione con membrana, è un dispositivo della Alfa Laval denominato "Alfa Laval Pilot unit 2,5" RO/NF", il cui funzionamento è quello descritto nel paragrafo 2.8.2 (figura 53). Qui di seguito viene riportato un disegno più dettagliato dell'unità di filtrazione a membrana:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

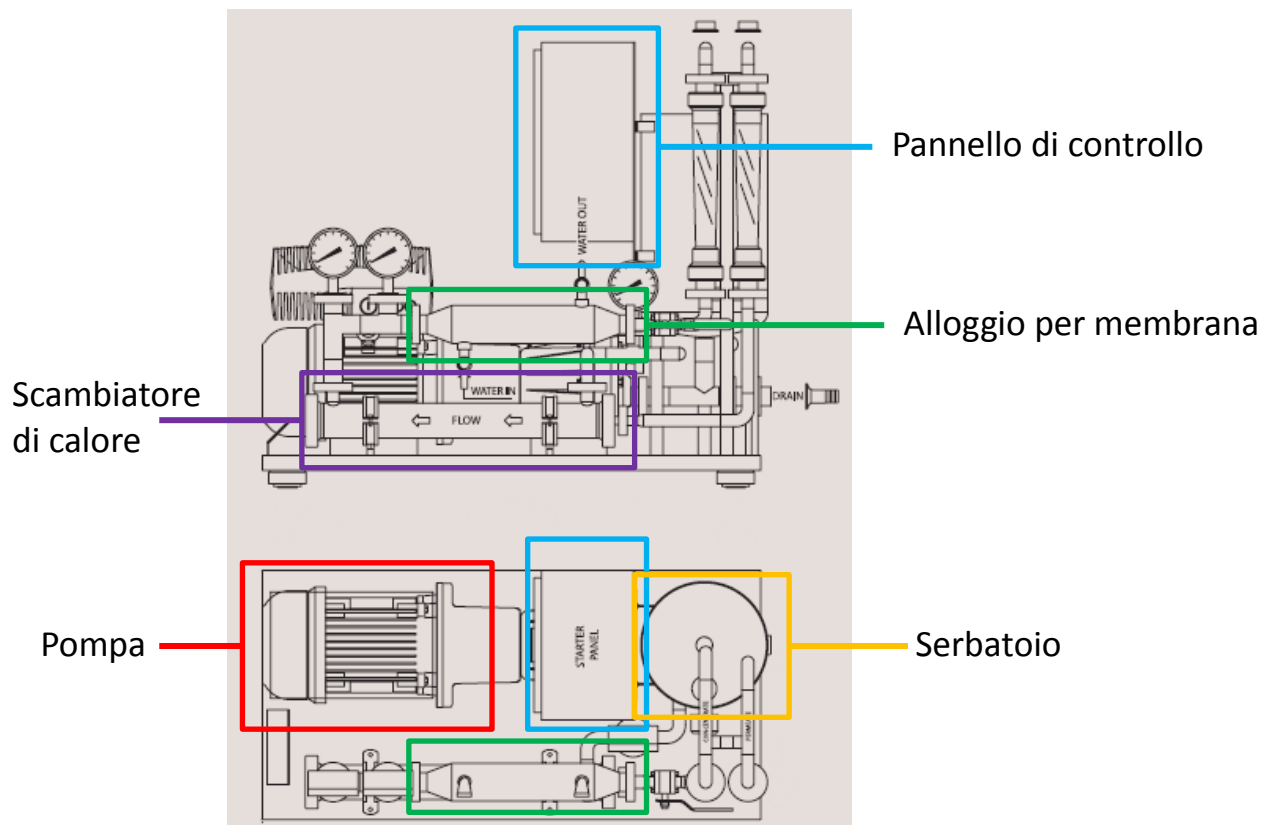


Figura 50: Disegno dell'unità di filtrazione con membrana;

La soluzione da membranare contenuta all'interno del serbatoio viene pompata attraverso i condotti in acciaio (diametro 28 mm) prima ad un filtro per le particelle solide ($1\ \mu\text{m}$), quindi allo scambiatore di calore, così da essere riscaldato sino a 30°C . Il liquido riscaldato viene quindi inviato alla sezione contenente la membrana a spirale per l'osmosi inversa, dove vengono separati il flusso ritentato, rinviato al serbatoio, ed il flusso permeato, che viene scaricato in un tank esterno all'unità. Il sistema è dotato di due indicatori di pressione, a monte (pressione ingresso) e a valle della membrana, lungo la linea del ritentato (pressione ritentato). La pressione di ingresso viene mantenuta a 40 bar. A valle dello scambiatore di calore è presente anche un indicatore di temperatura collegato ad una termoresistenza.

Il sistema permette, qualora necessario, di interrompere il flusso della soluzione che si desidera filtrare, per effettuare un lavaggio interno dell'intero sistema, con acqua o con soda. Durante l'operazione di filtrazione infatti sulla superficie della membrana si forma uno strato di materiale solido (*blocking*) che riduce notevolmente le capacità di filtrazione della membrana stessa, portando ad una rapida diminuzione del flusso di permeato. Quando quindi la portata del liquido permeato scende sotto i $50\ \text{mL}/\text{min}$, viene interrotta la filtrazione e si procede ad un lavaggio sino al ripristino dei valori iniziali di portata del permeato (circa $150\ \text{mL}/\text{min}$). Le condizioni di lavaggio utilizzando una soluzione di soda (NaOH) allo 0,1 %, sono una temperatura di 50°C ed una pressione di 5 bar (portata $\approx 160\ \text{mL}/\text{min}$).

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Con l'utilizzo di un flussimetro viene misurata la portata del permeato (P) ogni 15 minuti. Grazie a tale valore è possibile calcolare il volume permeato (V_P) corrispondente a tale misurazione. Considerando il generico campionamento "i", il volume del permeato corrispondente al tempo t_i sarà calcolato come:

$$V_P(t_i) = V_P(t_{i-1}) + \left[\frac{P(t_i) + P(t_{i-1})}{2} (t_i - t_{i-1}) \right]$$

Dove:

- ✓ t_i il tempo misurato in minuti [min] del campionamento "i" dal tempo 0;
- ✓ t_{i-1} il tempo misurato in minuti [min] del campionamento "i-1" dal tempo 0;
- ✓ $V_P(t_i)$ il volume di permeato misurato in ml del campionamento "i";
- ✓ $V_P(t_{i-1})$ il volume di permeato misurato in ml del campionamento "i-1";
- ✓ $P(t_i)$ la portata di permeato misurato in ml/min del campionamento "i";
- ✓ $P(t_{i-1})$ la portata di permeato misurato in ml/min del campionamento "i-1";

Una volta noto il volume di permeato, poiché è noto il volume iniziale di alimentazione (V_A) è possibile calcolare il volume del ritentato (V_R) presente all'interno del serbatoio, da cui è quindi possibile calcolare il VCR al tempo del campionamento⁷²:

$$V_R(t_i) = V_A - V_P(t_i) \rightarrow VCR(t_i) = \frac{V_A}{V_A - V_P(t_i)}$$

Durante la prova, al raggiungimento di soglie prestabilite di VCR, vengono eseguiti alcuni campionamenti di 100 ml di permeato e ritentato, dei quali viene fatta un'analisi completa (HPLC ed IC).

Il processo di filtrazione viene interrotto quando:

- ✓ Anche operando lavaggi con soda il flusso di permeato non viene ristabilito. Questo indica che tale portata non è dovuta ad un fenomeno di *blocking*, ma ad un effettivo raggiungimento di limiti operativi da parte della membrana;
- ✓ Si raggiunge il valore di VCR desiderato;

Di seguito viene riportato un esempio della tabella utilizzata per raccogliere i dati della prova di filtrazione con membrana, con la legenda necessaria per interpretare il susseguirsi delle fasi della prova.

⁷² a meno di eventuali perdite di liquidi;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Tempo	Flusso permeato	Volume permeato	VCR
min	mL/min	L	L/L
1	155		
...	...		
...	<50		
...	> 100		
...	...		
...	< 50		
...	> 100		
...	VCR

Legenda	
lavaggio con soda	
lavaggio con acqua	
campionamento	

Tabella 16: Tabella per la raccolta dei dati relativi alla prova di filtrazione con membrana;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

BIBLIOGRAFIA:

- [1] Manuale cappa BIO-hazard di classe II, Analitica De Mori SRL, Mars;
- [2] Manuale *Orbital Shaker SHKE8000-8EC*, MaxQ;
- [3] Manuale spettrofotometro a fascio doppio Scan 100, CARY;
- [4] Manuale Biostat Bplus twain O2 enrichment , Sartorius;
- [5] http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Welcome_to_EcoliWiki
- [6] Biofuels for Fuel Cells: Renewable Energy from Biomass Fermentation. A cura di Piet N. L. Lens, Piet Lens (1994);
- [7] Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. P. J. Morjanoff, P. P. Gray (2004). *Biotechnology & Bioengineering*: 733-741;
- [8] Conversion of Lignocellulosic Biomass to Fuel Ethanol -A Brief Review, Lim Koonong (2004) *The Planet* , 80, pp 517-524;
- [9] Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition (2000). *Bioresource Technology*, Volume 74, Number 1, August 2000 , pp. 25-33(9);
- [10] High cell-density culture of *Escherichia coli*; Sang Yup Lee (1996). *Trends Biotechnol.* 1996 Mar;14(3):98-105.;
- [11] Thermo Scientific, Dionex, Colonne HPLC;
- [12] Thermo Scientific, Dionex, Colonne ICS;
- [13] SCAMBIO IONICO - Università degli Studi dell'Insubria;
- [14] RELITE EXC 14, Resindion s.r.l, scheda tecnica;
- [15] Sanitary Spiral Membranes for Reverse Osmosis PET series, Alfa Laval, scheda tecnica;
- [16] Effect of pressure and pH in ammonium retention for nanofiltration and reverse osmosis membranes to be used in recirculation aquaculture systems (RAS); B. C. Madariagaa, C. F. Hurtadob, R. Ruby (2011). *Aquacultural Engineering*. Volume 45, Issue 3, November 2011, Pages 103–108;
- [17] Membrane e processi a membrana, Aldo Bottino, Università degli studi di Genova;
- [18] Alfa Laval PilotUnit 2.5" RO/NF, Alfa Laval, scheda tecnica;
- [19] <http://www.annualreviews.org/>

3. VALUTAZIONE EFFETTO DELLE SPECIE INIBENTI LA CRESCITA BATTERICA

Nel seguente capitolo vengono illustrate le prove effettuate durante la prima parte dell'attività sperimentale, ovvero le prove relative alla valutazione dell'effetto inibente dovuto alla concentrazione di acido acetico, acido formico e ione potassio all'interno dell'idrolizzato PROESA®, utilizzato come fonte di zuccheri per la crescita di *Escherichia coli* MG1655 all'interno di un terreno composto da M9 ed estratto di lievito (M9YE) in beute da 500 ml con frangiflutti.

L'attività si è svolta elaborando da prima un metodo di indagine efficace. Come già accennato infatti, per valutare l'effetto inibente di ogni singola combinazione di questi tre componenti all'interno del terreno di coltura microbica, sarebbero state necessarie 100 differenti prove, ognuna delle quali effettuata in doppio per permettere una migliore valutazione dei risultati ottenuti. Una simile quantità di elaborati avrebbe richiesto un onere proibitivo. Si è quindi proceduto alla valutazione dell'effetto dei composti inibitori attraverso un numero ridotto prove mirate, che avrebbero permesso di ipotizzare il grado di inibizione qualitativo generale attribuibile ad un componente a differenti concentrazioni, considerando, sia il suo effetto come singolo inibitore, che l'effetto sinergico dovuto alla sua concentrazione in rapporto a concentrazioni differenti degli altri due inibitori in soluzione.

Sono state previste quindi differenti sessioni di prove.

- ✓ 1° sessione: Valutazione dell'effetto dei tre singoli composti inibitori concentrati, in presenza di una concentrazione ridotta degli altri due composti studiati [N° prove 6];
- ✓ 2° sessione: Valutazione dell'effetto della purificazione graduale di acido acetico o di acido formico, mantenendo la concentrazione di potassio costante [N° prove 7];
- ✓ 3° sessione: Verifica delle ipotesi effettuate [N° prove 2];

Elaborando opportunamente i dati ottenuti da queste 15 prove, è stato quindi possibile comprendere l'andamento qualitativo del grado di inibizione attribuibile a tutti gli intervalli di concentrazione, che si era stabilito di indagare.

Per permettere di visualizzare in maniera immediata tali valutazioni, è stata ideata una tabella a tre entrate, sulla quale, per ogni asse, è riportata la concentrazione di un singolo inibitore. Sull'asse sinistro è riportata la concentrazione dell'acido acetico, da 5,58 g/L a 1,12 g/L, sull'asse superiore è riportata la concentrazione dell'acido formico, da 1,74 g/L a 0,35 g/L, mentre sull'asse destro è riportata la concentrazione del potassio,

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

ripetuta nell'intervallo da 6,73 g/L a 1,35 g/L per ogni concentrazione di acido acetico (asse sinistro) valutata.

Nella tabella, lungo gli assi, le concentrazioni dei singoli componenti inibitori sono riportate, oltre che con un valore numerico, anche con una rappresentazione cromatica, che varia, da un blu intenso per il grado di purificazione minimo (0%), al bianco, per un grado di purificazione spinto (80%).

Grado di purificazione	Valore percentuale	Valore cromatico
Assente	0%	
Lieve	30%	
Medio	50%	
Elevato	65%	
Spinto	80%	

Tabella 17: legenda per i gradi di purificazione per acido acetico, acido formico e potassio;

		Acido formico [g/L]						
		1,74	1,39	0,87	0,61	0,35		
Acido acetico [g/L]	5,58	1	5	9	13	17	6,73	Potassio [g/L]
		2	6	10	14	18	5,39	
		3	7	11	15	19	3,37	
		4	8	12	16	20	1,35	
4,46	21	25	29	33	37	6,73		
	22	26	30	34	38	5,39		
	23	27	31	35	39	3,37		
	24	28	32	36	40	1,35		
2,79	41	45	49	53	57	6,73		
	42	46	50	54	58	5,39		
	43	47	51	55	59	3,37		
	44	48	52	56	60	1,35		
1,95	61	65	69	73	77	6,73		
	62	66	70	74	78	5,39		
	63	67	71	75	79	3,37		
	64	68	72	76	80	1,35		
1,12	81	85	89	93	97	6,73		
	82	86	90	94	98	5,39		
	83	87	91	95	99	3,37		
	84	88	92	96	100	1,35		

Tabella 18: Tabella riassuntiva dei gradi di inibizioni dovuti a acido acetico, acido formico e potassio a diverse concentrazioni;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

All'interno delle singole caselle è riportato un numero, con il quale verrà quindi identificata la prova sperimentale, nella quale verranno valutati gli effetti delle concentrazioni dei tre inibitori corrispondenti alla posizione della casella stessa all'interno della tabella.

La tabella così elaborata risulta di facile comprensione, prendendo come esempio la prova numero 26, essa corrisponderebbe ad una crescita con una concentrazione finale di acido acetico di 4,46 g/L, di acido formico di 1,39 g/L e di potassio di 5,39 g/L, ovvero un grado di purificazione (g_p) per acido acetico, acido formico e potassio del 30%.

3.1. Valutazione dell'effetto dei tre singoli composti inibitori concentrati, in presenza di una concentrazione ridotta degli altri due composti studiati

Per una prima valutazione dell'effetto dei tre singoli componenti, sono state effettuate tre prove alle seguenti concentrazioni finali di acido acetico, acido formico e potassio:

- ✓ Prova numero 20: valutazione dell'effetto dell'acido acetico in presenza di una concentrazione ridotta di potassio ed acido formico;
- ✓ Prova numero 84: valutazione dell'effetto dell'acido formico in presenza di una concentrazione ridotta di potassio ed acido acetico;
- ✓ Prova numero 97: valutazione dell'effetto dello ione potassio in presenza di una concentrazione ridotta di acido acetico ed acido formico.

Nella seguente tabella sono riportati i valori degli OD_{600} misurati durante la prova, si tenga presente che a seguito dell'aggiunta della soluzione di inibitori (identificata con una linea rossa), il volume di coltura è aumentato di 12 ml, passando da 100 a 112 ml, i valori riportati in tabella tengono conto quindi di tale diluizione.

[h]	20	84	97
0	0,05	0,05	0,05
2	0,29	0,25	0,23
3,5	1,10	1,08	0,98
4,5	1,11	0,92	1,04
5	1,23	0,93	1,30
6	1,29	1,59	1,98
8	1,32	1,68	2,46
9	1,23	1,65	2,96
24	1,22	2,02	2,66

Tabella 19: Valori dell'OD₆₀₀ per le prove 20, 84 e 97;

Le tre crescite, effettuate nella medesima prova di laboratorio, sono state inoculate con il medesimo OD₆₀₀ di partenza (0,05), raggiungendo il valore di OD₆₀₀, stabilito come soglia per l'aggiunta della soluzioni di inibitori, dopo tre ore e mezzo dall'inizio della crescita.

Nei seguenti grafici viene riportato l'andamento del valore dell'OD₆₀₀ delle singole prove. Al valore della curva di crescita reale (nera) è affiancato il valore della curva considerando un arresto della crescita a seguito dell'addizione della soluzione di inibitori (rossa), così da evidenziare l'area sottesa tra le due curve.

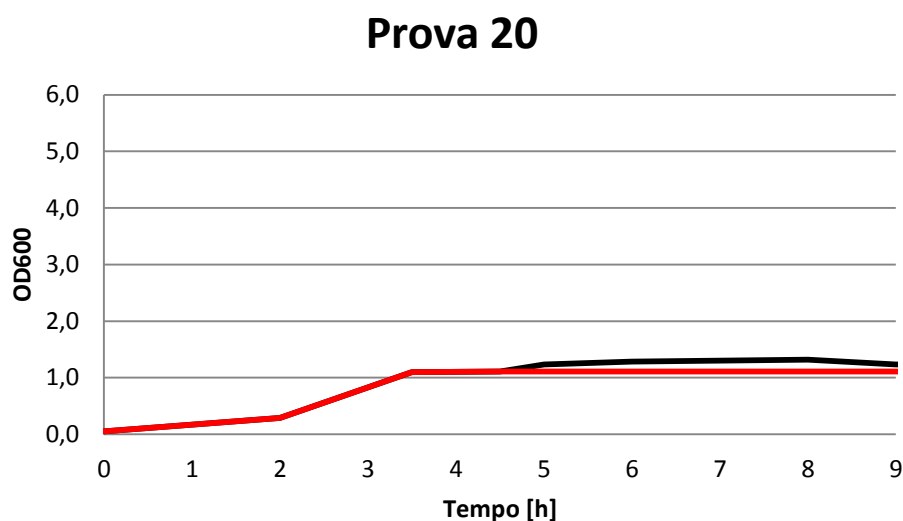


Figura 51: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 20;

Prova 84

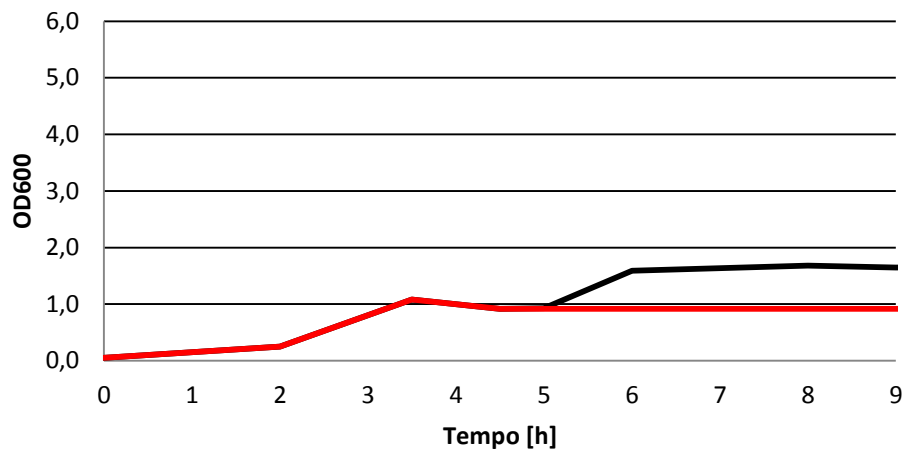


Figura 52: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 84;

Prova 97

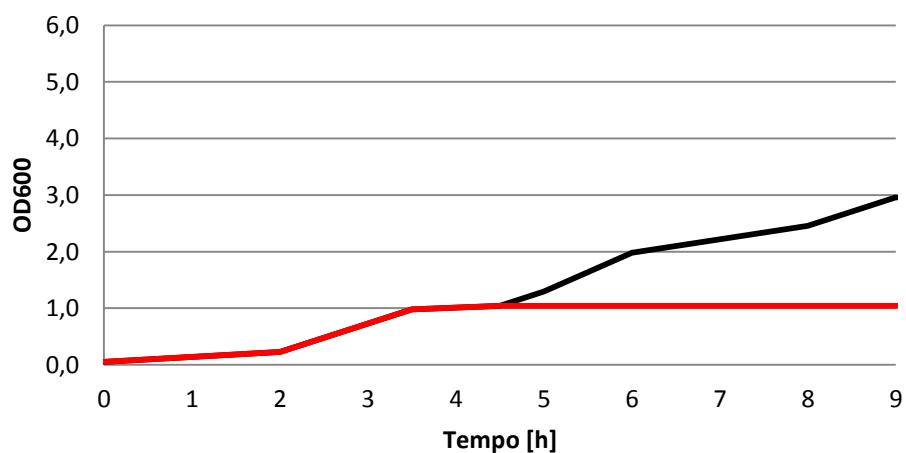


Figura 53: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 97;

Osservando il valore dell' OD₆₀₀ di tutte e tre le prove è facilmente riscontrabile un iniziale fase di latenza a seguito dell'aggiunta della soluzione di inibitori. Al termine della fase di latenza si ha quindi una breve fase di crescita, meno accentuata nella prova numero 20, mediocre nella prova numero 84 e significativa nella prova 97.

Nella seguente tabella si osservano quindi i valori relativi alla velocità di crescita ed all' OD₆₀₀ massimo raggiunto nelle tre prove:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

	20	84	97
velocità [1/h]	0,09	0,36	0,43
OD ₆₀₀ max	1,32	2,02	2,96

Tabella 20: Velocità ed OD600 max per le prove 20, 84 e 97;

Il valore dell'area sottesa dalle tre curve in relazione ad un arresto completo della crescita è riportato nella seguente tabella, dove, a tale valore, viene correlato anche un grado di inibizione ed un valore cromatico, riportato successivamente nella tabella riassuntiva al termine di questo capitolo.

Prova	Valore numerico [ODxs]	Grado inibizione	Valore cromatico
20	2,224	elevata	
84	16,215	moderata	
97	31,234	lieve	

Tabella 21: tabella riassuntiva dei risultati della sessione di prove;

Da questa prima sessione di prove quindi, valutando l'effetto della concentrazione dei singoli componenti inibitori in sinergia con una bassa concentrazione degli altri due composti studiati, è possibile notare come, in relazione alle concentrazioni riscontrabili in un processo di fermentazione, l'effetto della concentrazione elevata di acido acetico (prova 20) sia marcatamente maggiore di quello dell'acido formico (prova 84), mentre un'elevata concentrazione di potassio (prova 97), in sinergia con una bassa concentrazione di acidi organici, mostra solo una *lieve* inibizione.

A seguito dei risultati ottenute dalle prime prove sperimentali, che hanno evidenziato il grado di inibizione dovuto ai tre composti nella crescita microbica di *Escherichia coli* MG1655, sono state elaborate altre tre prove, attraverso le quali si è cercato di comprendere l'effetto di una notevole variazione nella concentrazione di uno dei composti inibitore studiati (g_p 65%), mantenendo la concentrazione degli altri due inibitori al massimo grado di purificazione studiato (g_p 80%). Sono state effettuate quindi tre prove alle seguenti concentrazioni finali di acido acetico, acido formico e potassio:

- ✓ Prova numero 96: con riferimento alla prova 84, viene effettuata la valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido formico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 0 al 65%;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Prova numero 80: con riferimento alla prova 20, viene effettuata la valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido acetico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 0 al 65%;
- ✓ Prova numero 99: con riferimento alla prova 97, viene effettuata la valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da potassio, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 0 al 65%;

Nella seguente tabella sono riportati i valori degli OD₆₀₀ misurati durante la prova.

[h]	96	[h]	80	[h]	99
0	0,30	0	0,30	0	0,30
1,5	1,15	1,5	1,10	1	0,62
2,5	0,93	2,5	0,81	2	1,22
3,5	1,41	3,5	0,93	3	1,04
5	2,48	5	1,59	4	1,34
6	3,03	6	1,80	5,5	2,09
7	3,20	7	1,65	6,5	2,62
9	3,22	9	2,14	7,5	2,80
24	3,21	24	2,63	8,5	2,96
				9,5	2,66
				24	3,56

Tabella 22: Valori dell'OD₆₀₀ per le prove 96, 80 e 99;

Le tre crescite, effettuate in due differenti prove di laboratorio, sono state inoculate con il medesimo OD₆₀₀ di partenza (0,30), le colture batteriche delle prove 96 e 80 hanno raggiunto la soglia del valore di OD₆₀₀ imposto dopo un'ora e mezzo dall'inizio della crescita, mentre la coltura della prova 99 ha impiegato circa due ore.

Nei seguenti grafici viene riportato l'andamento del valore dell'OD₆₀₀ delle singole prove. Al valore della curva di crescita reale (nera) è affiancato il valore della curva considerando un arresto della crescita a seguito dell'aggiunta della soluzione di inibitori (rossa), così da evidenziare l'area sottesa tra le due curve.

Prova 96

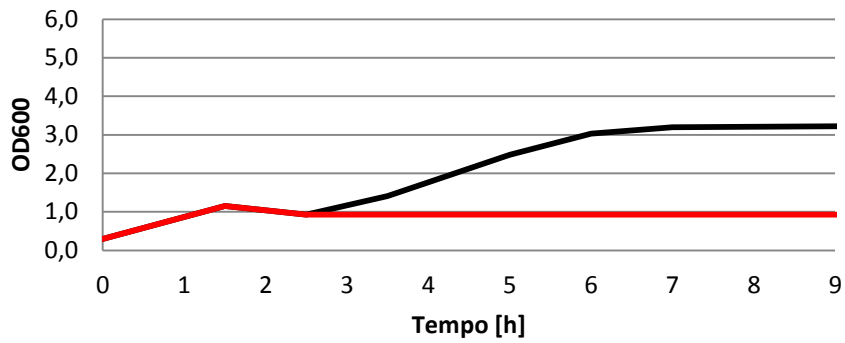


Figura 54: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 96;

Prova 80

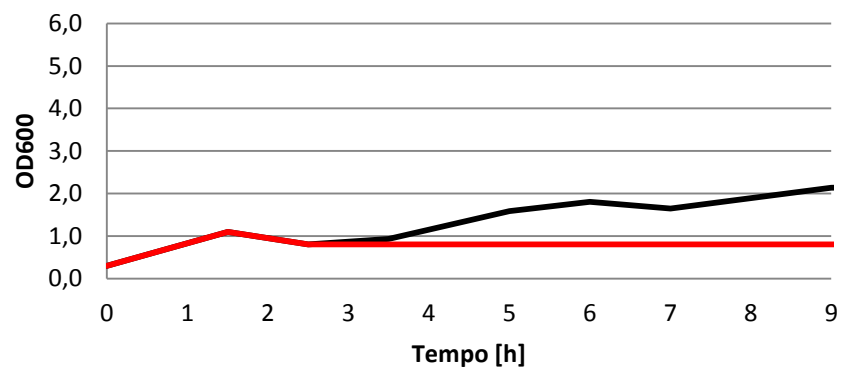


Figura 55: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 80;

Prova 99

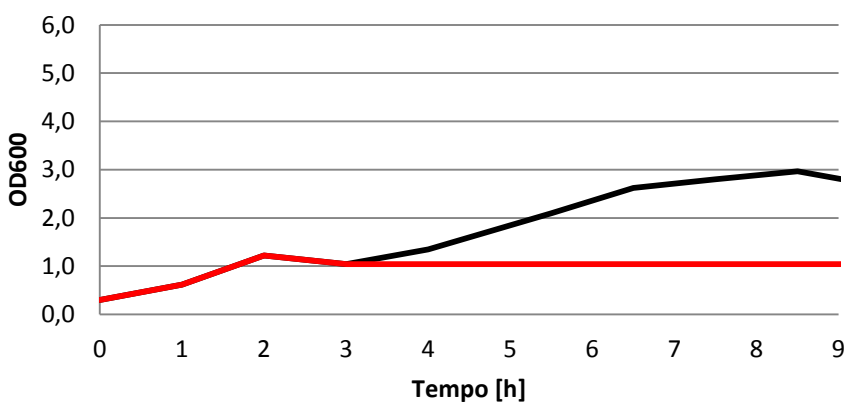


Figura 56: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 99;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Osservando il valore dell' OD₆₀₀ della tre prove si riscontra un breve fase di latenza a seguito dell'aggiunta della soluzione di inibitori, al termine della quale si verifica una notevole fase di crescita, che raggiunge lo stazionario dopo circa 9 ore. Per effettuare un ulteriore paragone si confrontano quindi i valori relativi all' OD₆₀₀ massimo raggiunto e alla velocità di crescita delle tre prove:

	96	80	99
velocità [1/h]	0,34	0,23	0,26
OD ₆₀₀ max	3,22	2,63	3,56

Tabella 23: Velocità ed OD600 max per le prove 20, 84 e 97;

Il valore dell'area sottesa dalle tre curve in relazione ad un arresto completo della crescita è riportato nella seguente tabella, dove, a tale valore, viene correlato anche un grado di inibizione ed un valore cromatico, riportato successivamente nella tabella riassuntiva al termine di questo capitolo.

Prova	Valore numerico [ODxs]	Grado inibizione	Valore cromatico
96	44,547	lieve	
80	28,412	lieve	
99	37,724	lieve	

Tabella 24: tabella riassuntiva dei risultati della sessione di prove;

Da questa sessione di prove quindi, valutando l'effetto della purificazione di acido acetico, acido formico e potassio in presenza di una concentrazione ridotta degli altri due inibitori testati, è possibile notare come:

- ✓ La riduzione della concentrazione di acido formico da 1,74 g/L (prova 84) a 0,61 g/L (prova 96) comporti un notevole miglioramento nella resa di massa cellulare, portando il grado di inibizione a ridursi da *elevato* a *lieve*;
- ✓ La riduzione della concentrazione di acido acetico da 5,58 g/L (prova 20) a 1,12 g/L (prova 80) comporti un evidente miglioramento nella resa di massa cellulare, portando il grado di inibizione a ridursi da *moderato* a *lieve*;
- ✓ La riduzione della concentrazione di potassio da 6,73 g/L (prova 97) a 1,35 g/L (prova 99) non comporti effettivamente un miglioramento nella resa di massa cellulare, il grado di inibizione già *lieve* non subisce un'effettiva variazione, migliorando in maniera solo marginale le prestazioni della coltura batterica;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

In seguito ai risultati ottenuti da queste tre prove è stato possibile riscontrare come una uguale riduzione percentuale di acido acetico e acido formico porti a risultati notevolmente differenti rispetto a quanto precedentemente ipotizzato. Una riduzione spinta di acido formico (grado di purificazione 65%) infatti porta a risultati notevolmente migliori rispetto ad una uguale riduzione percentuale della concentrazione di acido acetico (grado di purificazione 65%).

Sebbene in assenza di purificazione la notevole quantità di acido acetico presente all'interno dell'idrolizzato PROESA® possa effettivamente contribuire in maniera significativa all'inibizione della crescita del microrganismo, in ragione della progettazione di un processo di purificazione la riduzione della concentrazione di acido formico fornisce risultati migliori di un processo analogamente efficace (in relazione alla percentuale della concentrazione di inibitore rimosso) per la rimozione di acido acetico.

3.2.Valutazione dell'effetto della purificazione graduale di acido acetico o di acido formico, mantenendo la concentrazione di potassio costante

Nella prima sessione di prove si è voluto testare l'effetto di un'unica specie inibente in presenza di una concentrazione ridotta degli altri inibitori studiati all'interno di questo elaborato, è tuttavia facilmente comprensibile come la presenza di due inibitori ad elevata concentrazione porti ad ottenere un effetto complessivo superiore rispetto a quello che si potrebbe ottenere dalla semplice sovrapposizione degli effetti dei due inibitori presi singolarmente in due prove distinte (effetto sinergico).

Per comprendere l'effetto di concentrazioni consistenti dei tre inibitori, dei quali si è deciso di studiare l'effetto, è stata quindi elaborata una seconda sessione di prove in cui, a concentrazioni costanti di potassio è stato verificato l'effetto di una lieve riduzione della concentrazione di acido formico o acido acetico, così da poter meglio comprendere l'effetto dei due acidi organici sulla resa cellulare del processo di crescita di *Escherichia coli* MG1655 a concentrazioni elevate. Tale scelta è stata condotta in relazione ai risultati ottenuti nella prima sessione di prove, dove si è verificato come una riduzione marcata di potassio porti ad effetti meno consistenti della riduzione di uno dei due acidi organici. Sono state effettuate quindi diverse prove alle seguenti concentrazioni finali di acido acetico, acido formico e potassio:

- ✓ Prova numero 49: prova di riferimento per le deduzioni relative all'effetto di una lieve riduzione della concentrazione di acido formico o acido acetico, mantenendo costante la concentrazione di potassio a 6,73 g/L;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Prova numero 45: valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido formico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 30 al 50%;
- ✓ Prova numero 29: valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido acetico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 30 al 50%.

Nella seguente tabella sono riportati i valori degli OD₆₀₀ misurati durante la prova.

[h]	49	45	29
0	0,10	0,10	0,10
1	0,27	0,22	0,23
2	0,38	0,41	0,38
3,5	1,27	1,35	1,16
4,5	1,10	1,09	1,11
5,2	1,11	1,09	1,00
7	1,32	1,21	1,16
8	1,19	1,14	1,12
8,5	1,19	1,16	1,14
24	1,21	1,28	1,28

Tabella 25: Valori dell'OD₆₀₀ per le prove 49, 45 e 29;

Le tre crescite, effettuate in un'unica prove di laboratorio, sono state inoculate con il medesimo OD₆₀₀ di partenza (0,10), le colture batteriche delle tre prove hanno raggiunto la soglia del valore di OD₆₀₀ imposto dopo tre ore e mezzo dall'inizio della crescita.

Nei seguenti grafici viene riportato l'andamento del valore dell'OD₆₀₀ delle singole prove.

Prova 49

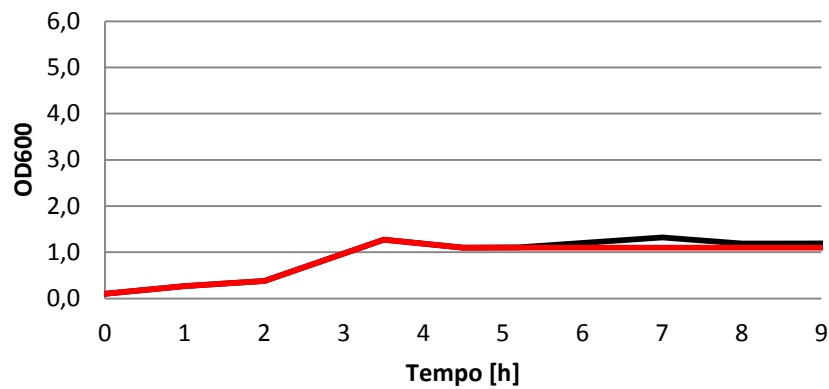


Figura 57: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 49;

Prova 45

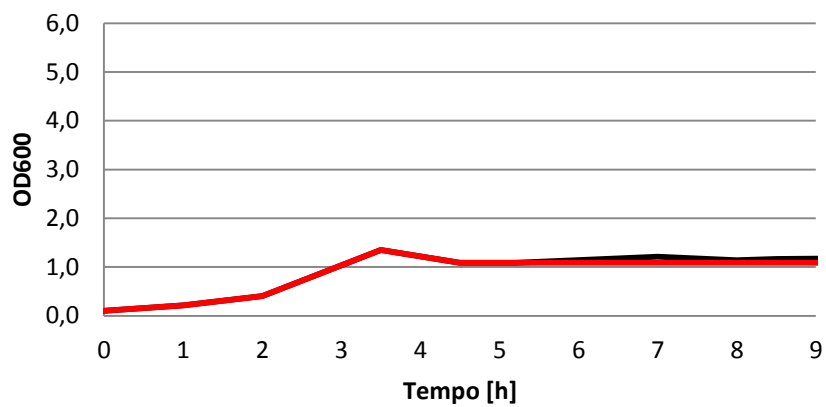


Figura 58: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 45;

Prova 29

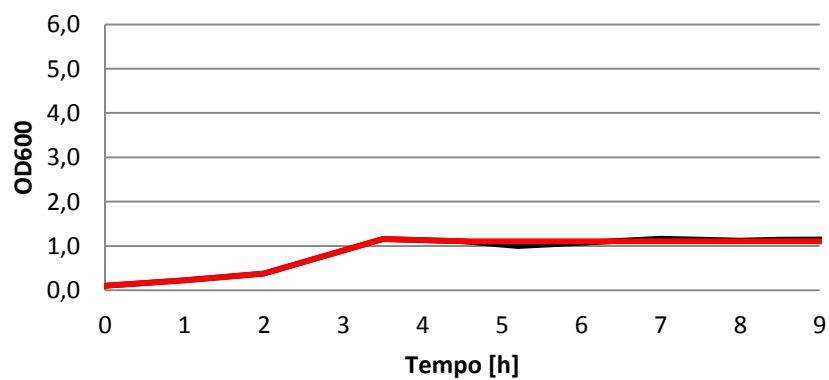


Figura 59: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 29;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Osservando il valore dell' OD₆₀₀ delle tre prove, si nota come, a seguito dell'addizione della soluzione degli inibitori, la crescita venga completamente inibita e si riscontri quindi un arresto completo della crescita microbica.

Il valore dell'area sottesa dalle tre curve in relazione ad un arresto completo della crescita è riportato nella seguente tabella, dove, a tale valore, viene correlato anche un grado di inibizione ed un valore cromatico, riportato successivamente nella tabella riassuntiva al termine di questo capitolo.

Prova	Valore numerico [ODxs]	Grado inibizione	Valore cromatico
49	1,761	non accettabile	
45	1,765	non accettabile	
29	1,518	non accettabile	

Tabella 26: tabella riassuntiva dei risultati della sessione di prove;

Da questa sessione di prove quindi, valutando l'effetto della purificazione di acido formico e acido acetico in presenza di una concentrazione elevata di potassio (6,73 g/L), è possibile notare come sia la riduzione della concentrazione di acido formico da 1,39 g/L (prova 45) a 0,87 g/L (prova 49), sia la riduzione della concentrazione di acido acetico da 4,46 g/L (prova 29) a 2,79 g/L (prova 49) non comportino alcuna variazione nel grado di inibizione dovuto alla soluzione di inibitori aggiunta, già nella prova con entrambi gli acidi organici a concentrazione ridotta, acido formico 0,87 g/L e acido acetico 2,29 g/L, infatti il grado di inibizione è *non accettabile*.

In seguito ai risultati ottenuti da queste tre prove è stato possibile ipotizzare che, in presenza di una concentrazione elevata di potassio (6,73 g/L), a concentrazioni di acido acetico ed acido formico superiori a 2,79 g/L e 0,87 g/L rispettivamente, il livello di inibizione apportato da tali componenti alla crescita risulta *non accettabile*.

A seguito delle deduzioni ottenute nelle precedenti prove sperimentali, che hanno evidenziato i limiti di tolleranza dell'acido acetico e dell'acido formico nella crescita microbica di *Escherichia coli* MG1655 ad una concentrazione di potassio di 6,73 g/L, è stata elaborata una sessione di prove, in cui, riducendo la concentrazione di potassio a 5,39 g/L, è stato valutato l'effetto della riduzione della concentrazione finale dei due acidi organici. Sono state effettuate quindi quattro prove alle seguenti concentrazioni finali di acido acetico, acido formico e potassio:

- ✓ Prova numero 50: prova di riferimento per le deduzioni relative all'effetto di una lieve purificazione di acido formico e acido acetico, mantenendo costante la concentrazione di potassio a 5,39 g/L;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Prova numero 54: valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido formico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 50 al 65%;
- ✓ Prova numero 70: valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido acetico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 50 al 65%;
- ✓ Prova numero 74: valutazione dell'effetto della purificazione dell'idrolizzato PROESA® da acido acetico ed acido formico, in ragione di una variazione del grado di purificazione dal 50 al 65%.

Nella seguente tabella sono riportati i valori degli OD₆₀₀ misurati durante la prova, si tenga presente che a seguito dell'aggiunta della soluzione di inibitori (identificata con una linea rossa), il volume di coltura è aumentato di 12 ml, passando da 100 a 112 ml, i valori riportati in tabella tengono conto quindi di tale diluizione.

[h]	50	[h]	54	[h]	70	[h]	74
0	0,30	0	0,30	0	0,30	0	0,30
1	0,68	2	1,42	2	1,29	2	1,38
2	1,41	3	0,96	3	0,94	3	1,01
3	0,92	4	1,02	4	0,99	4	1,03
4	0,90	4,7	1,01	4,7	1,02	4,7	1,09
5,5	0,91	6	1,05	6	1,05	6	1,11
6,5	0,94	7,5	1,02	7,5	1,04	7,5	1,12
7,5	0,77	9	1,03	9	1,05	9	1,17
8,5	0,88	24	1,17	24	1,18	24	1,23
9,5	0,88						
24	0,91						

Tabella 27: Valori dell'OD₆₀₀ per le prove 50, 54, 70 e 74;

Le quattro crescite, effettuate in due differenti prove di laboratorio, sono state inoculate con il medesimo OD₆₀₀ di partenza (0,30), raggiungendo la soglia del valore di OD₆₀₀ imposto dopo 2 ore dall'inizio della crescita.

Nei seguenti grafici viene riportato l'andamento del valore dell'OD₆₀₀ delle singole prove.

Prova 50

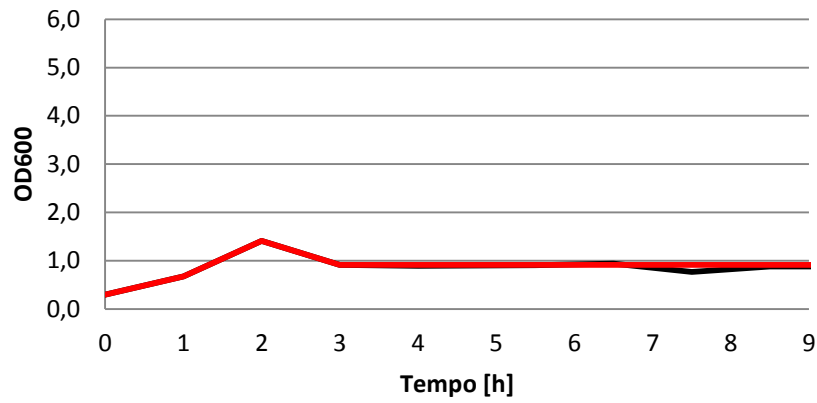


Figura 60: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 50;

Prova 54

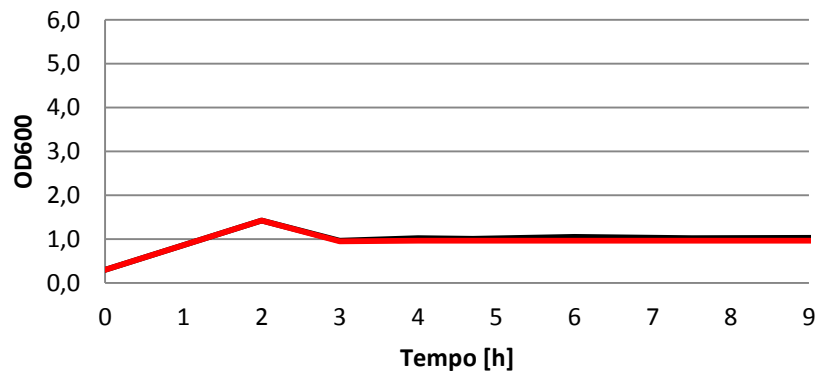


Figura 61: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 54 ;

Prova 70

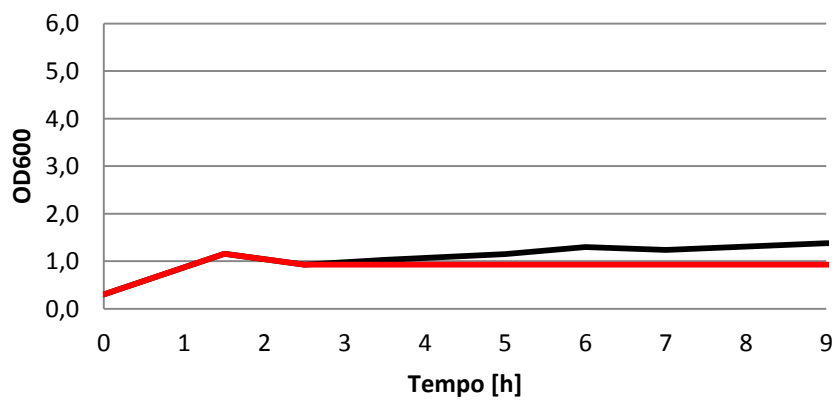


Figura 62: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 70;

Prova 74

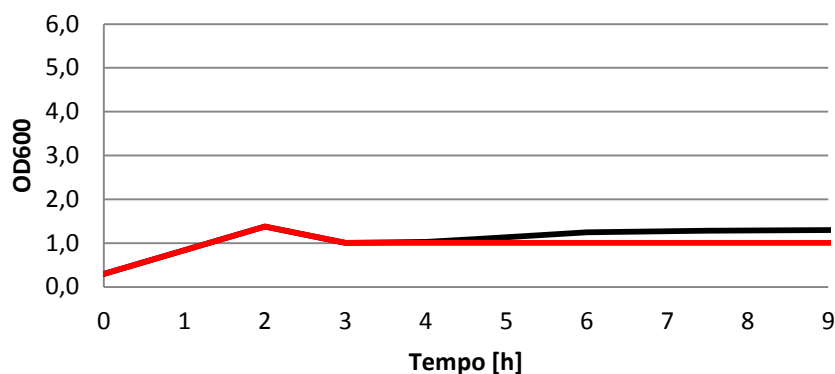


Figura 63: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 74;

Osservando il valore dell' OD₆₀₀ della quattro prove si nota come a seguito di un breve periodo di latenza la prova 50 subisca un arresto completo della crescita, mentre le restanti tre prove mostrano un livello di inibizione meno elevato. Nella seguente tabella vengono quindi confrontati i valori relativi alla velocità di crescita e dell' OD₆₀₀ massimo raggiunto nelle tre prove.

	50	54	70	74
velocità [1/h]	0,00	0,01	0,04	0,03
OD ₆₀₀ max	0,94	1,17	1,18	1,23

Tabella 28: velocità di crescita ed OD600 massimo per le prove 50, 54, 70 e 74;

Il valore dell'area sottesa dalle tre curve in relazione ad un arresto completo della crescita è riportato nella seguente tabella, dove, a tale valore, viene correlato anche un grado di inibizione ed un valore cromatico, riportato successivamente nella tabella riassuntiva al termine di questo capitolo.

Prova	Valore numerico [ODxs]	Grado inibizione	Valore cromatico
50	0,540	non accettabile	
54	2,410	elevata	
70	3,112	elevata	
74	3,426	elevata	

Tabella 29: tabella riassuntiva dei risultati della sessione di prove;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Da questa sessione di prove quindi, valutando l'effetto della purificazione di acido formico e acido acetico in presenza di una concentrazione moderata di potassio (5,39 g/L), è possibile notare come:

- ✓ La riduzione della concentrazione di acido acetico da 2,97 g/L a 1,95 g/L (prova 70) comporti una moderata variazione nel grado di inibizione della soluzione di inibitori aggiunta, portando il grado di inibizione da *non accettabile* a *elevato*;
- ✓ La riduzione della concentrazione di acido formico da 0,87 g/L a 0,61 g/L (prova 54) comporti una lieve variazione nel grado di inibizione della soluzione di inibitori aggiunta, portando il grado di inibizione da *non accettabile* a *elevato*, ottenendo tuttavia risultati meno significativi della riduzione dell'acido acetico in ragione del medesimo grado di purificazione raggiunto;
- ✓ La riduzione della concentrazione di acido acetico da 2,97 g/L a 1,95 g/L e di acido formico da 0,87 g/L a 0,61 g/L (prova 74) comporti una moderata variazione nel grado di inibizione della soluzione di inibitori aggiunta, portando il grado di inibizione da *non accettabile* a *elevato*, ottenendo tuttavia risultati comparabili a quelli ottenuti con la sola riduzione della concentrazione di acido acetico in ragione del medesimo grado di purificazione raggiunto;

In seguito ai risultati ottenuti da queste quattro prove è stato possibile dare un'ulteriore conferma del limite di tolleranza del microrganismo *Escherichia coli* per gli acidi organici, che, anche in presenza di una concentrazione di potassio di 5,39 g/L, risulta di una concentrazione massima tollerabile per l'acido acetico di 2,79 g/L e per l'acido formico di 0,87 g/L .

È stato inoltre confermato che una riduzione moderata della concentrazione di potassio non comporta un effettivo beneficio in termini di resa di massa cellulare, qualora la concentrazione di acidi organici superi tali limiti di tolleranza.

Confrontando i risultati relativi alla riduzione della concentrazione di acido formico ed acido acetico inoltre, viene ulteriormente confermata l'ipotesi fatta nella sessione di prove precedente, ovvero come ad una concentrazione elevata di acido acetico la riduzione dell'acido formico non dia effettivamente un beneficio notevole sul grado di inibizione.

3.3.Verifica delle ipotesi effettuate

Grazie ai dati raccolti nelle precedenti sessioni di prove, è stato possibile effettuare alcune importanti deduzioni riguardo agli effetti della concentrazione di acido acetico, acido formico e potassio all'interno del terreno di crescita di *Escherichia coli* MG1655.

I risultati ottenuti dalle prove sperimentali sono stati quindi riportati nella tabella dei gradi di inibizione presentata all'inizio di questo capitolo:

		Acido formico [g/L]						
		1,74	1,39	0,87	0,61	0,35		
Acido acetico [g/L]	5,58	1	5	9	13	17	6,73	Potassio [g/L]
		2	6	10	14	18	5,39	
		3	7	11	15	19	3,37	
		4	8	12	16	20	1,35	
	4,46	21	25	29	33	37	6,73	
		22	26	30	34	38	5,39	
		23	27	31	35	39	3,37	
		24	28	32	36	40	1,35	
	2,79	41	45	49	53	57	6,73	
		42	46	50	54	58	5,39	
		43	47	51	55	59	3,37	
		44	48	52	56	60	1,35	
	1,95	61	65	69	73	77	6,73	
		62	66	70	74	78	5,39	
		63	67	71	75	79	3,37	
		64	68	72	76	80	1,35	
	1,12	81	85	89	93	97	6,73	
		82	86	90	94	98	5,39	
		83	87	91	95	99	3,37	
		84	88	92	96	100	1,35	

Tabella 30: Tabella riassuntiva dei gradi di inibizione dovuti ad acido acetico, acido formico e ione potassio a diverse concentrazioni;

Per verificare quindi l'effettiva esaustività dell'indagine condotta sino a questo momento, sono state elaborate altre due prove, con il preciso intento di valutare la veridicità delle ipotesi effettuate sino a questo momento in base ai dati sperimentali raccolti.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Si è quindi deciso di effettuare due differenti prove alle seguenti concentrazioni finali di acido acetico, acido formico e potassio:

- ✓ Prova numero 51: l'indagine di questa prova punta a verificare che anche riducendo ulteriormente la concentrazione di potassio presente all'interno del terreno di crescita (prova di riferimento 50), la concentrazione elevata di acidi organici non comporti un effettivo beneficio e non alteri quindi il grado di inibizione. Grado di inibizione atteso *non accettabile*;
- ✓ Prova numero 76: l'indagine di questa prova punta a verificare che riducendo la concentrazione di acido formico presente all'interno del terreno di crescita (prova di riferimento 80), in presenza di acido acetico a basse concentrazioni (inferiore a 2,79), si riscontra un significativo beneficio in relazione al grado di inibizione. Grado di inibizione atteso *moderato*.

Nella seguente tabella sono riportati i valori degli OD₆₀₀ misurati durante la prova.

[h]	51	[h]	76
0	0,30	0	0,300
1	0,61	1,5	1,160
2	1,27	2,5	0,930
3	0,81	3,5	1,030
4	0,83	5	1,150
5,5	0,82	6	1,299
6,5	0,75	7	1,238
7,5	0,83	9	1,378
8,5	0,83	24	1,344
9,5	0,81		
24	0,86		

Tabella 31: Valori dell'OD₆₀₀ per le prove 51 e 76;

Le due crescite, effettuate in un due prove di laboratorio differenti, sono state inoculate con il medesimo OD₆₀₀ di partenza (0,30), le colture batteriche della prova 51 ha raggiunto la soglia del valore di OD₆₀₀ imposto dopo due ore, mentre la prova 76 ha raggiunto la soglia del valore di OD₆₀₀ imposto dopo un ora e mezzo dall'inizio della crescita.

Nei seguenti grafici viene riportato l'andamento del valore dell'OD₆₀₀ delle singole prove.

prova 51

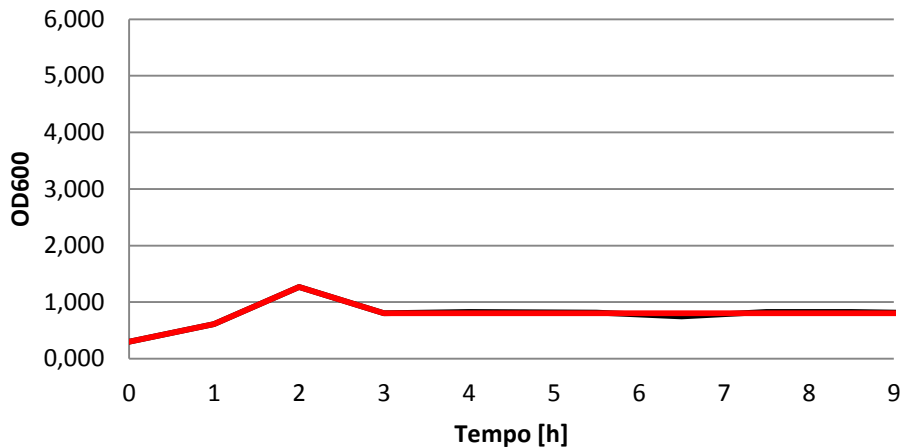


Figura 64: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 51;

Osservando il valore dell' OD₆₀₀ della prova numero 51 è facilmente riscontrabile un completo arresto della crescita a seguito dell'addizione della soluzione di inibitori, un risultato del tutto analogo a quello ottenuto nelle prove di riferimento (50 e 49).

La velocità di crescita calcolata tra le 3 e le 6 ore risulta nulla. La popolazione batterica raggiunge un valore massimo di OD₆₀₀ di 0,86.

Prova 76

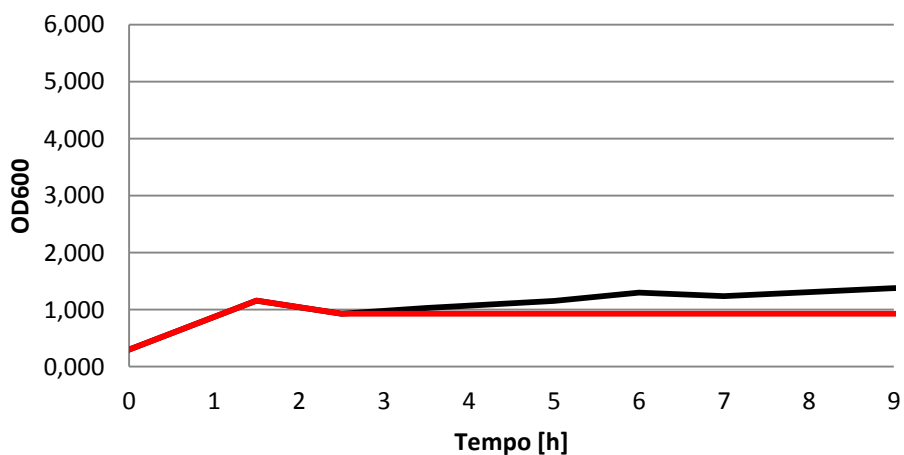


Figura 65: Andamento dell'OD₆₀₀ durante la crescita della prova 76;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Osservando il valore dell' OD_{600} della prova numero 76 è facilmente riscontrabile un breve fase di latenza a seguito dell'aggiunta della soluzione di inibitori, al termine della quale si verifica una lieve fase di crescita.

La velocità di crescita calcolata tra le 3 e le 6 ore risulta 0,10 [1/h]. La popolazione batterica raggiunge un valore massimo di OD_{600} di 1,37.

Il valore dell'area sottesa dalle tre curve in relazione ad un arresto completo della crescita è riportato nella seguente tabella, dove, a tale valore, viene correlato anche un grado di inibizione ed un valore cromatico, riportato successivamente nella tabella riassuntiva al termine di questo capitolo.

Prova	Valore numerico [ODxs]	Grado inibizione	Valore cromatico
51	0,437	non accettabile	
76	8,149	moderato	

Tabella 32: tabella riassuntiva dei risultati della sessione di prove;

Il grado di inibizione riscontrato nelle due prove è quello previsto in base alle deduzioni fatte grazie alle prove sperimentali precedenti, è quindi lecito utilizzare le deduzioni ottenute per ipotizzare l'andamento del grado di inibizione negli intervalli di concentrazione di acido acetico, acido formico e potassio che non si sono potuti verificare tramite prove sperimentali.

3.4. Valutazioni finali sull'effetto della concentrazione di acido acetico, acido formico e potassio sulla resa cellulare

Per meglio comprendere le ipotesi e le deduzioni che verranno esposte in questo paragrafo è bene osservare nuovamente la tabella dei gradi di inibizione, aggiornata con i risultati ottenuti nelle ultime due prove effettuate.

		Acido formico [g/L]					Potassio [g/L]
		1,74	1,39	0,87	0,61	0,35	
Acido acetico [g/L]	5,58	1	5	9	13	17	6,73
		2	6	10	14	18	5,39
		3	7	11	15	19	3,37
		4	8	12	16	20	1,35
4,46	21	25	29	33	37	6,73	
	22	26	30	34	38	5,39	
	23	27	31	35	39	3,37	
	24	28	32	36	40	1,35	
2,79	41	45	49	53	57	6,73	
	42	46	50	54	58	5,39	
	43	47	51	55	59	3,37	
	44	48	52	56	60	1,35	
1,95	61	65	69	73	77	6,73	
	62	66	70	74	78	5,39	
	63	67	71	75	79	3,37	
	64	68	72	76	80	1,35	
1,12	81	85	89	93	97	6,73	
	82	86	90	94	98	5,39	
	83	87	91	95	99	3,37	
	84	88	92	96	100	1,35	

Tabella 33: Tabella riassuntiva dei gradi di inibizioni dovuti a acido acetico, acido formico e potassio a diverse concentrazioni (dati sperimentali);

Dalle prove sperimentali effettuate durante la prima fase sperimentale di questo elaborato è possibile effettuare le seguenti deduzioni:

- ✓ Il grado di inibizione risulta *non accettabile* quando la concentrazione di acido acetico ed acido formico supera rispettivamente i valori di soglia di 2,79 g/L e 0,87 g/L;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Il grado di inibizione non risulta influenzato dalla concentrazione di potassio quando almeno la concentrazione di uno degli acidi organici supera i valori di soglia (2,79 g/L per l'acido acetico e 0,87 g/L per l'acido formico). Mentre l'effetto della concentrazione del potassio sembra più evidente quando la concentrazione di acido acetico è inferiore a 1,95 g/L o la concentrazione di acido formico è inferiore a 0,61 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta *elevato* a concentrazione di potassio di 1,35 g/L, di acido acetico di 1,95 g/L ed a concentrazioni di acido formico superiori a 0,61 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta variare tra *lieve* e *moderato* a concentrazione di potassio di 1,35 g/L, di acido acetico di 1,12 g/L ed a concentrazioni di acido formico superiori a 0,61 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta *non accettabile* a concentrazione di potassio di 5,39 g/L, di acido acetico di 1,95 g/L ed a concentrazioni di acido formico superiori a 0,87 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta variare tra *elevato* e *moderato* a concentrazione di potassio di 1,35 g/L, di acido formico di 0,35 g/L ed a concentrazioni di acido acetico superiori a 1,95 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta *non accettabile* a concentrazione di potassio di 5,39 g/L, di acido formico di 0,61 g/L ed a concentrazioni di acido acetico superiori a 2,79 g/L;

Nella seguente tabella vengono quindi riportati i risultati relativi alle deduzioni appena espresse, utilizzando la seguente valutazione cromatica:

	Grado di inibizione	Valore cromatico
sperimentale	lieve inibizione	
	inibizione moderata	
	inibizione elevata	
	inibizione non accettabile	
ipotesi	lieve inibizione	
	inibizione moderata	
	inibizione elevata	
	inibizione non accettabile	

Tabella 34: Legenda relativa al valore cromatico dei gradi di inibizione per prove sperimentali e ipotesi effettuate;

Acido formico [g/L]

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		1,74	1,39	0,87	0,61	0,35	
Acido acetico [g/L]	5,58	1	5	9	13	17	Potassio [g/L] 6,73
		2	6	10	14	18	5,39
		3	7	11	15	19	3,37
		4	8	12	16	20	1,35
4,46	21	25	29	33	37	6,73	
	22	26	30	34	38	5,39	
	23	27	31	35	39	3,37	
	24	28	32	36	40	1,35	
2,79	41	45	49	53	57	6,73	
	42	46	50	54	58	5,39	
	43	47	51	55	59	3,37	
	44	48	52	56	60	1,35	
1,95	61	65	69	73	77	6,73	
	62	66	70	74	78	5,39	
	63	67	71	75	79	3,37	
	64	68	72	76	80	1,35	
1,12	81	85	89	93	97	6,73	
	82	86	90	94	98	5,39	
	83	87	91	95	99	3,37	
	84	88	92	96	100	1,35	

Tabella 35: Tabella riassuntiva dei gradi di inibizioni dovuti a acido acetico, acido formico e potassio a diverse concentrazioni (dati sperimentali ed ipotesi);

Dalle semplici ipotesi effettuate sulle prove sperimentali eseguite, comparando tra loro i risultati ottenuti e le deduzioni derivate dalle stesse, è stato quindi possibile attribuire un grado di inibizione a gran parte degli intervalli di concentrazione di acido acetico, acido formico e potassio che si era prefisso di indagare.

Sulla base quindi delle medesime ipotesi, basate tuttavia ora sui deduzioni e non su vere prove sperimentali, è possibile attribuire anche agli intervalli di concentrazione rimasti un grado di inibizione ipotetico, che tuttavia hanno un incertezza maggiore.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		Acido formico [g/L]						
		1,74	1,39	0,87	0,61	0,35		
Acido acetico [g/L]	5,58	1	5	9	13	17	6,73	Potassio [g/L]
		2	6	10	14	18	5,39	
		3	7	11	15	19	3,37	
		4	8	12	16	20	1,35	
	4,46	21	25	29	33	37	6,73	
		22	26	30	34	38	5,39	
		23	27	31	35	39	3,37	
		24	28	32	36	40	1,35	
	2,79	41	45	49	53	57	6,73	
		42	46	50	54	58	5,39	
		43	47	51	55	59	3,37	
		44	48	52	56	60	1,35	
	1,95	61	65	69	73	77	6,73	
		62	66	70	74	78	5,39	
		63	67	71	75	79	3,37	
		64	68	72	76	80	1,35	
	1,12	81	85	89	93	97	6,73	
		82	86	90	94	98	5,39	
		83	87	91	95	99	3,37	
		84	88	92	96	100	1,35	

Tabella 36: Tabella riassuntiva dei gradi di inibizioni dovuti a acido acetico, acido formico e potassio a diverse concentrazioni (dati sperimentali ed ipotesi);

L'importanza della tabella sopra riportata è facilmente comprensibile qualora si rifletta allo scopo di questo elaborato, ovvero progettare un sistema di purificazione per un idrolizzato, da biomasse di seconda generazione, al fine di migliorare la resa cellulare dei processi di crescita microbica.

Osservando la tabella, completa di tutti i gradi di inibizione relativi alle concentrazioni indagate, è infatti possibile individuare quali sono le caratteristiche necessarie per un sistema di purificazione, che consenta di ottenere un effettivo beneficio nel processo di crescita in bioreattore.

4. PURIFICAZIONE DELL'IDROLIZZATO PROESA®

Attraverso l'indagine effettuata nel capitolo precedente è possibile comprendere quale sarebbe l'effettivo beneficio di un sistema di purificazione conoscendone semplicemente le caratteristiche principali, ovvero con quale "grado di purificazione" si riduce la concentrazione di uno o più dei composti inibenti indagati all'interno di questo elaborato. Tale conoscenza può derivare da uno studio a livello di letteratura, con la dovuta approssimazione, oppure da test sperimentali a livello di laboratorio.

Prendendo come esempio alcuni sistemi di purificazione presenti all'interno dei laboratori di ricerca della Biochemtex Italia, la maggior parte dei quali effettivamente testati sull'idrolizzato PROESA® utilizzato in questo elaborato, è possibile comprendere in maniera più efficace in che modo:

- ✓ Resina di addolcimento: All'interno dei laboratori di catalisi è stata testata una resina di addolcimento denominata EXA 265 prodotta dalla Resindion s.r.l. sull'idrolizzato PROESA®. Questo tipo di resine mostra una maggiore affinità per ioni bivalenti come calcio (Ca^{2+}) e magnesio (Mg^{2+}) rispetto a quella per gli ioni monovalenti come il potassio (K^+). Utilizzando questo tipo di resina quindi si è ottenuta solamente una lieve riduzione della concentrazione di potassio (g_p 8%), lasciando pressoché inalterata la concentrazione degli acidi organici (g_p circa 0%). Riportando tale risultato sulla tabella dei gradi di inibizione in relazione alla concentrazione degli inibitori, si otterrebbe un grado di inibizione *non accettabile*;

- ✓ Resina cationica forte: All'interno dei laboratori di catalisi è stata testata una resina di decationizzazione denominata EXC 14 RELITE prodotta dalla Resindion s.r.l. sull'idrolizzato PROESA®. Come accennato precedentemente questo tipo di resina riduce la concentrazione dei cationi presenti in soluzione in ragione della loro valenza e del pH della soluzione da decationizzare. Questo tipo di resine quindi mostra una maggiore affinità per calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) rispetto al potassio (K^+), tuttavia le sue capacità di scambio permettono di ridurre approssimativamente a zero la concentrazione della maggior parte dei cationi presenti in soluzione. Utilizzando tale resina quindi si è raggiunta una riduzione notevole della concentrazione di potassio (g_p 98%), lasciando però inalterata la concentrazione degli acidi organici (g_p circa 0%). Riportando tale risultato sulla tabella dei gradi di inibizione in relazione alla concentrazione degli inibitori, si otterrebbe un grado di inibizione *non accettabile*;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Membrana di nanofiltrazione: un processo di filtrazione con membrana di tipo NF (*nano filtration*) ridurrebbe la concentrazione di acidi organici e di alcuni ioni monovalenti⁷³. All'interno dell'impianto pilota di PROESA® è stata quindi testata una membrana di nano filtrazione della Alfa Laval (NF99⁷⁴). La capacità di questa membrana, di separare gli zuccheri monometrici (permeato) dagli acidi organici e dagli ioni monovalenti (ritentato) contenuti all'interno dell'idrolizzato PROESA®, è però strettamente legata al pH della soluzione che si intende filtrare, a pH 4,5-5, utilizzando questa tipologia di membrana, si è ottenuta solo una lieve diminuzione della concentrazione dell'acido acetico (g_p 22%), dell'acido formico (g_p 27%) ed una riduzione altrettanto significativa degli ioni potassio contenuti nella soluzione (g_p 28%). Riportando tale risultato sulla tabella dei gradi di inibizione in relazione alla concentrazione degli inibitori, si otterrebbe un grado di inibizione *non accettabile*;
- ✓ Membrana di osmosi inversa: un processo di filtrazione con membrana di tipo RO (*reverse osmosis*) ridurrebbe la concentrazione di acidi organici. La capacità di questa membrana di separare gli zuccheri monometrici (ritentato) dagli acidi organici (permeato) contenuti all'interno dell'idrolizzato, è però strettamente legata al pH della soluzione che si intende filtrare, a pH 4,5-5, utilizzando questa tipologia di membrana, si otterrebbe un'elevata diminuzione della concentrazione degli acidi organici (g_p tra 50% e 65%) ed una poco significativa riduzione degli ioni monovalenti contenuti nella soluzione. Riportando tale risultato sulla tabella dei gradi di inibizione in relazione alla concentrazione degli inibitori, si otterrebbe un grado di inibizione *elevato*;

L'effettivo beneficio di un sistema di purificazione tuttavia non è sufficiente per determinarne la scelta, sono necessarie infatti anche valutazioni di tipo processistico economiche in ragione, sia dei costi di avviamento e mantenimento di tale sistema di purificazione, sia dell'operabilità di tale sistema in relazione ai benefici che esso garantisce.

In base ai soli risultati, relativi al grado di purificazione dei sistemi descritti, sembrerebbe infatti che la scelta migliore per la progettazione di un sistema di purificazione per l'idrolizzato PROESA® dovrebbe ricadere su un sistema di cromatografia liquida, che garantirebbe una rimozione completa sia degli acidi organici che del potassio. L'utilizzo di tale sistema tuttavia comporta elevati costi di processo.

Prima di essere purificato con l'utilizzo di una cromatografia, l'idrolizzato PROESA® necessiterebbe infatti di ulteriori processi di pretrattamento. Nel caso specifico l'efficienza della cromatografia dipende dalla

⁷³ Separation of acetic acid from mono-saccharides by NF and RO membranes: Performance comparison; F. Zhou, C. Wang, J. Wei (2012);

⁷⁴ NF99, membrane di nanofiltrazione della Alfa Laval in poliammide, ritenzione del MgSO₄ > 98%;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

concentrazione dell'idrolizzato ($^{\circ}\text{B}$), dal suo pH e dal rapporto tra ioni monovalenti e bivalenti presenti in soluzione. I processi di pretrattamento necessari sarebbero quindi i seguenti:

- ✓ Addolcimento: utilizzando una resina di addolcimento, rigenerata con NaCl, gli ioni bivalenti presenti in soluzione (principalmente Ca^{2+} e Mg^{2+}) vengono sostituiti con Na^{+} così da portare la concentrazione tra ioni monovalenti e bivalenti ad un rapporto superiore a 100;
- ✓ Normalizzazione: il pH della soluzione, leggermente acido (pH 4,46), viene normalizzato a pH 6 tramite l'aggiunta di una soluzione di NaOH (50%);
- ✓ Concentrazione: attraverso l'utilizzo di un evaporatore rotante si provvede alla concentrazione della soluzione da 11°B a 35°B .

Il processo di cromatografia quindi garantisce una purificazione completa dell'idrolizzato PROESA[®] dai tre composti inibitori, ma richiede l'elaborazione di un impianto fin troppo oneroso, sia in termini processistici, che in termini economici. Si è quindi ricercata una soluzione alternativa.

In tal senso si è indagata l'efficienza di un eventuale accoppiamento di sistemi.

Come anticipato infatti le prestazioni di un processo di filtrazione con membrana (sia NF che RO) è strettamente legato alle caratteristiche della soluzione che si intende filtrare e alla natura della membrana stessa. Prendendo in considerazione il processo di osmosi inversa, utilizzando una membrana RO98 della Alfa Laval, si è riscontrata una drastica diminuzione della percentuale di acidi organici ritentati con il diminuire del pH di processo, senza alterare la capacità di ritenzione degli zuccheri monomerici.⁷⁵ In diversi articoli della letteratura, riguardante l'utilizzo di membrane di filtrazione, viene spiegato come l'utilizzo di tali sistemi a pH fortemente acidi comporti una graduale degradazione della membrana, e come, qualora l'operazione fosse condotta in presenza di un'elevata concentrazione di sali in forma ionica, il fenomeno di *swelling* (rigonfiamento) della matrice polimerica diventi irreversibile a seguito dell'interazione degli ioni presenti in soluzione con la superficie della membrana.⁷⁶ L'elevata concentrazione salina dell'idrolizzato PROESA[®] (0,06 grammi di sali per grammo di zuccheri) è tuttavia principalmente, dovuto alla concentrazione elevata di potassio presente in soluzione, un catione monovalente che potrebbe essere facilmente rimosso utilizzando una resina cationica forte.

⁷⁵ Separation of acetic acid from monosaccharides by NF and RO membranes: Performance comparison; F. Zhou, C. Wang, J. Wei (2012); Assessment of NF and RO for the potential concentration of acetic acid and furfural from the condensate of eucalyptus spent sulphite liquor; Maria Diná Afonso (2012);

⁷⁶ Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH; M. Manttari; A. Pihlajamaki, M. Nystrom (2006); Separation of concentrated organic/inorganic salt mixtures by nanofiltration; V. Freger, T.C. Arnot, J.A. Howell (2000);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Da tali caratteristiche nasce quindi l'idea di un sistema di purificazione, che preveda da prima la decationizzazione dell'idrolizzato PROESA® ed in seguito la sua filtrazione, utilizzando una membrana di osmosi inversa. Utilizzando una resina cationica forte (EXA 14 RELITE), lo scambio dei cationi con ioni idrogeno (H^+), verrebbe ridotta infatti la concentrazione salina dell'idrolizzato PROESA® con contemporaneo abbassamento del pH (a $pH < 2$). In queste condizioni il processo di osmosi inversa, utilizzando una membrana RO98 della Alfa Laval, mostra una ritenzione del 100% degli zuccheri monomerici (glucosio e xilosio) ed una ritenzione di meno del 30% degli acidi organici in soluzione.⁶⁶ Un simile sistema quindi garantirebbe un grado di purificazione elevato per il potassio (oltre l'80%) ed altrettanto significativo per gli acidi organici (attorno al 65%). Confrontando questi valori con i gradi di inibizione dovuti alla concentrazione dei tre inibitori all'interno dell'idrolizzato PROESA®, si riscontrerebbe un miglioramento notevole delle prestazioni di crescita del microrganismo *Escherichia coli* MG1655, riducendo il grado di inibizione da *non accettabile* a *moderato*.

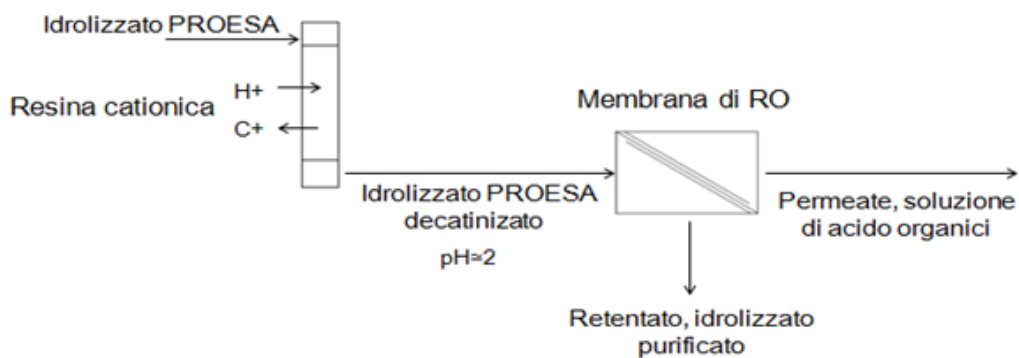


Figura 66: Schema proposto di impianto di purificazione per l'idrolizzato PROESA®;

4.1. Decationizzazione

Come accennato nel paragrafo 2.9.1, al fine di meglio affrontare la prova di decationizzazione dell'idrolizzato PROESA® su un impianto in scala pilota, è stata inizialmente condotta un'attività preliminare in scala laboratorio.

4.1.1. Prova in laboratorio

Per effettuare tale sperimentazione è stata utilizzata una colonna da 200 ml, caricata con 165 ml della resina cationica EXC 14 RELITE, precedentemente idratata.

Prima di procedere con la decationizzazione dell'idrolizzato PROESA®, la resina contenuta all'interno della colonna ha subito un processo di pretrattamento, che ha permesso la rigenerazione dei siti attivi della resina, caricandoli con ioni H⁺. Durante il processo di pretrattamento la resina è stata lavata con acqua demineralizzata, quindi è stata rigenerata utilizzando una soluzione di HCl 1N e in seguito è stata rilavata utilizzando ancora acqua demineralizzata. Nella seguente tabella vengono riportati i valori relativi al processo di pretrattamento della resina.

	V [mL]	BV	BV/h	Tempo [min]
Lavaggio	825	5,00	5,00	60
Rigenerazione	726	4,40	3,00	88
Lavaggio	825	5,00	5,00	60

Tabella 37: Lavaggio e rigenerazione della resina EXC 14;

Alla colonna è stata quindi inviato l'idrolizzato da processare. Durante la fase di esaurimento sono state raccolte frazioni da 20 ml del flusso decationizzato, per ogni frazione è stato misurato il peso [g], i gradi brix [°B], il pH e la conducibilità elettrica [mS/cm], i dati relativi a tali misurazioni sono raccolti nella seguente tabella.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

N° CAMPIONE	p (g)	V _{TOT} (L)	BV	pH	C (mS/cm)	°B
0	0	0	0,00			
1	44,0	44,0	0,27	4,9	0,04	0,0
2	44,9	89,0	0,54	5,5	0,01	0,0
3	45,2	134,3	0,81	2,3	2,53	2,2
4	46,5	180,8	1,10	1,6	7,67	9,7
5 (a)	46,8	227,7	1,38	1,5	8,38	13,0
6	47,1	274,9	1,67	1,5	8,32	13,8
7	46,9	321,8	1,95	1,5	8,24	14,1
8	46,9	368,7	2,23	1,5	8,26	14,3
9	46,8	415,5	2,52	1,5	8,17	14,2
10 (b)	46,8	462,4	2,80	1,5	8,16	14,3
11	46,6	509,0	3,09	1,5	8,18	14,7
12	46,4	555,5	3,37	1,5	8,10	14,6
13	46,1	601,6	3,65	1,5	8,08	14,4
14	46,5	648,1	3,93	1,5	8,10	14,5
15 (c)	46,3	694,4	4,21	1,5	8,08	14,7
16	45,3	739,8	4,48	1,5	8,02	14,5
17	46,4	786,2	4,77	1,5	8,02	14,4
18	46,4	832,6	5,05	1,5	8,02	14,6
19	46,3	878,9	5,33	1,5	8,01	14,8
20 (d)	46,2	925,2	5,61	1,5	8,00	14,7
21	46,2	971,4	5,89	1,5	8,01	14,5

Tabella 38: Dati prove di decationizzazione idrolizzato PROESA® (laboratorio);

Osservando i dati raccolti nella tabella è stato possibile identificare due delle tre sottofasi caratteristiche della fase di esaurimento. Il pH iniziale (circa 6) delle frazioni raccolte, dovuto all'operazione di lavaggio, è diminuito rapidamente durante la sottofase di "spostamento acqua" (N° campioni da 1 a 4), raggiungendo un valore stazionario attorno a 1,50, mantenuto costante durante la sottofase di produzione (N° campioni da 5 a 21).

Dell'idrolizzato decationizzato su quattro frazioni è stata eseguita un'analisi della concentrazione dei soli cationi presenti (analisi IC), le frazioni analizzate sono contrassegnate nella prima colonna della tabella sopra riportata, indicando, accanto al numero della frazione raccolta, la lettera alfabetica con la quale è stato contrassegnato il campione. Le restanti frazioni della sottofase di produzione, sono state raccolte ed analizzate sia attraverso l'HPLC che l'IC. Le analisi dei campioni sono riportate al termine del paragrafo.

I dati raccolti sono stati quindi riportati in un grafico sul quale (con una linea tratteggiata del medesimo colore) è riportato anche il valore del parametro misurato per l'idrolizzato prima della decationizzazione in funzione dei BV alimentati.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

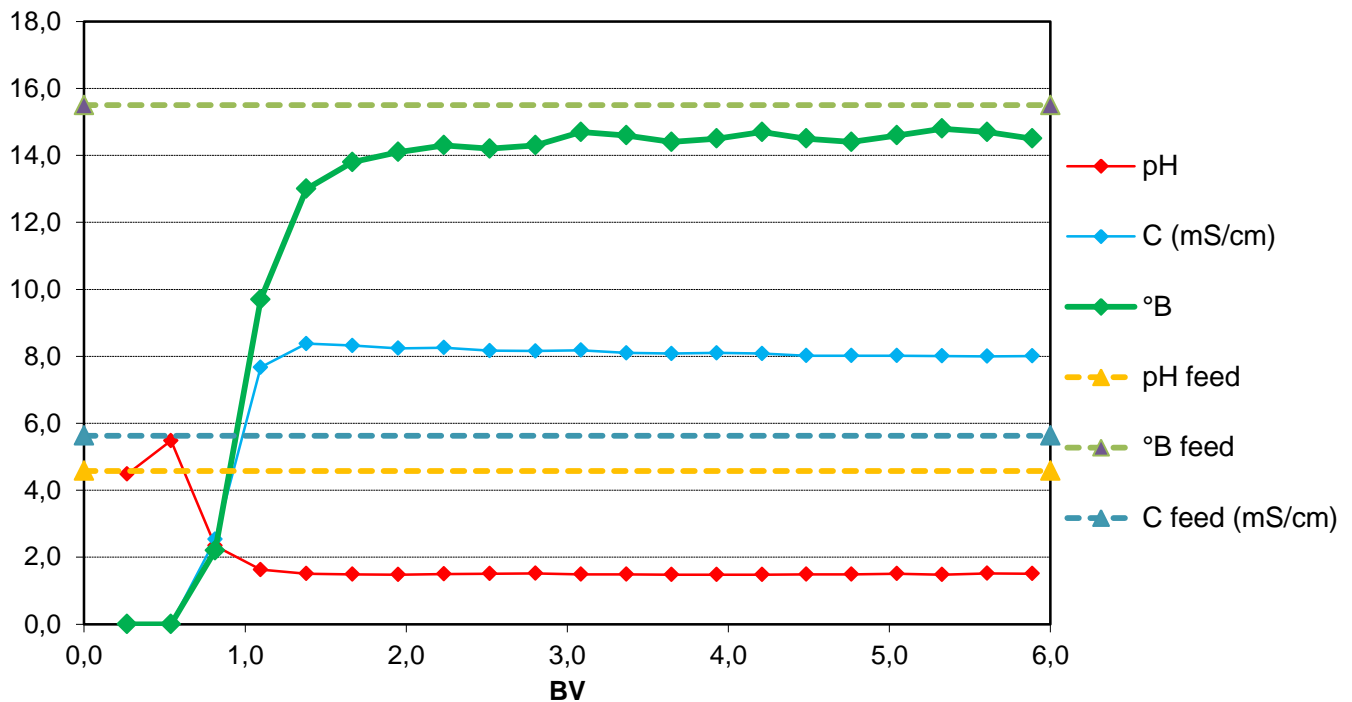


Figura 67: Dati prove di decationizzazione idrolizzato PROESA® (Laboratorio);

Come è facilmente intuibile osservando l'andamento della curva relativa al pH della soluzione decationizzata, la quantità di idrolizzato disponibile per la prova in laboratorio è stato completamente processato, senza che la resina si esaurisse completamente (pH finale 1,51). Il volume complessivo di idrolizzato decationizzato è stato di 791 ml, ovvero 4,8 volte il volume della resina contenuto all'interno della colonna di cromatografia. Tale valore, ovvero il numero di "volumi letto" di idrolizzato PROESA® decationizzati attraverso l'utilizzo di questa particolare resina, è un valore perfettamente riproducibile in un processo a scala pilota e rappresenterebbe quindi un dato fondamentale per il passaggio successivo di questo elaborato, quello ottenuto in questa prova risulta però un dato incompleto, poiché non fornisce un valore esaustivo delle effettive capacità della resina utilizzata, dal momento che non si è raggiunto l'esaurimento completo della resina.

In vista di una valutazione preliminare tuttavia è possibile considerare i dati raccolti come valori limite, ovvero, considerando il volume di HCl utilizzato nel processo di rigenerazione, il volume di resina all'interno della colonna di cromatografia, il volume di idrolizzato decationizzato e la concentrazione in grammi di zucchero totali (112 g/L), è possibile affermare che in un processo su scala pilota per ogni kilogrammo di zucchero decationizzato che si intende ottenere, sono necessari al più 1,85 L di resina EXC 14, la cui rigenerazione completa avverrebbe utilizzando 8,18 L di una soluzione 1N di HCl.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Come anticipato di alcune frazioni è stata eseguita un'analisi attraverso il sistema IC, i dati relativi a tali analisi sono riportati di seguito:

		Numero Campione			
		5 (a)	10 (b)	15 (c)	20 (d)
Sodio	mg/L	10	10	10	10
Ammonio	mg/L	0	0	0	0
Potassio	mg/L	70	70	70	70
Magnesio	mg/L	0	0	0	0
Calcio	mg/L	0	0	0	0

Figura 68: Concentrazione dei cationi per le frazioni 5, 10, 15 e 20 della prova di decationizzazione;

Come è possibile notare, osservando i valori riportati dall'analisi IC, durante la sottofase di produzione non si riscontra alcuna variazione nella concentrazione dei cationi presenti nella soluzione decationizzata.

L'analisi complessiva delle restanti frazioni è stata invece condotta vagliando la concentrazione di tutti i composti analizzabili dal sistema HPLC e dal sistema IC. I dati relativi a tali analisi sia per l'idrolizzato utilizzato per il processo di decationizzazione, che per l'idrolizzato decationizzato, sono riportati nella successiva tabella:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		Idrolizzato PROESA®	Idrolizzato decaionizzato
Xilobiosio	g/L	0,31	1,41
Glucosio	g/L	70,56	71,40
Xilosio	g/L	39,90	39,24
Arabinosio	g/L	1,67	2,11
Glicerolo	g/L	0,52	0,44
Acido formico	g/L	0,60	1,08
Acido lattico	g/L	0,00	0,39
Acido acetico	g/L	2,79	2,80
Etanolo	g/L	\	\
5-HMF	g/L	0,04	0,03
Furfurale	g/L	0,08	0,04
Cloruro	g/L	0,41	0,41
Nitrato	g/L	0,28	0,28
Solfato	g/L	0,34	0,32
Fosfato	g/L	0,45	0,44
Sodio	g/L	0,08	0,00
Ammonio	g/L	0,01	0,00
Potassio	g/L	3,79	0,07
Magnesio	g/L	0,15	0,00
Calcio	g/L	0,53	0,00
pH	-	4,5	1,6
Conducibilità	μS/cm	8030	7050

Tabella 39: Analisi dell'idrolizzato PROESA® prima e dopo la decaionizzazione (laboratorio);

Come è possibile notare confrontando le due colonne di dati, il processo di decaionizzazione dell'idrolizzato PROESA® ha, come previsto, ridotto la concentrazione salina da 6,03 g/L a 1,52 g/L, abbassando notevolmente anche il pH della soluzione (da 4,46 a 1,59).

Il processo di decaionizzazione non ha comportato alcuna perdita di zuccheri monomerici, la cui variazione rientra nell'incertezza relativa al campionamento ed alle strumentazioni utilizzate per effettuare tale analisi.

4.1.2. Processo pilota

Grazie ai dati raccolti con l'attività preliminare condotta all'interno dei laboratori, è stato possibile procedere alla valutazione dell'efficacia di un processo di decationizzazione su scala pilota. Utilizzando quindi una colonna di cromatografia contenente 67 L della resina EXC 14 RELITE è stata effettuata la decationizzazione dell'idrolizzato PROESA®.

Al fine di poter meglio comprendere i risultati ottenuti dalla prova in esame nella tabella successiva vengono riportati i dati relativi al pH e alla conducibilità [mS/cm] relativi ai campioni prelevati durante l'intero processo di decationizzazione.

N° CAMPIONE	V (L)	V _{TOT} (L)	BV	pH	c [mS/cm]
1	0	0	0,00		
2	0	0	0,00	1,84	7,20
3	25	25	0,37	1,83	5,55
4	50	50	0,75	1,82	5,50
5	60	60	0,90	1,81	5,55
6	90	90	1,34	1,80	5,52
..
13	300	300	4,48	1,78	5,47
14	330	330	4,93	1,78	5,46
15	360	360	5,37	1,78	5,46
16	390	390	5,82	1,78	5,45
17	420	420	6,27	1,78	5,44
18	450	450	6,72	1,78	5,43
19	480	480	7,16	1,79	5,40
20	510	510	7,61	1,79	5,34
21	535	535	7,99	1,80	5,25
22	25	560	8,36	2,17	2,24
23	50	585	8,73	2,42	1,40
24	75	610	9,10	2,60	0,95
25	0	610	9,10		
26	30	640	9,55	0,56	309,20
27	63	673	10,04	0,53	307,90
28	30	703	10,49	2,07	1,00
29	60	733	10,94	3,14	0,16
30	90	763	11,39	4,85	0,04
31	120	793	11,84		0,04
32	130	803	11,99	4,94	0,04

Tabella 40: Dati prove di decationizzazione idrolizzato PROESA® (pilota)

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Osservando i dati raccolti nella tabella 40 è stato possibile identificare le differenti fasi caratteristiche del processo di decationizzazione. Il pH iniziale (circa 6) dei primi campioni, dovuto all'operazione di lavaggio, è diminuito rapidamente durante la sottofase di "spostamento acqua" (N° campioni da 1 a 2), raggiungendo un valore stazionario attorno a 1,80 durante la sottofase di produzione (N° campioni da 3 a 21), abbandonando lo stazionario nella sottofase di "spostamento prodotto" (N° campioni da 22 a 24). A seguito della fase di esaurimento si è quindi proceduto alla rigenerazione della resina con una soluzione di HCl (32 %) (N° campioni da 25 a 27) e il successivo lavaggio della resina (N° campioni da 28 a 32).

I dati relativi alle diverse fasi della prova (escludendo la sottofase di "spostamento acqua") sono stati quindi riportati nel seguente grafico, in cui in ordinata è riportato il valore di volumi letto (BV) ed in ascissa il pH e la conducibilità dei diversi campioni:

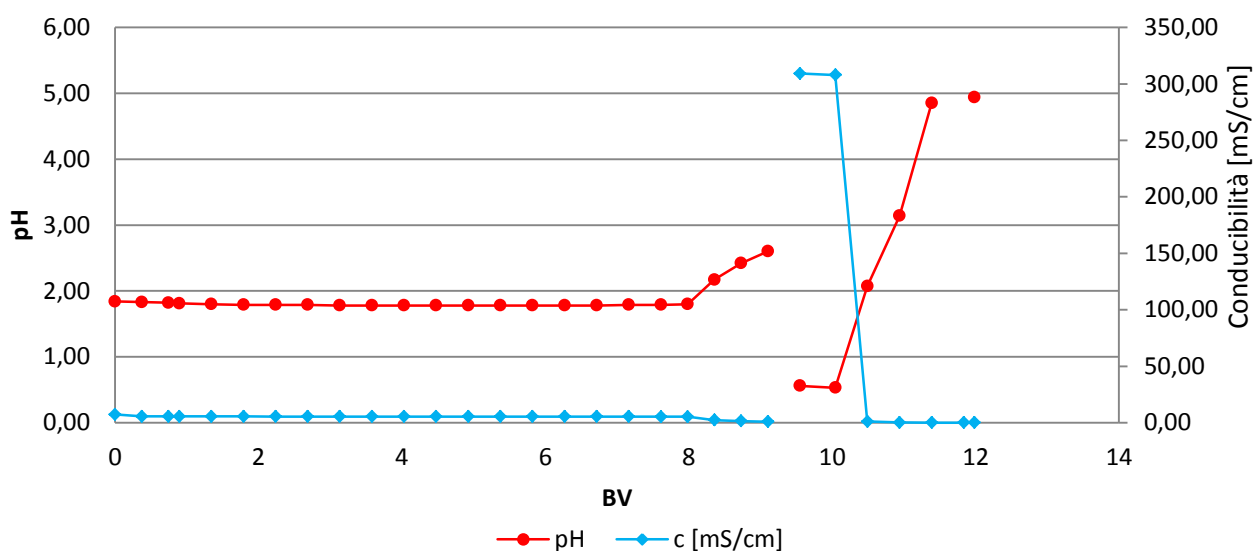


Figura 69: Dati prove di decationizzazione idrolizzato PROESA® (Pilota);

La quantità di idrolizzato inviato alla colonna di decationizzazione durante la fase di esaurimento è stato misurato complessivamente in 560 L, di cui 510 L nella sottofase di produzione. Considerando un volume di resina EXC 14 di 67 L, caricato all'interno della colonna di decationizzazione, questa offre la possibilità di processare in maniera completa 7,99 volumi di letto, con una perdita di 50 L di idrolizzato (9%) a causa della sottofasi di spostamento dei liquidi.

Per la rigenerazione completa della resina EXC 14 utilizzata per questo processo di decationizzazione, sono stati utilizzati 63 L di una soluzione di HCl (32%) e 130 L di acqua demineralizzata, distribuiti rispettivamente nella fase di rigenerazione e nella fase di lavaggio finale.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

L'analisi complessiva condotta vagliando la concentrazione di tutti i composti analizzabili dal sistema HPLC e dal sistema IC, sia per l'idrolizzato utilizzato per il processo di decationizzazione che per l'idrolizzato decationizzato, sono riportati nella successiva tabella:

		Idrolizzato PROESA®	Idrolizzato decationizzato
Xilobiosio	g/L	0,87	0,83
Glucosio	g/L	51,31	48,71
Xilosio	g/L	27,30	25,87
Arabinosio	g/L	1,17	1,21
Glicerolo	g/L	0,18	0,16
Acido formico	g/L	0,80	0,74
Acido lattico	g/L	0,19	0,18
Acido acetico	g/L	0,66	0,63
Etanolo	g/L	0,00	0,00
5-HMF	g/L	0,02	0,02
Furfurale	g/L	0,00	0,00
Cloruro	g/L	0,25	0,25
Nitrato	g/L	0,20	0,17
Solfato	g/L	0,24	0,14
Fosfato	g/L	0,27	0,25
Sodio	g/L	0,05	0,01
Ammonio	g/L	0,00	0,00
Potassio	g/L	2,29	0,02
Magnesio	g/L	0,09	0,01
Calcio	g/L	0,29	0,01
pH	-	4,8	1,7
Conducibilità	μS/cm	7540	7130

Tabella 41: Analisi dell'idrolizzato PROESA® prima e dopo la decationizzazione (pilota);

Come è possibile notare confrontando le due colonne di dati, il processo di decationizzazione dell'idrolizzato PROESA® ha, come previsto, ridotto la concentrazione salina da 3,68 g/L a 0,85 g/L, abbassando notevolmente anche il pH della soluzione, da 4,82 a 1,73. Le marcate differenze nella concentrazione dei composti analizzati tra l'idrolizzato utilizzato per la prova nell'impianto pilota e l'idrolizzato utilizzato nella prova condotta in scala di laboratorio non dipendono dall'utilizzo di un differente idrolizzato, ma da una semplice diluizione, si tratta quindi, proporzionalmente, del medesimo idrolizzato.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Considerando quindi il volume di HCl utilizzato nel processo di rigenerazione, il volume di resina all'interno della colonna di cromatografia, il volume di idrolizzato decationizzato e la concentrazione in grammi di zucchero totali (76 g/L), è possibile affermare che in un processo su scala pilota, per ogni kilogrammo di zucchero decationizzato che si intende ottenere, sono necessari 1,76 L di resina EXC 14 RELITE, la cui rigenerazione completa comporta l'utilizzo di 0,94 L di una soluzione al 32% di HCl e 1,94 L di acqua demineralizzata.

4.2.Filtrazione con membrana

Al termine del processo di decationizzazione il pH dell'idrolizzato PROESA® è stato ridotto ad un valore di 1,73. Per procedere al processo di filtrazione con membrana tuttavia è stato necessario basificare la soluzione per portare il pH ad un valore prossimo a 2,50, questo in ragione dei range di operatività suggeriti dai produttori del sistema Alfa Laval Pilot unit 2,5" RO/NF. All'idrolizzato decationizzato è stata quindi aggiunta una soluzione concentrata di KOH (50%) così da rientrare nelle specifiche del dispositivo a disposizione della Biochemtex Italia.

La membrana utilizzata per il processo di filtrazione è denominata RO98 ed il modulo a spirale inserito all'interno dell'impianto pilota possiede una superficie complessiva di filtrazione di 0,60 m². Le caratteristiche di questa membrana, operando ad una pressione di 40 bar, una temperatura di 30°C e un pH di 2,50, permettono di separare la soluzione di alimentazione in due liquidi:

- ✓ La soluzione che non è in grado di attraversare la membrana (retentato), ricca in zuccheri monomerici, viene continuamente riciclata al serbatoio di alimentazione;
- ✓ La soluzione che attraversa la membrana (permeato), ricca in acidi organici, viene scaricata e raccolta in un serbatoio esterno;

L'idrolizzato decationizzato è stato quindi basificato con una soluzione di KOH al 50%, raggiungendo il pH di 2,32 prima che ne venissero caricati 147 L nel serbatoio di alimentazione dell'impianto di filtrazione con membrana.

Come anticipato nel paragrafo 2.9.2 è stato misurato il flusso di permeato in uscita dal dispositivo di filtrazione ogni 15 minuti utilizzando un flussimetro, così da poter monitorare il volume della soluzione permeata e poter quindi calcolare il VCR della soluzione concentrata all'interno del serbatoio di alimentazione.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

I dati relativi alla portata del permeato, al volume di permeato ed al VCR sono riportati nella seguente tabella:

Tempo min	Flusso permeato mL/min	Volume permeato L	VCR L/L
1	155	0,16	1,00
6	150	0,9	1,01
11	140	1,6	1,01
26	135	3,7	1,03
41	125	5,7	1,04
71	107	9,1	1,07
86	100	10,7	1,08
106	90	12,6	1,10
126	85	14,3	1,11
141	80	15,6	1,12
156	80	16,8	1,13
171	75	17,9	1,14
186	70	19,0	1,15
201	70	20,1	1,16
226	70	21,8	1,18
241	65	22,8	1,19
256	55	23,7	1,20
271	45	24,5	1,21
561	144	24,6	1,21
576	136	26,7	1,23
586	120	28,0	1,24
601	120	29,8	1,26
626	115	32,7	1,30
641	110	34,4	1,32
671	110	37,7	1,36
701	90	40,7	1,40
736	75	43,5	1,44
761	70	45,4	1,46
781	70	46,8	1,48
806	65	48,4	1,51
821	60	49,4	1,52
866	48	51,8	1,56
881	45	52,5	1,58
896	45	53,1	1,59
911	35	53,7	1,60
1291	65	53,8	1,60
1316	70	54,8	1,62
1336	70	55,5	1,63
1351	70	56,6	1,65
1366	70	58,3	1,68
1381	65	59,3	1,71
1396	65	61,3	1,75
1411	60	63,2	1,79
1431	60	64,1	1,81
1466	50	66,5	1,86
1491	45	67,5	1,89
1511	40	68,5	1,91
1541	40	69,1	1,93
1541	80	69,2	1,93
1559	60	70,3	1,96
1574	55	70,8	1,98
1626	45	71,6	2,00
1661	40	72,6	2,03
1691	35	73,2	2,04
1706	30	74,2	2,07
1748	50	74,2	2,07
1766	48	75,0	2,09
1781	40	75,4	2,11
1796	40	76,0	2,13
1811	40	77,0	2,16
1826	40	77,6	2,18
1841	35	78,7	2,22
1856	33	78,8	2,22
1871	32	79,3	2,23
1886	32	79,7	2,25
1916	30	80,7	2,28
1931	28	81,1	2,30
1931	43	81,1	2,30
1946	40	81,8	2,32
1961	40	82,4	2,35
2021	30	84,4	2,43
2036	30	84,9	2,45
2051	28	85,3	2,47
2066	28	85,8	2,49
2081	25	86,1	2,50
2097	24	86,5	2,52
2111	20	86,8	2,53
2126	23	87,2	2,55

Tabella 42: Dati prova di filtrazione con membrana (RO);

Durante la prova sono stati effettuati 3 campionamenti, rispettivamente a VCR 1,20, 2,22 e 2,55.

Osservando l'andamento della portata del flusso permeato si individuano cinque lavaggi successivi.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Lavaggio con soda dopo 271 minuti di filtrazione (VCR 1,22). Il flusso di permeato da 45 mL/min torna a 144 mL/min;
- ✓ Lavaggio con acqua dopo 911 minuti di filtrazione (VCR 1,60). Il flusso di permeato da 35 mL/min torna a 65 mL/min;
- ✓ Lavaggio con acqua dopo 1541 minuti di filtrazione (VCR 1,93). Il flusso di permeato da 40 mL/min torna a 80 mL/min;
- ✓ Lavaggio con acqua dopo 1706 minuti di filtrazione (VCR 2,07). Il flusso di permeato da 30 mL/min torna a 50 mL/min;
- ✓ Lavaggio con acqua dopo 1931 minuti di filtrazione (VCR 2,30). Il flusso di permeato da 28 mL/min torna a 43 mL/min;

I bassi flussi di permeato, anche a seguito dei numerosi lavaggi, hanno portato gli operatori a terminare la prova prima del raggiungimento della soglia prefissata di un VCR pari a 3. I valori relativi al flusso di permeato all'aumentare del VCR sono stati riportati nel seguente grafico:

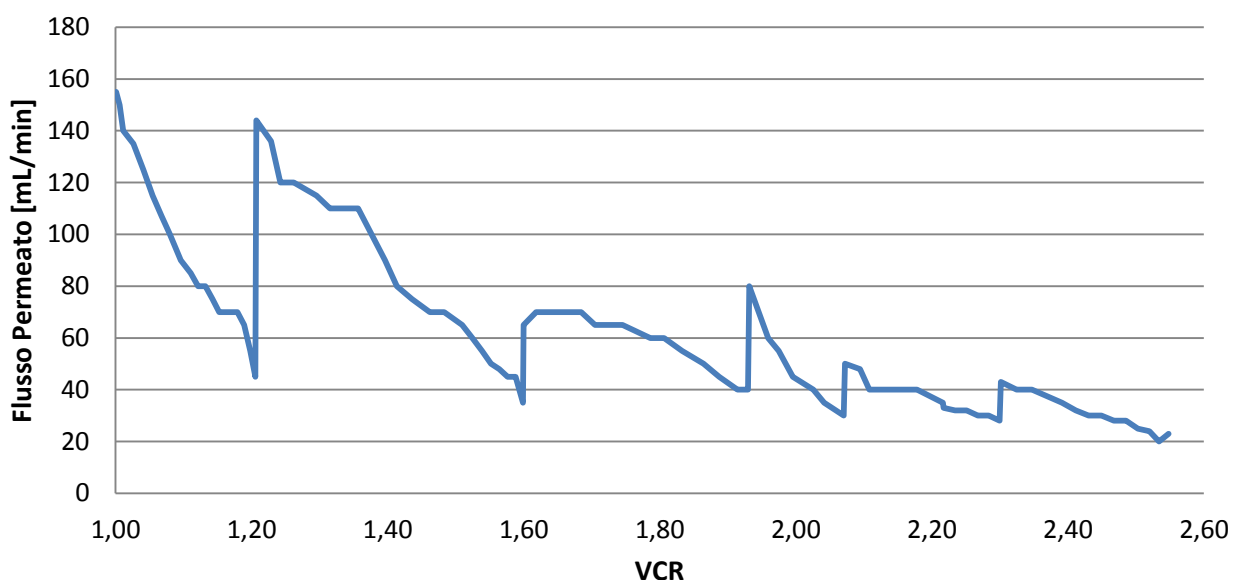


Figura 70: Grafico relativo al flusso di permeato durante la prova di filtrazione con membrana (RO);

Osservando il grafico è possibile notare il picco nel valore della portata di permeato a seguito dei differenti lavaggi con soda o acqua, che hanno permesso di ristabilire la portata iniziale almeno nelle prime ore della prova. La portata di permeato tuttavia si riduce in maniera irreversibile dopo il superamento di un VCR di 2,00, indice del raggiungimento di limiti operativi da parte del sistema di filtrazione.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Durante la prova sono stati prelevati quindi sei campioni, ovvero tre campioni di permeato e altrettanti campioni di retentato. Su ciascun prelievo è stata effettuata un'analisi completa sia all'HPLC che all'IC. I dati relativi alla concentrazione dei differenti campioni sono riportati nella seguente tabella:

		Idrolizzato decat.	Perm. VCR 1,2	Ret. VCR 1,2	Perm. VCR 2,0	Ret. VCR 2,0	Perm. VCR 2,5	Ret. VCR 2,5
Xilobiosio	g/L	0,83	0,00	0,88	0,00	1,53	0,00	1,60
Glucosio	g/L	49,02	0,00	49,49	0,00	85,30	0,31	97,49
Xilosio	g/L	26,49	0,00	29,03	0,00	46,68	0,17	52,76
Arabinosio	g/L	1,21	0,00	1,34	0,00	2,14	0,00	2,36
Glicerolo	g/L	0,21	0,00	0,41	0,00	0,46	0,00	0,54
Acido formico	g/L	0,65	0,55	0,65	0,46	0,54	0,44	0,47
Acido lattico	g/L	0,26	0,00	0,28	0,00	0,44	0,00	0,51
Acido acetico	g/L	0,69	0,26	0,69	0,33	0,90	0,55	0,97

Cloruro	g/L	0,34	0,00	0,37	0,04	0,59	0,07	0,67
Nitrato	g/L	0,18	0,04	0,19	0,05	0,27	0,06	0,30
Solfato	g/L	0,19	0,00	0,23	0,00	0,40	0,00	0,47
Fosfato	g/L	0,27	0,00	0,28	0,00	0,47	0,00	0,53
Sodio	g/L	0,02	0,00	0,05	0,00	0,10	0,00	0,13
Ammonio	g/L	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Potassio	g/L	0,88	0,01	0,88	0,01	1,41	0,02	1,59
Magnesio	g/L	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
Calcio	g/L	0,00	0,00	0,02	0,00	0,04	0,00	0,04

pH	-	2,3	2,7	2,5	2,6	2,6	2,5	2,6
Conducibilità	µS/cm	4640	1290	4250	1530	5230	1770	5540

Tabella 43: Dati dei campionamenti effettuati durante la prova di filtrazione con membrana (RO);

Osservando i dati relativi alla concentrazione dei vari componenti nel retentato e nel permeato durante il proseguire della prova, si nota come già dalle prime analisi relative al VCR 1,2 la membrana permetta una buona separazione degli acidi organici dagli zuccheri monomerici. Tale grado di separazione viene mantenuta sino agli ultimi stadi del processo di filtrazione dove, forse a causa di un'eccessiva insistenza nel procedere con l'operazione, parte degli zuccheri riesce a superare la membrana.

Un ulteriore dato significativo è la concentrazione finale di zuccheri ottenuta al termine del processo di filtrazione. La membrana di osmosi inversa infatti permette di concentrare gli zuccheri presenti nell'idrolizzato decationizzato ad un rapporto di 2x.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Come accennato nei primi capitoli di questo elaborato, nel normale processo di utilizzo dell'idrolizzato a scopi di fermentazione, la soluzione ricca in zuccheri monomerici (<90 g/L) avrebbe dovuto subire, in assenza di un ulteriore processo di purificazione, direttamente un ciclo di concentrazione in evaporatore, portando la concentrazione degli zuccheri ad un valore di circa 500 g/L (5,5x). Utilizzando il sistema di purificazione proposto, sarebbe possibile diminuire drasticamente i costi di tale concentrazione, utilizzando il processo di membrana, oltre che per ridurre la concentrazione di alcuni inibitori, per aumentare la concentrazione degli zuccheri dell'idrolizzato (>150 g/L) e quindi gravare in maniera meno significativa sul processo di evaporazione. Tale procedimento infatti permetterebbe di ridurre i volumi iniziali della soluzione da concentrare oltre che i tempi ed i costi del processo stesso di concentrazione (3,3x).

È bene sottolineare tuttavia che la valutazione dei soli dati relativi alla concentrazione non permette di apprezzare l'effettiva efficienza di questo sistema. Considerando quindi i volumi di retentato al momento dei campionamenti, nella seguente tabella viene riportata la quantità massiva dei composti di nostro interesse presenti in soluzione per i campioni del solo retentato durante la prova.

		Idrolizzato dec.	Retentato VCR 1,2	Retentato VCR 2,0	Retentato VCR 2,5
Glucosio	g	7160,7	6622,7	6653,4	6239,4
Xilosio	g	3802,9	3884,7	3641,0	3376,6
Arabinosio	g	177,9	179,3	166,9	151,0
Acido formico	g	108,8	86,9	42,1	30,1
Acido lattico	g	26,5	37,5	34,3	32,6
Acido acetico	g	92,6	92,3	70,2	62,1

Tabella 44: Composizione massiva del retentato nella prova di filtrazione con membrana (RO);

Osservando i dati in termini massivi si nota una lieve riduzione della quantità di zuccheri presenti in soluzione, tale perdita non è tuttavia da attribuire direttamente al processo di filtrazione con membrana (la concentrazione di zuccheri all'interno del permeato infatti è praticamente nulla sino al termine della prova), essa può essere quindi legata ad eventuali perdite di materiale dovute ai processi di lavaggio intercorsi durante il processo di filtrazione.

Risultano tuttavia molto interessanti i dati relativi alla riduzione della quantità di acidi organici presenti all'interno dell'idrolizzato al termine del processo di filtrazione con membrana. Prendendo in considerazione infatti l'acido acetico e l'acido formico, la loro quantità viene ridotta rispettivamente del 33% e del 73%.

4.3. Risultati finali

Risulta utile ora effettuare un bilancio complessivo dell'operazione di purificazione proposto in questo capitolo. In questo paragrafo vengono quindi riportati in maniera riassuntiva le condizioni di purificazione ed i dati raccolti.

		Idrolizzato PROESA®	Idrolizzato decaionizzato	Idrolizzato purificato
Xilobiosio	g/L	0,87	0,83	1,60
Glucosio	g/L	51,31	48,71	97,49
Xilosio	g/L	27,30	25,87	52,76
Arabinosio	g/L	1,17	1,21	2,36
Glicerolo	g/L	0,18	0,16	0,54
Acido formico	g/L	0,80	0,74	0,47
Acido lattico	g/L	0,19	0,18	0,51
Acido acetico	g/L	0,66	0,63	0,97
Etanolo	g/L	0,00	0,00	0,34
5-HMF	g/L	0,02	0,02	0,06
Furfurale	g/L	0,00	0,00	0,00
Cloruro	g/L	0,25	0,25	0,67
Nitrato	g/L	0,20	0,17	0,30
Solfato	g/L	0,24	0,14	0,47
Fosfato	g/L	0,27	0,25	0,53
Sodio	g/L	0,05	0,01	0,13
Ammonio	g/L	0,00	0,00	0,00
Potassio	g/L	2,29	0,02	1,59
Magnesio	g/L	0,09	0,01	0,01
Calcio	g/L	0,29	0,01	0,04
pH	-	4,8	1,7	2,6
Conducibilità	μS/cm	7540	7130	5540

Tabella 45: Dati analitici relativi ai liquidi durante il processo di purificazione dell'idrolizzato PROESA®;

Al fine di poter calcolare l'effettiva rimozione di inibitori ottenuta grazie a questo processo, è bene convertire i valori di concentrazione ottenuti tramite l'analisi all'HPLC ed all'IC in quantità massive, considerando un volume di idrolizzato iniziale di 147 L. Tale approssimazione è lecita dal momento che il volume della soluzione purificata non viene alterato al termine del processo di decaionizzazione ed è la quantità di idrolizzato decaionizzato utilizzata per ottenere 68 L di idrolizzato purificato in seguito al processo di filtrazione con membrana per osmosi inversa.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		Idrolizzato PROESA®	Idrolizzato decactionizzato	Idrolizzato purificato
Glucosio	g	7542,0	7160,4	6239,4
Xilosio	g	4013,0	3802,9	3376,6
Arabinosio	g	172,0	177,9	151,0
Glicerolo	g	26,5	23,5	34,6
Acido formico	g	117,6	108,8	30,1
Acido lattico	g	27,9	26,5	32,6
Acido acetico	g	97,0	92,6	62,1
Nitrato	g	28,7	24,4	19,3
Solfato	g	35,6	20,7	29,8
Fosfato	g	40,1	36,9	34,0
Potassio	g	337,2	2,5	101,8
Magnesio	g	12,5	0,7	0,9
Calcio	g	42,3	1,5	2,5

Tabella 46: Composizione massiva dei liquidi durante il processo di purificazione dell'idrolizzato PROESA®;

Prendendo in considerazione quindi la quantità di acidi organici e di ioni presenti all'interno dell'idrolizzato PROESA®, al termine del processo di purificazione si ottengono i seguenti gradi di purificazione per le singole componenti analizzate:

		g _p
Acido formico	%	-74%
Acido acetico	%	-36%
Potassio	%	-70%

Tabella 47: Grado di purificazione a seguito del processo di purificazione sull'idrolizzato PROESA®;

Riportando i risultati ottenuti sulla tabella dei gradi di inibizione, è possibile osservare che, come previsto, a seguito del processo di purificazione attraverso decactionizzazione con resina a scambio ionico e filtrazione con membrana per osmosi inversa, il grado di inibizione atteso si riduce dal valore *non accettabile* (Idrolizzato PROESA®), al valore *moderato* (Idrolizzato purificato).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Separation of acetic acid from monosaccharides by NF and RO membranes: Performance comparison; F. Zhou, C. Wang, J. Wei (2012). *Journal of Membrane Science*. Volume 429, 15 February 2013, Pages 243–251;
- [2] Assessment of NF and RO for the potential concentration of acetic acid and furfural from the condensate of eucalyptus spent sulphite liquor; Maria Diná Afonso (2012). *Separation and Purification Technology*. Volume 99, 8 October 2012, Pages 86–90;
- [3] Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH; M. Manttari, A. Pihlajamaki, M. Nystrom (2006). *Journal of Membrane Science*. Volume 280, Issues 1–2, 1 September 2006, Pages 311–320;
- [4] Separation of concentrated organic/inorganic salt mixtures by nanofiltration; V. Freger, T.C. Arnot, J.A. Howell (2000). *Journal of Membrane Science*. Volume 178, Issues 1–2, 15 September 2000, Pages 185–193;

5. PROVA IN BIOREATTORE

Per valutare quali sono gli effettivi benefici dell'utilizzo dell'idrolizzato PROESA® purificato in un processo di produzione, si è deciso di effettuare un test di crescita in bioreattore utilizzando come microrganismo *Escherichia coli* MG1655.

Un processo fermentativo, il cui scopo è la produzione attraverso l'utilizzo di un microrganismo di uno specifico prodotto di bio-sintesi, non differisce infatti in maniera sostanziale da un processo di crescita. Prima di indurre nel microrganismo la produzione di uno specifico pathway enzimatico, e di conseguenza del prodotto, è infatti necessario alimentare la popolazione microbica sino a raggiungere un valore di biomassa sufficiente a sostenere una produzione significativa del prodotto desiderato. In termini di resa cellulare massiva (DCW) tale valore viene generalmente stabilito attorno ai 50 g/L⁷⁷. In un processo di fermentazione quindi vengono distinte due macrofasi, la fase di crescita microbica (prima fase batch, EFB e seconda fase batch) ed una fase di produzione (CFB).

Confrontando quindi i risultati raggiunti in termini di resa cellulare (DWC) di un processo di crescita condotto utilizzando come fonte di zuccheri l'idrolizzato PROESA® non purificato o l'idrolizzato PROESA® purificato, è possibile valutare gli effettivi benefici che il sistema di purificazione adottato comporterebbe anche in un processo di produzione. Tale analisi inoltre, assumendo un carattere del tutto generale ed utilizzando un microrganismo ritenuto un "modello", fornisce informazioni ben più utili di quanto non farebbe un processo di produzione specifico, che richiederebbe quindi l'utilizzo di un microrganismo altamente ingegnerizzato.

Sono state condotte due differenti prove in bioreattore, mantenendo le medesime condizioni operative e utilizzando lo stesso terreno di crescita (FERM-M), ma differenziando la fonte di zuccheri utilizzata sia nella fase batch, che nella fase fed-batch. Le condizioni operative delle due prove sono riportate nella seguente tabella:

⁷⁷ High cell-density culture of *Escherichia coli*; Sang Yup Lee (1996);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Temperature [°C]	34
pH	6,9
pO ₂ [%]	30
Velocità di agitazione del mezzo [rpm]	150-1800
Flusso d'aria [L/min]	1,0 - 1,5
Glucosio (zuccheri totali) nella fase batch [g/L]	10 (15)
Glucosio (zuccheri totali) nella fase CFB [g/L]	10 (15)

Tabella 48: Condizioni di crescita per le prove in bioreattore;

Come anticipato nel paragrafo 2.7.2 l'idrolizzato utilizzato come fonte di zuccheri per la prova di crescita necessita di un processo di concentrazione per portare la quantità di zuccheri totali presente ad un valore di circa 500 g/L. Per poter operare una simile concentrazione l'idrolizzato purificato, dal pH ancora acido, è stato ulteriormente basificato, utilizzando in questa occasione una soluzione di NH₄OH al 26%, ovvero una soluzione del medesimo composto che viene utilizzato per basificare il mezzo di coltura durante il normale processo di crescita di *Escherichia coli* MG1655.

Come anticipato all'interno del paragrafo 2.7 ogni processo di crescita in bioreattore è diviso in quattro differenti fasi:

- ✓ Prima fase batch: Nella prima fase di crescita della popolazione batterica il volume di reazione viene mantenuto costante. Il piede iniziale è costituito da un terreno contenente i nutrienti necessari alla crescita del microrganismo per tutta la durata della prova (FERM-M) ed una quantità di idrolizzato sufficiente a garantire una concentrazione totale di zuccheri iniziale di 15 g/L;
- ✓ Fase di alimentazione esponenziale: All'esaurimento della fonte di carbonio primaria ha inizia la seconda fase di crescita. L'idrolizzato concentrato utilizzato come fonte di zuccheri viene dosato seguendo un andamento esponenziale. La fase esponenziale di alimentazione ha una durata fissa di 3 ore;
- ✓ Seconda fase batch: al termine della fase di alimentazione esponenziale, viene interrotta l'alimentazione di zuccheri al bioreattore e, mantenendo il volume costante, si permette alla popolazione batterica di esaurire gli zuccheri dosati durante la fase precedente;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ Fase di alimentazione costante: All'esaurimento della fonte di carbonio primaria ha inizia la quarta fase di crescita. L'idrolizzato concentrato utilizzato come fonte di zuccheri viene dosato con una portata costante, per garantire alla popolazione batterica la corretta dose di zuccheri;

Nella seguente tabella sono quindi riportate, in due colonne differenti, le concentrazioni relative alla soluzione concentrata, sia per l'idrolizzato PROESA® non purificato, che per l'idrolizzato purificato. Come già sottolineato più volte all'interno di questo elaborato, entrambe le soluzioni derivano dal medesimo idrolizzato, del quale solo una parte ha subito il processo di purificazione presentato nei capitoli precedenti.

		Idrolizzato non purificato	Idrolizzato purificato
Xilobiosio	g/L	\	2,17
Glucosio	g/L	296,44	274,17
Xilosio	g/L	164,38	156,75
Arabinosio	g/L	7,64	8,46
Glicerolo	g/L	2,03	5,20
Acido formico	g/L	5,20	3,42
Acido lattico	g/L	\	1,81
Acido acetico	g/L	3,85	2,84
Etanolo	g/L	\	\
5-HMF	g/L	0,18	0,94
Furfurale	g/L	\	0,95
Cloruro	g/L	2,98	2,73
Nitrato	g/L	1,80	0,98
Solfato	g/L	2,77	2,21
Fosfato	g/L	3,13	2,91
Sodio	g/L	0,53	0,50
Ammonio	g/L	0,15	2,15
Potassio	g/L	25,27	6,97
Magnesio	g/L	0,86	0,16
Calcio	g/L	3,35	0,69

Tabella 49: Concentrazione degli Idrolizzati PROESA® utilizzati nelle prove in bioreattore;

A seguito del trasporto della soluzione purificata all'interno dei bio-laboratori e della sua successiva movimentazione, questa ha subito una contaminazione da parte di un microrganismo esterno, che ha portato ad un indesiderato aumento della concentrazione di etanolo ed acidi organici nella soluzione. A seguito del processo di concentrazione, attraverso l'utilizzo di una colonna di distillazione, l'etanolo prodotto è stato allontanato, ma la concentrazione degli acidi organici presenti all'interno dell'idrolizzato purificato è variata.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

La concentrazione di zuccheri totali dell'idrolizzato PROESA® non purificato è leggermente superiore a quella dell'idrolizzato PROESA® purificato, rispettivamente circa 460 g/L e 430 g/L, il confronto tra le differenti componenti delle due soluzioni non è quindi immediatamente riscontrabile.

È possibile tuttavia proporzionare la concentrazione dei composti di nostro interesse in ragione della concentrazione di zuccheri totali, come descritto nel paragrafo 2.7, infatti, il dosaggio in alimentazione dei suddetti idrolizzati è proporzionato alla concentrazione in zuccheri totali della soluzione stessa, la quantità di inibitore percepita dal microrganismo all'interno del mezzo di coltura dipende quindi anche dalla concentrazione di zuccheri della soluzione utilizzata come alimentazione. In ragione di tale proporzionalità quindi i risultati esposti in questo capitolo, contrariamente a quanto anticipato precedentemente, si riferiscono ad un grado di purificazione per l'acido acetico del 20%, per l'acido formico del 35% e per il potassio del 70%.

5.1. Crescita in Bioreattore con idrolizzato non purificato

Nel seguente paragrafo sono stati riportati i risultati ottenuti durante la prova di crescita in bioreattore, utilizzando come fonte di zuccheri l'idrolizzato PROESA® non purificato (*NPF-non purified feed*).

Durante la prova sono stati monitorati gli andamenti dei valori relativi al pH del mezzo di coltura (pH), alla percentuale di ossigeno disciolta (pO_2), alla velocità di agitazione del mezzo (*stir*), alla quantità di base dosata dall'inizio della prova (*base*) e al dosaggio dell'idrolizzato concentrato (*SUBA*). Tali andamenti sono rappresentati nei grafici riportati nelle relative sottosezioni della prova.

5.1.1. Prima fase batch

Nei due grafici successivi vengono riportati i dati relativi all'andamento dei parametri monitorati durante il procedere della prova per la prima fase batch:

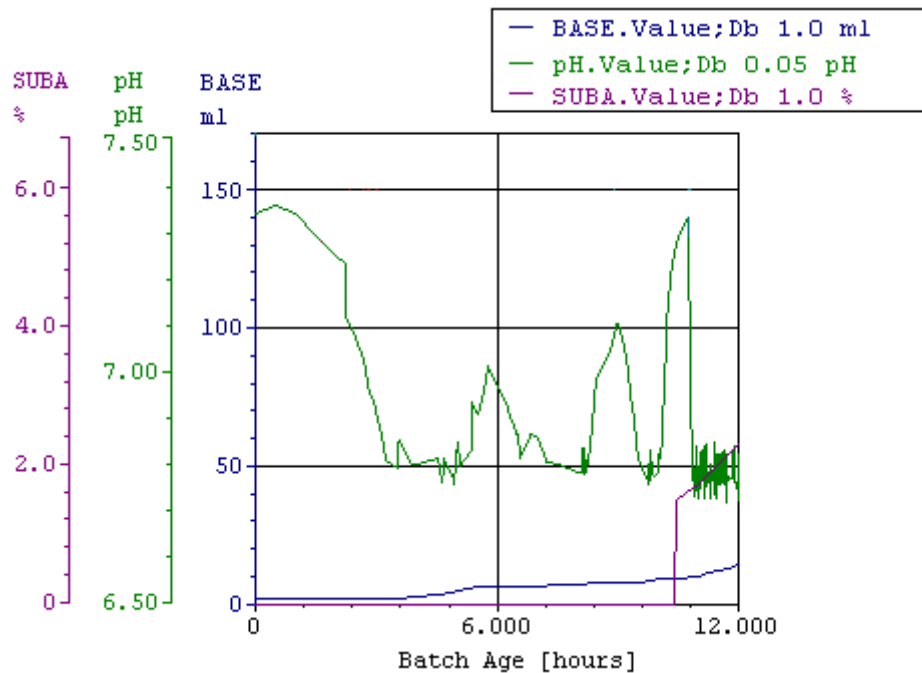


Figura 71: Andamento di pH, base e SUBA durante la prima fase batch (NPF);

Osservando l'andamento di pH, base e dosaggio dell'alimentazione nelle prime 12 ore della crescita di *Escherichia coli* MG1655 è individuabile il termine della fase batch della prova. Il pH inizialmente basico (7,20) subisce un rapido declino, sino a stabilizzarsi attorno al valore di 6,9 dopo due ore e mezzo dall'inizio della prova. Sebbene il pH presenti costanti variazioni durante le prime dodici ore di crescita, sono evidenti due picchi basici, rispettivamente a 9 e 10,5 ore dall'inizio della prova. In corrispondenza di tale innalzamento del pH del mezzo di crescita può essere associato l'esaurimento delle due fonti di carbonio principali, ovvero glucosio e xilosio.⁷⁸

Il secondo picco di pH (10,5 ore) supera il valore soglia stabilito per l'inizio della seconda fase di crescita (pH 7,15) e determina quindi la fine della prima fase di crescita batch.

⁷⁸ High cell-density culture of *Escherichia coli*; Sang Yup Lee (1996);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

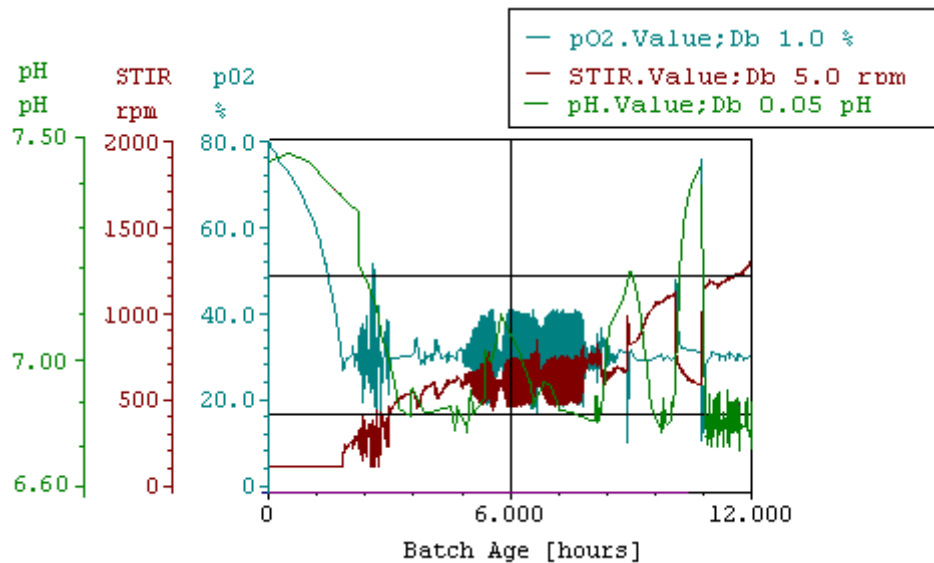


Figura 72: Andamento di pH, velocità di agitazione e ossigeno disciolto durante la prima fase batch (NPF);

Osservando i dati relativi alla percentuale di ossigeno disciolto ed alla velocità di agitazione del mezzo di crescita, è facile notare come i due parametri siano tra loro legati, infatti come anticipato il controllo della pO_2 viene effettuato utilizzando proprio la velocità di agitazione. Comparando la variazione dei due parametri in relazione all'andamento del pH si nota come, all'esaurimento della seconda fonte di carbonio primaria (10,5 ore), vi sia un arresto della crescita cellulare, testimoniato dal rapido innalzarsi dell'ossigeno disciolto e dal conseguente diminuire della velocità di agitazione del mezzo. Infatti, esaurita la fonte di carbonio principale, i microrganismi presenti all'interno della coltura non hanno necessitato di ulteriore ossigeno per i propri cicli biosintetici e la percentuale di ossigeno disciolta nel mezzo si è stabilizzata.

Al termine della fase batch è stato prelevato un campione di 50ml del mezzo di coltura del quale è stata analizzata la composizione [PRE-EFB]. Nella seguente tabella i risultati ottenuti con l'analisi HPLC ed IC effettuata dal laboratorio di analitica (analitico-misurato), vengono paragonati al dosaggio teorico di tutti i componenti al termine della fase batch (teoretica-dosato), tali dati si basano sulla composizione iniziale del mezzo, sulla quantità di base dosata e sulla composizione dell'idrolizzato utilizzato come fonte di zuccheri per la prima fase batch e non tengono quindi conto dei consumi dovuti alla crescita della popolazione batterica avvenuta durante tale fase.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		PRE-EFB (dosato)	PRE-EFB (misurato)
Xilobiosio	g/L	0,00	0,29
Glucosio	g/L	9,11	0,14
Xilosio	g/L	5,89	0,19
Arabinosio	g/L	0,24	0,00
Glicerolo	g/L	0,00	0,00
Acido formico	g/L	0,12	0,00
Acido lattico	g/L	0,00	0,00
Acido acetico	g/L	0,08	0,52
Etanolo	g/L	\	\
5-HMF	g/L	0,01	\
Furfurale	g/L	0,00	\

Cloruro	g/L	0,06	0,09
Nitrato	g/L	0,04	\
Solfato	g/L	5,44	3,66
Fosfato	g/L	1,06	0,59
Sodio	g/L	0,09	0,18
Ammonio	g/L	3,92	1,26
Potassio	g/L	1,36	0,87
Magnesio	g/L	0,02	0,00
Calcio	g/L	0,08	0,06

Tabella 50: Concentrazione teoretica ed analitica al termine della prima fase batch (NPF);

Per poter meglio valutare i consumi durante la prima fase batch, i dati relativi alle concentrazioni al termine di questa prima fase di crescita sono stati moltiplicati per il volume del mezzo di coltura [0,8 L], così da ottenere tali composizioni in termini massivi [g], ed è stato quindi valutato il consumo percentuale di ogni singola componente.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		PRE-EFB (dosato)	PRE-EFB (misurato)	Consumo [%]
Glucosio	g	7,29	0,11	98%
Xilosio	g	4,71	0,15	97%
Arabinosio	g	0,19	0,00	100%
Acido formico	g	0,10	0,00	100%
Acido lattico	g	0,00	0,00	\
Acido acetico	g	0,07	0,42	-523%
Etanolo	g	0,00	0,00	\
5-HMF	g	0,01	0,00	100%
Furfurale	g	0,00	0,00	\

Cloruro	g	0,05	0,07	-41%
Nitrato	g	0,03	0,00	100%
Solfato	g	4,35	2,93	33%
Fosfato	g	0,85	0,47	45%
Sodio	g	0,07	0,14	-96%
Ammonio	g	3,14	1,01	68%
Potassio	g	1,09	0,70	36%
Magnesio	g	0,02	0,00	100%
Calcio	g	0,06	0,04	26%

Tabella 51: Quantità massive e consumo percentuale delle componenti di maggiore interesse durante la prima fase batch (NPF);

I dati relativi ai consumi di glucosio e xilosio al termine della prima fase batch della crescita, danno conferma di quella che è stata la valutazione del significato attribuibile ai due successivi picchi di pH, riscontrati durante le prime ore della prova di crescita NPF, ovvero il consumo completo delle due fonti principali di zuccheri (glucosio e xilosio).

Considerando i dati relativi alla quantità di acido formico, sembrerebbe che questo venga consumato durante il processo di crescita, la drastica diminuzione della concentrazione di questo acido è tuttavia attribuibile unicamente alla natura volatile del composto stesso. L'acido formico quindi non viene consumato, ma semplicemente evapora e non viene efficacemente ricondensato.

L'elevata concentrazione al termine della fase batch di acido acetico invece è una conseguenza del naturale processo di crescita di *Escherichia coli* MG1655, che in tutte le prove effettuate ha manifestato una produzione consistente di acido acetico, in proporzione al consumo di zuccheri.

5.1.2. Fase di alimentazione esponenziale e seconda fase batch

Nei due grafici successivi vengono riportati i dati relativi all'andamento dei parametri monitorati durante il procedere della fase di alimentazione esponenziale e la seconda fase batch:

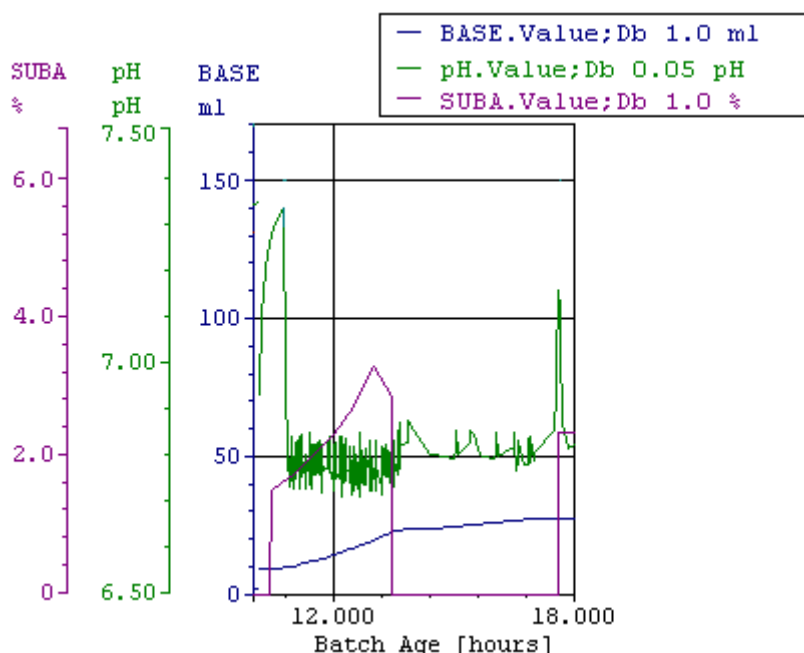


Figura 73: Andamento di pH, base e SUBA durante la fase EFB e la seconda fase batch (NPF);

L'inizio della fase di alimentazione esponenziale della prova è contraddistinto dall'inizio del dosaggio dell'idrolizzato PROESA® non purificato (10,5 h), che prosegue per tre ore. Il pH subisce delle costanti variazioni principalmente dovute all'acidificazione del mezzo da parte dell'addizione dell'idrolizzato (pH 4,5) ed al conseguente dosaggio di base al mezzo di crescita per riportare il pH al valore stabilito dal controllore (6,9).

Al termine della fase di alimentazione esponenziale ha quindi inizio una seconda fase batch. Le oscillazioni relative al pH risultano ora decisamente meno evidenti, ciò è dovuto all'influenza della sola acidificazione da parte del microrganismo durante il normale processo di crescita, contrastata dall'addizione della base. Dopo circa 3 ore dal termine della fase EFB (17,8 h) l'andamento del pH mostra un picco, che supera il valore di 7,15, indice dell'esaurimento della fonte di carbonio primaria (glucosio).

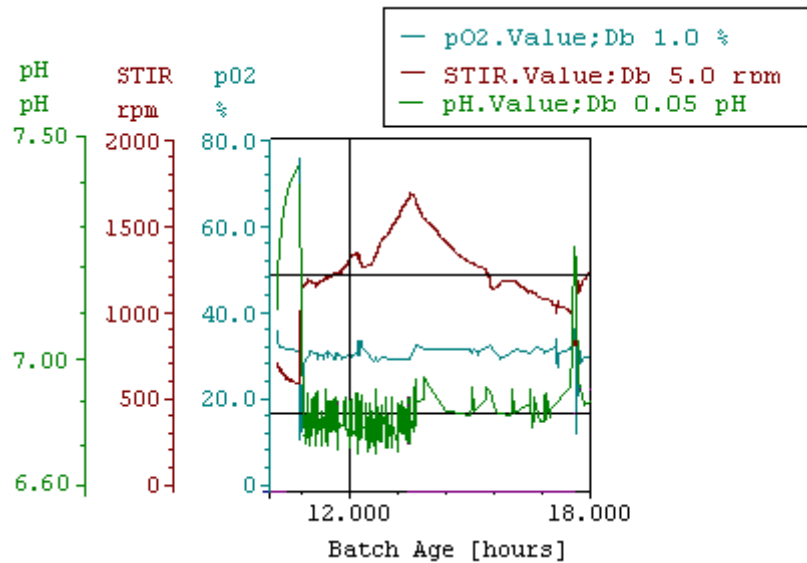


Figura 74: Andamento di pH, velocità di agitazione e ossigeno disciolto durante la fase EFB e la seconda fase batch (NPF);

Osservando l'andamento della percentuale dell'ossigeno disciolto e della velocità di agitazione durante la fase di alimentazione, è possibile notare come ad una quantità di ossigeno disciolto pressoché stazionaria, corrisponda un graduale e costante aumento della velocità di agitazione del mezzo, che raggiunge il suo massimo (1680 rpm) proprio al termine della fase di alimentazione esponenziale (13,5 h). Tale andamento è influenzato in parte dall'aumento di volume del mezzo di crescita ed in parte dall'aumento della popolazione microbica, un simile fabbisogno di ossigeno infatti è un indice evidente della crescita del microrganismo contenuto all'interno del mezzo di coltura (aerobica).

Al termine della fase di alimentazione esponenziale ha quindi inizio una seconda fase batch. Anche in questa fase di crescita la percentuale di ossigeno disciolta nel mezzo sembra rimanere costante, ma la velocità di agitazione del mezzo diminuisce rapidamente raggiungendo il valore minimo (600 rpm) al termine della seconda fase batch, in contemporanea al picco di pH. Un fenomeno analogo a quello riscontrato al termine della prima fase batch, dove l'arresto della crescita dovuto alla mancanza di zuccheri ha portato ad uno stabilizzarsi della percentuale di ossigeno disciolto del mezzo ed una conseguente riduzione della velocità di agitazione del mezzo di coltura.

Al termine della seconda fase batch è stato prelevato un campione di 50 ml del mezzo di coltura del quale è stata analizzata la composizione [PRE-CFB].

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		PRE-CFB (dosato)	PRE-CFB (misurato)
Xilobiosio	g/L	0,00	\
Glucosio	g/L	31,22	0,21
Xilosio	g/L	20,39	0,84
Arabinosio	g/L	0,81	\
Glicerolo	g/L	0,16	\
Acido formico	g/L	0,51	0,59
Acido lattico	g/L	0,00	0,72
Acido acetico	g/L	0,37	2,45
Etanolo	g/L	0,00	\
5-HMF	g/L	0,02	\
Furfurale	g/L	0,00	\
Cloruro	g/L	0,29	0,37
Nitrato	g/L	0,17	\
Solfato	g/L	5,23	4,21
Fosfato	g/L	1,30	\
Sodio	g/L	0,12	0,32
Ammonio	g/L	11,92	2,01
Potassio	g/L	3,27	3,52
Magnesio	g/L	0,09	0,07
Calcio	g/L	0,33	0,36

Tabella 52: Concentrazione teoretica ed analitica al termine della seconda fase batch (NPF);

Per poter meglio valutare i consumi durante questa fase di crescita, i dati relativi alle concentrazioni delle diverse componenti al termine della seconda fase batch sono stati moltiplicati per il volume del mezzo di coltura, sottraendo, ai valori massivi così ottenuti, quelli relativi all'inizio della fase di alimentazione esponenziale.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		POST-CFB (dosato)	POST-CFB (misurato)	Consumo [%]
Glucosio	g	19,88	0,18	99%
Xilosio	g	13,11	0,73	94%
Arabinosio	g	0,51	0,00	100%
Acido formico	g	0,35	0,51	-47%
Acido lattico	g	0,00	0,62	+
Acido acetico	g	0,67	2,12	-216%
Etanolo	g	0,00	0,00	\
5-HMF	g	0,01	0,00	100%
Furfurale	g	0,00	0,00	\
Cloruro	g	0,27	0,32	-19%
Nitrato	g	0,12	0,00	100%
Solfato	g	3,12	3,65	-17%
Fosfato	g	0,75	0,00	100%
Sodio	g	0,18	0,28	-57%
Ammonio	g	7,19	1,74	76%
Potassio	g	2,44	3,05	-25%
Magnesio	g	0,06	0,06	-7%
Calcio	g	0,27	0,31	-16%

Tabella 53: Quantità massive e consumo percentuale delle componenti di maggiore interesse al termine della seconda fase batch (NPF);

I dati relativi ai consumi di glucosio e xilosio al termine della seconda fase batch danno conferma di quella che è stata la valutazione del significato attribuibile al picco di pH riscontrato, ovvero il consumo completo delle due fonti principali di zuccheri (glucosio e xilosio).

Considerando la produzione dell'acido acetico durante la seconda fase di crescita microbica (EFB e seconda fase bathc) si riscontra un'elevata produzione di tale acido, la cui concentrazione risulta ben superiore a quella dovuta alla sola quantità di idrolizzato dosata in questa fase.

Durante l'alimentazione di idrolizzato l'elevato dosaggio di zuccheri porta ad una lieve produzione di acido lattico, un metabolita secondario prodotto da *Escherichia coli* in fase di fermentazione acida mista, un processo di tipo anaerobico con il quale il microrganismo produce ATP in presenza di una quantità eccessiva di zuccheri all'interno del mezzo di coltura.⁷⁹ L'esigua quantità di acido prodotto in questa fase (0,62 g) tuttavia risulta poco significativa.

⁷⁹ General microbiology, Cambridge University Press; Hans G. Schlegel (1993), p.315 "Mixed acid fermentation";

5.1.3. Fase di alimentazione costante

Nei due grafici successivi vengono riportati i dati relativi all'andamento dei parametri monitorati durante il procedere della fase di alimentazione costante:

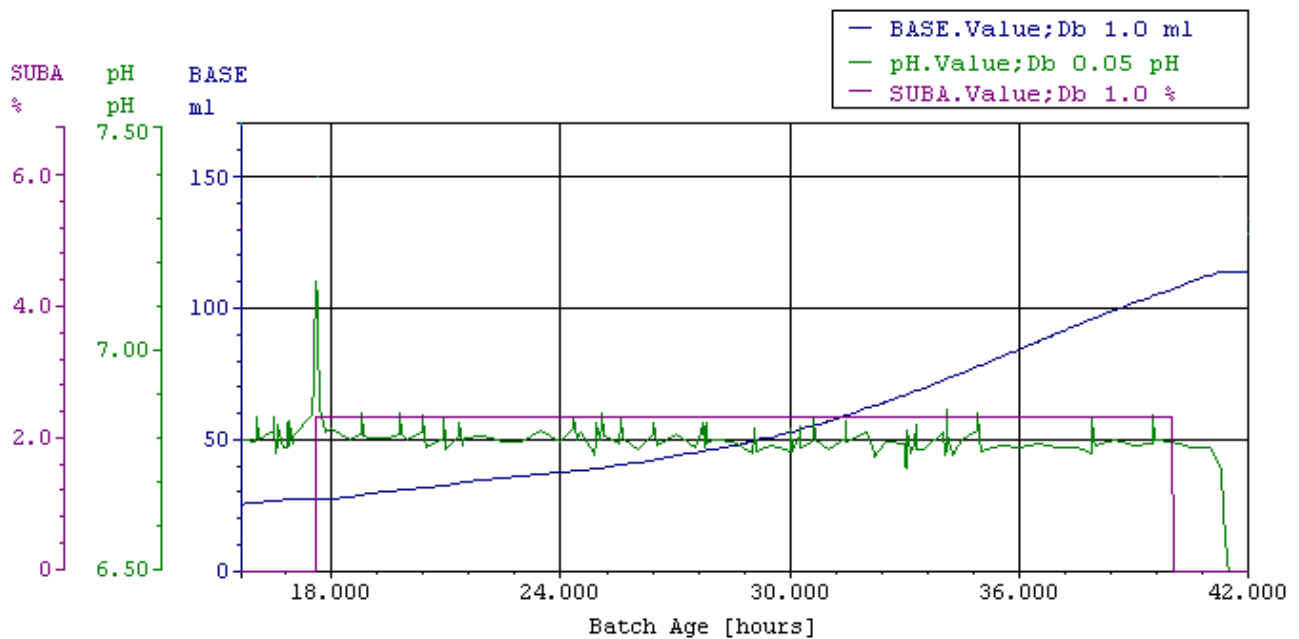


Figura 75: Andamento di pH, base e SUBA durante la fase CFB (NPF);

Come nella fase precedente l'inizio della fase di alimentazione costante [CFB] è contraddistinto dall'inizio del dosaggio dell'idrolizzato PROESA® non purificato (17,8 h) che prosegue sino al termine della prova (40 h). Il pH subisce delle costanti variazioni principalmente dovute, come visto in precedenza, al dosaggio della base e dall'acidificazione del mezzo da parte dell'addizione dell'idrolizzato (pH 4,5).

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

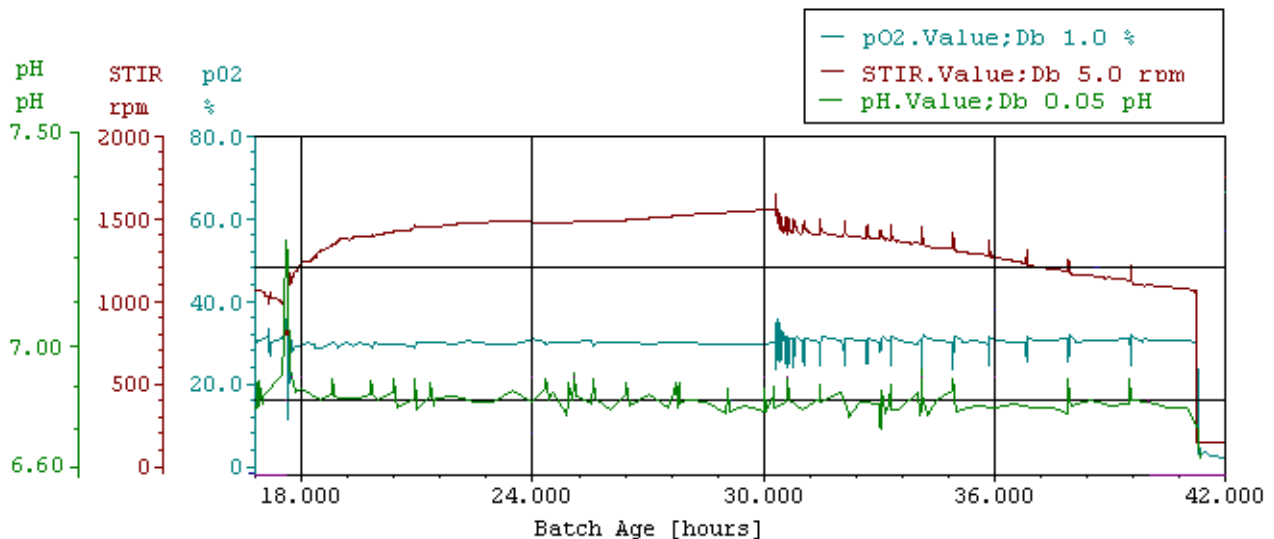


Figura 76: Andamento di pH, velocità di agitazione e ossigeno disciolto durante la fase EFB e la seconda fase batch (NPF);

I dati riportati sul grafico della fase di alimentazione costante, mostrano come ad una percentuale di ossigeno disciolto pressoché costante, corrisponda nuovamente rapido aumento della velocità di agitazione del mezzo nelle prime ore di alimentazione, che raggiunge il suo massimo (1630 rpm) dopo 12 h di alimentazione (30,2 h). Tale andamento, dovuto solo in minima parte all'aumento del volume del mezzo di coltura, conferma il proseguire della crescita della popolazione microbica. La velocità di agitazione del mezzo quindi diminuisce progressivamente, sino a raggiungere un valore di 1100 rpm al termine della fase di alimentazione costante (40 h), indice di una diminuzione del tasso di crescita all'interno della coltura cellulare.

Durante la fase di alimentazione costante sono stati prelevati due campioni di 50ml del mezzo di coltura, rispettivamente dopo 6 ore [CFB 6h] e dopo 22 ore di alimentazione [CFB 22h]. Di entrambi i campioni è stata analizzata la composizione.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		CFB 6h (dosato)	CFB 6h (misurato)	CFB 22h (dosato)	CFB 22h (misurato)
Xilobiosio	g/L	0,00	\	0,00	\
Glucosio	g/L	74,85	17,03	140,85	25,35
Xilosio	g/L	49,02	31,67	92,32	55,45
Arabinosio	g/L	1,93	1,36	3,63	0,87
Glicerolo	g/L	0,46	0,37	0,93	0,61
Acido formico	g/L	1,28	0,39	2,45	0,03
Acido lattico	g/L	0,00	2,02	0,00	3,14
Acido acetico	g/L	0,95	1,85	1,81	15,40
Etanolo	g/L	0,00	\	0,00	\
5-HMF	g/L	0,05	\	0,09	\
Furfurale	g/L	0,00	\	0,00	\
Cloruro	g/L	0,73	0,84	1,40	1,43
Nitrato	g/L	0,44	\	0,84	\
Solfato	g/L	4,83	4,21	4,22	3,13
Fosfato	g/L	1,78	\	2,51	\
Sodio	g/L	0,19	0,37	0,29	0,41
Ammonio	g/L	15,61	1,50	34,05	4,85
Potassio	g/L	7,03	7,38	12,73	12,34
Magnesio	g/L	0,21	0,22	0,41	0,42
Calcio	g/L	0,83	0,94	1,58	1,59

Tabella 54: Concentrazione teoretica ed analitica al termine della fase di crescita (NPF);

Per poter meglio valutare i consumi durante la seconda fase di crescita, i dati relativi alle concentrazioni delle diverse componenti sono stati moltiplicati per il volume del mezzo di coltura al momento del campionamento, sottraendo quindi al valore massivo ottenuto quello presenta all'inizio della fase CFB.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		CFB 6h (dosato)	CFB 6h (misurato)	Consumo [%]	CFB 22h (dosato)	CFB 22h (misurato)	Consumo [%]
Glucosio	g	50,77	17,67	65%	181,22	37,45	79%
Xilosio	g	33,90	32,86	3%	119,44	81,92	31%
Arabinosio	g	1,30	1,41	-9%	4,66	1,29	72%
Acido formico	g	1,40	0,40	71%	3,69	0,04	99%
Acido lattico	g	0,62	2,10	-237%	0,62	4,64	-645%
Acido acetico	g	2,78	1,92	31%	4,47	22,74	-408%
Etanolo	g	0,00	0,00	\	0,00	0,00	\
5-HMF	g	0,03	0,00	100%	0,11	0,00	100%
Furfurale	g	0,00	0,00	\	0,00	0,00	\

Cloruro	g	0,83	0,87	-5%	2,14	2,11	2%
Nitrato	g	0,31	0,00	100%	1,10	0,00	100%
Solfato	g	4,12	4,37	-6%	5,35	4,63	13%
Fosfato	g	0,72	0,00	100%	2,57	0,00	100%
Sodio	g	0,37	0,39	-5%	0,60	0,60	1%
Ammonio	g	7,60	1,55	80%	1,84	7,17	-291%
Potassio	g	7,51	7,66	-2%	19,02	18,24	4%
Magnesio	g	0,21	0,22	-7%	0,59	0,62	-5%
Calcio	g	0,88	0,97	-10%	2,36	2,35	1%

Tabella 55: Quantità massive e consumo percentuale delle componenti di maggiore interesse al termine della fase di crescita (NPF);

I dati relativi ai consumi di glucosio e xilosio al momento dei due campionamenti indicano un progressivo accumulo degli zuccheri dosati. Già dopo sei ore di alimentazione costante infatti solo il 40% degli zuccheri totali dosati è stata consumata, percentuale che aumenta leggermente nella seconda fase di alimentazione costante (tra le 26 e le 40 ore della prova), portando il consumo finale di zuccheri dosati nella fase di alimentazione costante al 60% del totale.

Di nostro interesse sono i dati relativi alla variazione dell'acido acetico. Sebbene infatti nella seconda parte della fase di alimentazione costante (tra le 26 e le 40 ore della prova) si riscontri un incremento della concentrazione dell'acido acetico presente, sia a causa del dosaggio dell'idrolizzato, che della produzione di acido acetico stessa, confrontando la quantità massiva [g] di acido acetico presente dopo 6 ore di alimentazione costante e l'acido acetico effettivamente dosato in queste sei ore (tenendo ovviamente conto di quello presente prima della fase CFB), è evidente un consumo di circa il 30% dell'acido acetico

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

presente all'interno del mezzo di crescita. Tale dato tuttavia non è così stupefacente, è infatti nota la capacità di *Escherichia coli* di metabolizzare acetato come fonte di carbonio alternativa.⁸⁰

Anche la quantità di acido lattico presente in questa fase subisce un notevole aumento, durante la fase di alimentazione costante infatti si ha una produzione di acido lattico in ragione di circa 4 g.

5.1.4. Valutazione finale

Oltre all'analisi della concentrazione dei vari componenti, per ogni campione è stato valutato l'ammontare del peso cellulare secco [g/L], come indice della crescita della popolazione microbica all'interno del bioreattore. Per meglio valutare il significato dei valori ottenuti in tale misurazione, nel seguente grafico, oltre al valore del peso cellulare secco (DCW), sono stati riportati il dosaggio del glucosio e il relativo accumulo.

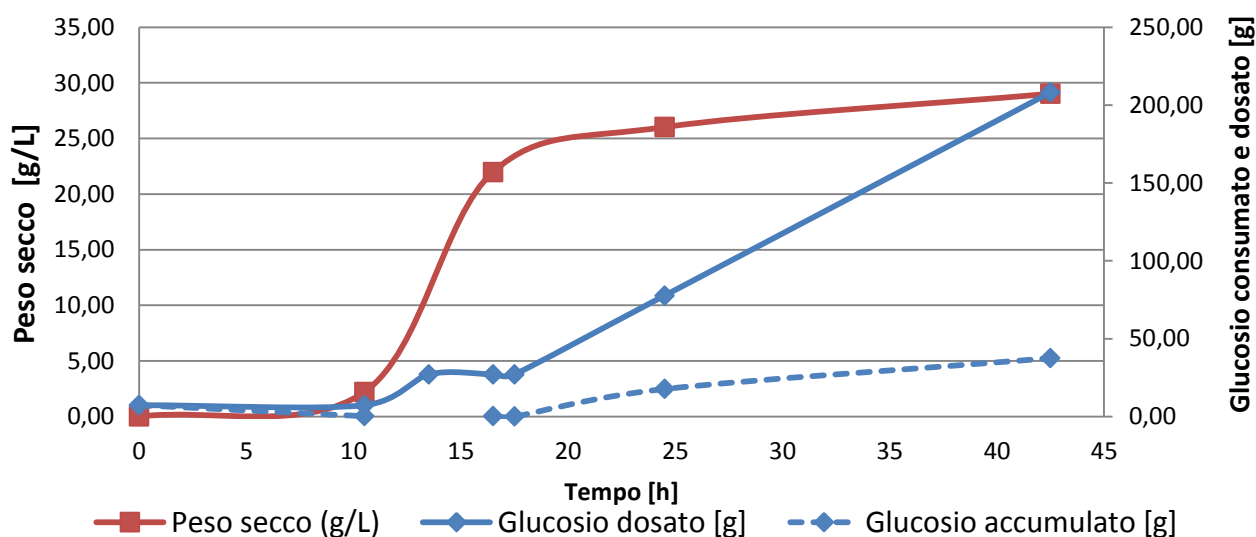


Figura 77: grafico relativo al peso cellulare secco, paragonato al glucosio dosato ed accumulato durante la prova di crescita (NPF);

L'andamento del glucosio dosato permette una facile comprensione delle differenti fasi della prova, consentendo così un'analisi più immediata dell'andamento del peso cellulare secco; come è facile notare infatti le fasi di alimentazione e crescita esponenziale durante la prova sono in perfetta sincronia (tra le 10 e le 15 ore). La coltura batterica al termine della seconda fase batch tuttavia entra nella fase di crescita stazionaria, confermato dal progressivo accumulo di glucosio all'interno del volume di crescita microbica.

⁸⁰ Acetate Metabolism by *Escherichia coli* in High-Cell-Density Fermentation; G.L. Kleman e W.R. Strohl (1994);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Considerando la concentrazione degli zuccheri e dei nutrienti (ammonio, nitrati, fosfati, sali) presenti all'interno del volume di crescita microbica, è possibile affermare che tale fase di limitazione (crescita stazionaria) sia principalmente legata alla concentrazione degli inibitori presenti all'interno del mezzo di crescita, ovvero sia quelli contenuti all'interno dell'idrolizzato non purificato, che quelli prodotti dal microrganismo stesso (acidi organici).

Considerando il progressivo accumulo di zuccheri all'interno del mezzo di coltura, è possibile osservare che al termine della prova si sono accumulati 37,5 g di glucosio (25,3 g/L) e 81,9 g di xilosio (55,45 g/L).

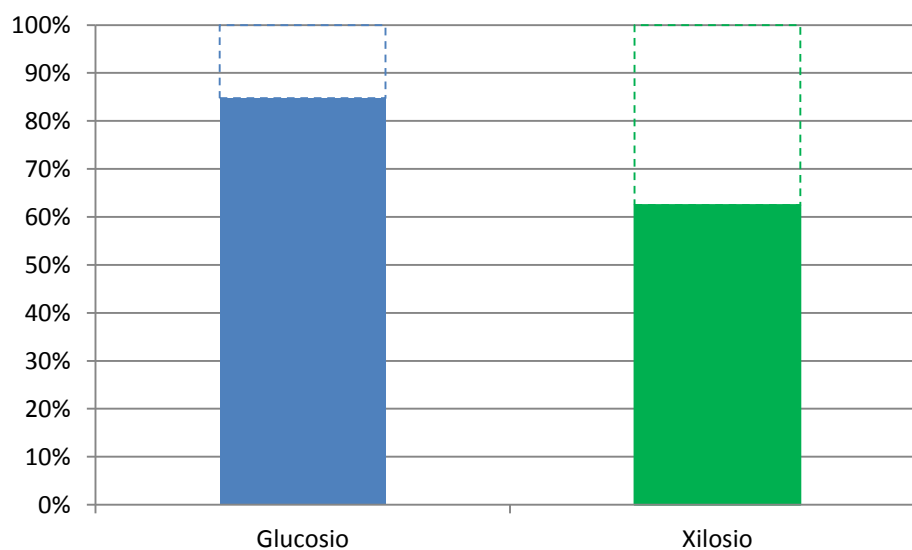


Figura 78: grafico del consumo percentuale di glucosio e xilosio al termine della prova di crescita (NPF);

Un bilancio complessivo degli zuccheri durante la crescita di *Escherichia coli* MG1655, utilizzando idrolizzato PROESA® non purificato, quindi mostra un consumo del 65% degli zuccheri totali dosati durante la prova.

5.2. Crescita in Bioreattore con idrolizzato purificato

Nel seguente paragrafo sono stati riportati i risultati ottenuti durante la prova di crescita in bioreattore, utilizzando, come fonte di zuccheri, l'idrolizzato PROESA®, che ha subito il processo di purificazione proposto all'interno di questo elaborato (PF-purified feed).

Durante la prova sono stati monitorati gli andamenti dei valori relativi al pH del mezzo di coltura (pH), alla percentuale di ossigeno disciolta (pO₂), alla velocità di agitazione del mezzo (stir), alla quantità di base

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

dosata dall'inizio della prova (base) e al dosaggio dell'idrolizzato concentrato (SUBA). Tali andamenti sono rappresentati nei grafici riportati nelle relative sottosezioni della prova.

5.2.1. Prima fase batch

Nei due grafici successivi vengono riportati i dati relativi all'andamento dei parametri monitorati durante il procedere della prova per la prima fase batch:

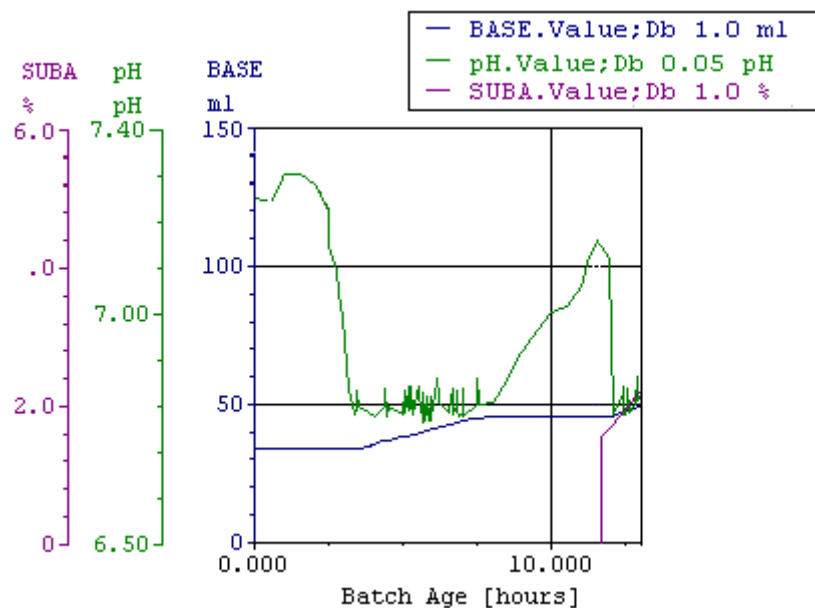


Figura 79: Andamento di pH, base e SUBA durante la prima fase batch (PF);

Il pH basico (7,30) riscontrato all'inizio della prova diminuisce rapidamente, sino a stabilizzarsi attorno al valore di 6,9 dopo due ore e mezzo. Il pH subisce delle costanti variazioni, ma dopo circa 7,5 h di crescita, il valore misurato dal piaccametro aumenta lentamente, sino a raggiungere il valore, stabilito come soglia per l'inizio della fase di alimentazione esponenziale (7,15), dopo undici ore e mezzo dall'inizio della prova. A tale picco può essere associato l'esaurimento della fonte di carbonio principale ovvero glucosio.⁸¹

⁸¹ High cell-density culture of Escherichia coli; Sang Yup Lee (1996);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

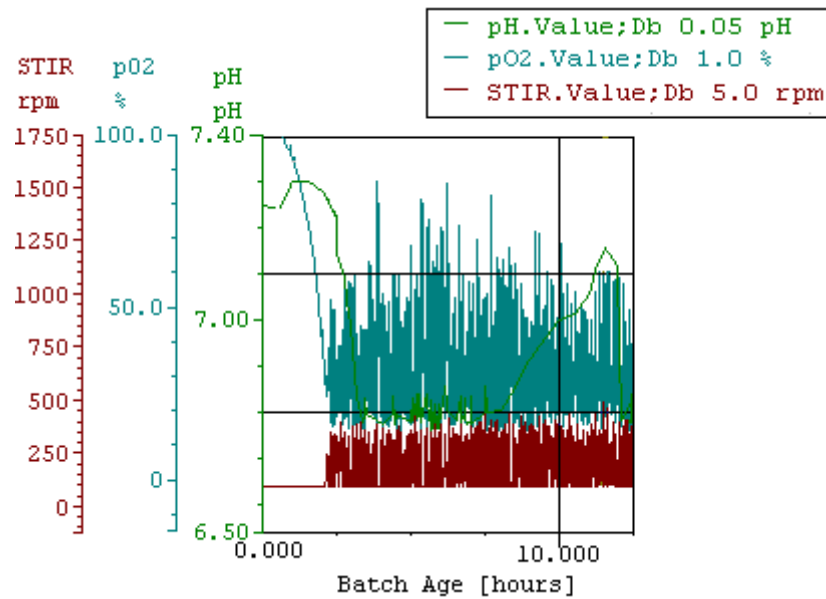


Figura 80: Andamento di pH, velocità di agitazione e ossigeno disciolto durante la prima fase batch (PF);

Durante questa prima fase di crescita l'andamento della velocità di agitazione del mezzo e della percentuale di ossigeno disciolto varia in maniera talmente repentina da impedire qualunque genere di valutazione relativamente a questi due parametri. Un simile andamento è riscontrabile anche nella prova NPF durante le prime ore di crescita. L'esperienza dei ricercatori della Biochemtex ha suggerito che un simile andamento può essere associato ad una crescita limitata, la capacità di ossigenazione da parte del sistema e la richiesta di ossigeno da parte della popolazione batterica infatti, in una crescita limitata, non riescono ad ottenere un sincrono e i parametri che regolano la percentuale di ossigeno disciolto nel mezzo oscillano in maniera incontrollabile. Tale andamento è stato riscontrato in tutte le prove in bioreattore eseguite utilizzando idrolizzato PROESA® purificato.

Al termine della fase batch è stato prelevato un campione di 50ml del mezzo di coltura del quale è stata analizzata la composizione [PRE-EFB].

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		PRE-EFB (dosato)	PRE-EFB (misurato)
Xilobiosio	g/L	0,00	0,90
Glucosio	g/L	9,32	0,00
Xilosio	g/L	5,68	3,62
Arabinosio	g/L	0,43	0,00
Glicerolo	g/L	0,18	0,09
Acido formico	g/L	0,00	0,00
Acido lattico	g/L	0,00	1,06
Acido acetico	g/L	0,00	5,23
Etanolo	g/L	0,00	1,11
5-HMF	g/L	0,02	0,00
Furfurale	g/L	0,03	0,00

Cloruro	g/L	0,12	0,15
Nitrato	g/L	0,04	0,01
Solfato	g/L	5,48	5,37
Fosfato	g/L	1,12	1,11
Sodio	g/L	0,10	0,30
Ammonio	g/L	8,87	3,31
Potassio	g/L	1,12	1,28
Magnesio	g/L	0,01	\
Calcio	g/L	0,03	0,04

Tabella 56: Concentrazione teoretica ed analitica al termine della prima fase batch (PF);

Per poter meglio valutare i consumi durante la prima fase batch, i dati relativi alle concentrazioni al termine di questa prima fase di crescita sono stati moltiplicati per il volume del mezzo di coltura, così da ottenere tali composizioni in termini massivi [g], è stato quindi valutato il consumo percentuale di ogni singola componente.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		PRE-EFB (dosato)	PRE-EFB (misurato)	Consumo [%]
Glucosio	g	7,46	0,00	100%
Xilosio	g	4,54	2,89	36%
Arabinosio	g	0,34	0,00	100%
Acido formico	g	0,00	0,00	\
Acido lattico	g	0,00	0,84	+
Acido acetico	g	0,00	4,18	+
Etanolo	g	0,00	0,89	+
5-HMF	g	0,02	0,00	100%
Furfurale	g	0,03	0,00	\

Cloruro	g	0,10	0,12	-21%
Nitrato	g	0,03	0,01	77%
Solfato	g	4,38	4,29	2%
Fosfato	g	0,90	0,89	1%
Sodio	g	0,08	0,24	-195%
Ammonio	g	3,14	2,64	16%
Potassio	g	0,90	1,02	-14%
Magnesio	g	0,01	0,00	100%
Calcio	g	0,02	0,04	-45%

Tabella 57: Quantità massive e consumo percentuale delle componenti di maggiore interesse durante la prima fase batch (PF);

I dati relativi ai consumi di glucosio e xilosio al termine della prima fase batch della crescita danno conferma di quella che è stata la valutazione del significato attribuibile al singolo picco di pH, riscontrato durante le prime ore della prova di crescita PF, ovvero il consumo completo della fonte principale di zuccheri (glucosio).

L'elevata concentrazione al termine della fase batch di acido acetico è una conseguenza del naturale processo di crescita di *Escherichia coli* MG1655.

Dati meno usuali sono la concentrazione di acido lattico e di etanolo all'interno del mezzo di crescita, le condizioni limitanti e l'oscillazione della percentuale di ossigeno presente all'interno del mezzo (scesa anche molto al di sotto del 30%), hanno infatti indotto il microrganismo presente all'interno del mezzo di coltura ad un processo di fermentazione acido-mista, producendo rispettivamente acido lattico e etanolo.⁸²

⁸² General microbiology, Cambridge University Press; Hans G. Schlegel (1993), p.315 "Mixed acid fermentation";

5.2.2. Fase di alimentazione esponenziale e seconda fase batch

Nei due grafici successivi vengono riportati i dati relativi all'andamento dei parametri monitorati durante il procedere della fase di alimentazione esponenziale e la seconda fase batch:

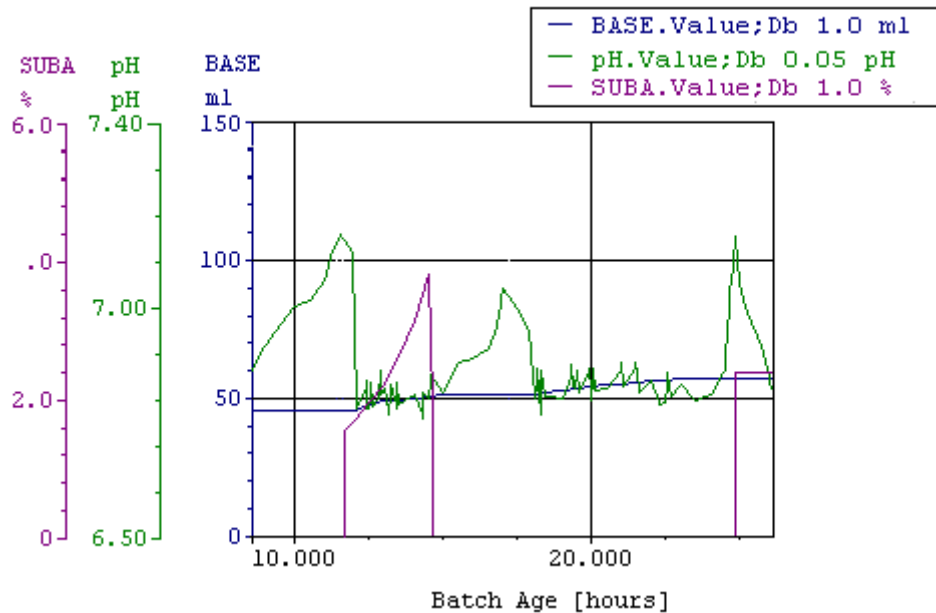


Figura 81: Andamento di pH, base e SUBA durante la fase EFB e la seconda fase batch (PF);

L'inizio della fase di alimentazione esponenziale della prova è contraddistinto dall'inizio del dosaggio dell'idrolizzato PROESA® purificato (11,5 h), che prosegue per tre ore. Osservando l'andamento del pH si nota come anche in questa prova esso subisce delle costanti variazioni.

Al termine della fase di alimentazione esponenziale ha quindi inizio una seconda fase batch.

Il pH mostra un nuovo picco al termine della fase di alimentazione esponenziale, tale parametro tuttavia non raggiunge quello che è stato impostato come valore indice dell'esaurimento della fonte di zuccheri (7,15), raggiungendo un valore massimo di 7,06 per poi diminuire rapidamente e oscillare in maniera irregolare attorno al valore di impostato dal relativo controllore (6,90). Dopo circa 10 ore dal termine della fase EFB (24,8 h) l'andamento del pH mostra un secondo picco che però supera il valore di 7,15.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

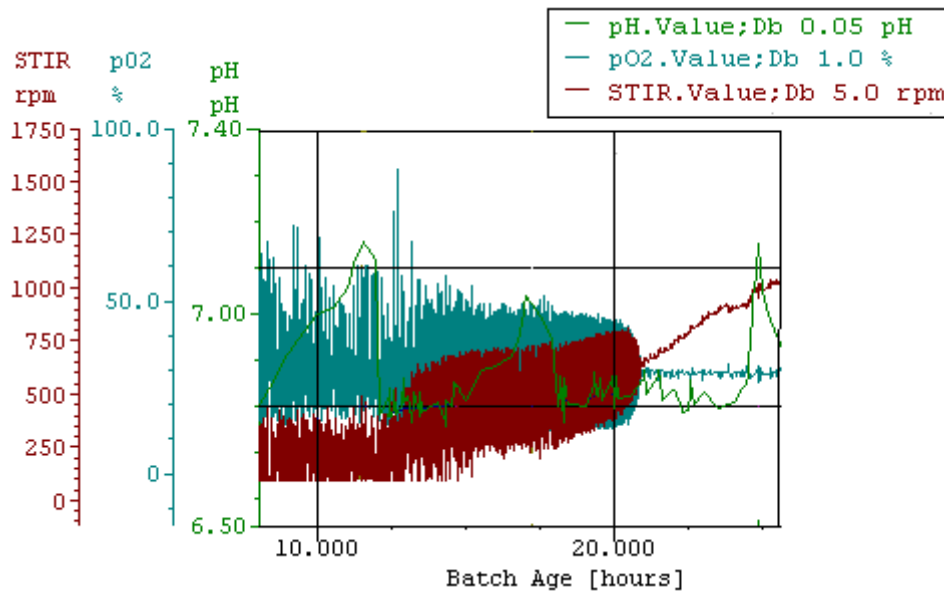


Figura 82: Andamento di pH, velocità di agitazione e ossigeno disciolto durante la fase EFB e la seconda fase batch (PF);

Anche in questa seconda fase di crescita si riscontra il medesimo andamento irregolare della velocità di agitazione e della percentuale di ossigeno disciolto, la loro oscillazione tuttavia sembra stabilizzarsi in maniera graduale durante la seconda fase batch. L'aumento del valore medio della velocità di agitazione, da 250 rpm (0-12 h) a 600 rpm (12-20 h), inoltre denota un aumento della richiesta di ossigeno da parte della coltura microbica e di conseguenza è un possibile indicatore anche dell'aumento della velocità di crescita del microrganismo.

Al termine della fase di alimentazione esponenziale [POST-EFB] ed al termine della seconda fase batch [PRE-CFB] è stato prelevato un campione di 50ml del mezzo di coltura del quale è stata analizzata la composizione.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		POST-EFB (dosato)	POST-EFB (misurato)	PRE-CFB (dosato)	PRE-CFB (misurato)
Xilobiosio	g/L	0,19	1,57	0,19	1,21
Glucosio	g/L	31,98	13,57	32,29	0,00
Xilosio	g/L	18,61	14,99	18,78	14,85
Arabinosio	g/L	1,11	0,68	1,12	0,00
Glicerolo	g/L	0,61	0,73	0,62	0,44
Acido formico	g/L	0,29	0,62	0,30	0,65
Acido lattico	g/L	0,15	4,88	0,16	1,51
Acido acetico	g/L	0,24	5,87	0,25	8,56
Etanolo	g/L	0,00	1,20	0,00	0,77
5-HMF	g/L	0,10	0,00	0,10	0,00
Furfurale	g/L	0,11	0,00	0,11	0,00

Cloruro	g/L	0,34	0,37	0,35	0,40
Nitrato	g/L	0,12	0,01	0,12	0,01
Solfato	g/L	5,20	5,03	5,19	4,85
Fosfato	g/L	1,35	1,23	1,36	0,80
Sodio	g/L	0,13	0,33	0,13	0,34
Ammonio	g/L	10,86	3,82	13,93	3,69
Potassio	g/L	1,69	1,70	1,69	1,70
Magnesio	g/L	0,02	\	0,02	\
Calcio	g/L	0,09	0,09	0,09	0,08

Tabella 58: Concentrazione teorica ed analitica al termine della seconda fase batch (PF);

Per poter meglio valutare i consumi durante la seconda fase di crescita, ai dati relativi alle composizioni delle diverse specie in termini massivi [g] durante la fase di crescita esponenziale [EFB] è stato sottratto il corrispondente valore accumulato durante la fase di crescita batch.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		POST-EFB (dosato)	POST-EFB (misurato)	Consumo [%]	PRE-CFB (dosato)	PRE-CFB (misurato)	Consumo [%]
Glucosio	g	20,52	11,87	42%	20,82	0,00	100%
Xilosio	g	14,63	13,12	10%	14,80	13,01	12%
Arabinosio	g	0,63	0,60	6%	0,64	0,00	100%
Acido formico	g	0,26	0,54	-111%	0,26	0,57	-121%
Acido lattico	g	0,98	4,26	-335%	0,98	1,32	-34%
Acido acetico	g	4,39	5,13	-17%	4,40	7,50	-71%
Etanolo	g	0,89	1,05	-18%	0,89	0,67	24%
5-HMF	g	0,07	0,00	100%	0,07	0,00	100%
Furfurale	g	0,07	0,00	100%	0,07	0,00	100%

Cloruro	g	0,32	0,33	-2%	0,32	0,35	-9%
Nitrato	g	0,08	0,01	88%	0,08	0,01	88%
Solfato	g	4,46	4,40	1%	4,46	4,25	5%
Fosfato	g	1,18	1,08	8%	1,18	0,70	41%
Sodio	g	0,27	0,29	-5%	0,27	0,30	-9%
Ammonio	g	5,05	3,34	34%	7,74	3,23	58%
Potassio	g	1,60	1,49	7%	1,61	1,49	7%
Magnesio	g	0,01	0,00	100%	0,01	0,00	100%
Calcio	g	0,09	0,08	11%	0,09	0,07	17%

Tabella 59: Quantità massive e consumo percentuale delle componenti di maggiore interesse al termine della fase EFB e al termine della seconda fase batch (PF);

I dati relativi ai consumi di glucosio e xilosio al termine della fase esponenziale sono un indice evidente della crescita limitata della coltura microbica all'interno del mezzo di crescita. Il consumo complessivo degli zuccheri dosati al termine dell'alimentazione esponenziale infatti è del 29% (per il solo glucosio è del 42%), il che spiega in maniera efficace la durata della seconda fase batch, al termine della quale il glucosio viene completamente consumato, mentre lo xilosio mostra un consumo complessivo solo del 12% (consumo totale di zuccheri 63%). Il picco di pH registrato al termine di questa seconda fase di crescita è quindi attribuibile al consumo del solo glucosio.

Anche in questa seconda fase di crescita si riscontra un notevole accumulo di acidi organici, in particolare di acido formico, acetico e lattico, tutti prodotti di una fermentazione acida mista, come l'etanolo. È tuttavia significativo confrontare la produzione di questi acidi al termine della fase di alimentazione esponenziale ed al termine della seconda fase batch.

L'elevata quantità di acido acetico prodotto nella prima fase di crescita (4,18 g) sembra diminuire drasticamente al termine della fase di alimentazione esponenziale (0,74 g), in ragione probabilmente anche

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

di un consumo di acido acetico da parte del microrganismo. Durante la seconda fase batch tuttavia si registra nuovamente una produzione consistente di questo acido organico (3,11 g).

Andamento inverso hanno invece i dati relativi alla quantità di acido lattico, che durante la prima fase batch è stato prodotto in ragione di 0,84 g, mentre durante la fase di alimentazione esponenziale ne vengono prodotti 3,30 g. La quantità massiva di questo composto al termine della seconda fase batch (1,31 g) tuttavia sembrerebbe voler evidenziare un consumo di tale acido all'interno del mezzo di coltura durante la seconda fase di crescita.

5.2.3. Fase di alimentazione costante

Nei due grafici successivi vengono riportati i dati relativi all'andamento dei parametri monitorati durante il procedere della fase di alimentazione costante:

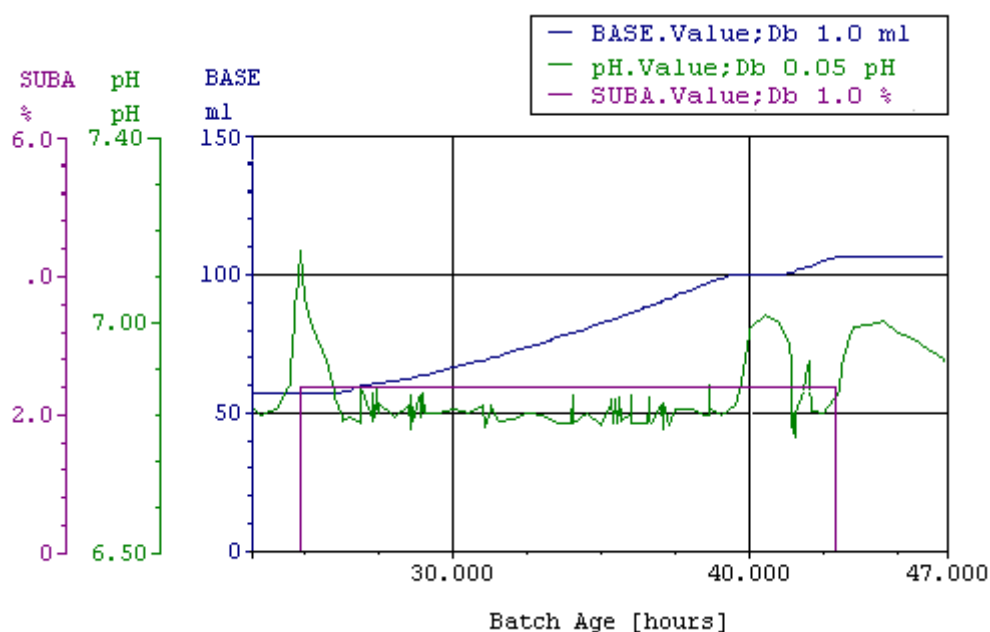


Figura 83: Andamento di pH, base e SUBA durante la fase CFB (PF);

L'inizio della fase di alimentazione costante avviene quindi dopo 24,8 ore dall'inizio della prova, che prosegue per altre 18 ore circa (42,5 h). Anche con l'utilizzo di Idrolizzato purificato il pH subisce delle costanti variazioni, principalmente dovute al dosaggio della base e dall'acidificazione del mezzo da parte dell'aggiunta dell'idrolizzato (pH 4,5). Significativo è un picco di pH (7,03) dopo circa 15 h di alimentazione, picco che si ripropone al termine del dosaggio dell'idrolizzato.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

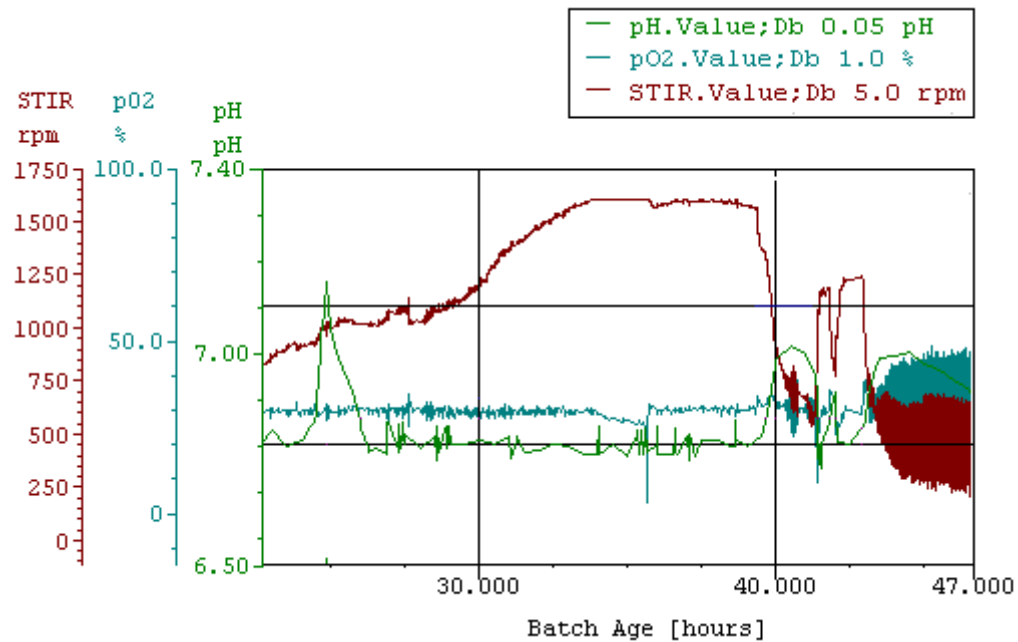


Figura 84: Andamento di pH, velocità di agitazione e ossigeno disciolto durante la fase EFB e la seconda fase batch (PF);

In questa ultima fase di crescita un andamento più stabile, sia della velocità di agitazione che della percentuale di ossigeno disciolto nel mezzo, ne permette una valutazione meno approssimativa. Osservando infatti la variazione dei due parametri durante la fase di alimentazione è possibile notare come ad una percentuale di ossigeno disciolto pressoché costante, corrisponda rapido aumento della velocità di agitazione del mezzo durante le prime 15 h di alimentazione, che raggiunge il suo massimo (1600 rpm) prima di diminuire rapidamente in concomitanza con l'aumento del pH. Tale andamento sembra testimoniare un aumento della velocità di crescita del microrganismo presente all'interno del mezzo di coltura durante le prime quindici ore di alimentazione, sino a raggiungere una situazione di limitazione di substrato (zuccheri) evidenziata dai picchi di pH nella fase finale della prova.

Durante la fase di alimentazione costante sono stati prelevati due campioni di 50ml del mezzo di coltura, rispettivamente dopo 15 ore [CFB] e dopo 18 ore di alimentazione [POST-CFB].

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		CFB 15h (dosato)	CFB 15h (misurato)	POST-CFB (dosato)	POST-CFB (misurato)
Xilobiosio	g/L	0,83	2,24	0,91	1,86
Glucosio	g/L	110,32	1,05	120,26	1,43
Xilosio	g/L	63,29	0,00	68,96	0,00
Arabinosio	g/L	3,49	0,00	3,79	1,13
Glicerolo	g/L	2,10	0,96	2,28	0,34
Acido formico	g/L	1,30	0,56	1,43	0,50
Acido lattico	g/L	0,69	0,53	0,76	0,20
Acido acetico	g/L	1,08	11,89	1,19	14,47
Etanolo	g/L	0,00	0,00	0,00	0,00
5-HMF	g/L	0,37	0,00	0,41	0,00
Furfurale	g/L	0,38	0,00	0,42	0,00
Cloruro	g/L	1,11	1,13	1,21	1,19
Nitrato	g/L	0,40	0,01	0,44	0,01
Solfato	g/L	4,23	3,19	4,11	3,07
Fosfato	g/L	2,17	0,79	2,27	0,85
Sodio	g/L	0,25	0,37	0,27	0,37
Ammonio	g/L	25,05	5,01	2,15	5,30
Potassio	g/L	3,65	3,39	3,89	3,41
Magnesio	g/L	0,07	\	0,07	\
Calcio	g/L	0,28	0,21	0,31	0,20

Tabella 60: Concentrazione teoretica ed analitica al termine della fase di crescita (PF);

Per poter meglio valutare i consumi durante la seconda fase di crescita, vengono quindi confrontati i dati relativi all'accumulo delle diverse specie, in termini massivi [g], durante la fase di alimentazione costante [CFB].

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		CFB 15h (dosato)	CFB 15h (misurato)	Consumo [%]	POST-CFB (dosato)	POST-CFB (misurato)	Consumo [%]
Glucosio	g	114,37	1,36	99%	137,28	1,97	99%
Xilosio	g	78,40	0,00	100%	91,50	0,00	100%
Arabinosio	g	3,53	0,00	100%	4,24	1,56	63%
Acido formico	g	2,00	0,73	64%	2,28	0,68	70%
Acido lattico	g	2,07	0,68	67%	2,23	0,27	88%
Acido acetico	g	8,68	15,37	-77%	8,92	19,93	-123%
Etanolo	g	0,67	0,00	100%	0,67	0,00	100%
5-HMF	g	0,39	0,00	100%	0,47	0,00	100%
Furfurale	g	0,40	0,00	100%	0,47	0,00	100%

Cloruro	g	1,49	1,46	2%	1,72	1,64	5%
Nitrato	g	0,42	0,01	97%	0,50	0,02	97%
Solfato	g	5,17	4,13	20%	5,36	4,23	21%
Fosfato	g	2,31	1,02	56%	2,63	1,17	56%
Sodio	g	0,51	0,48	5%	0,55	0,51	7%
Ammonio	g	23,43	6,47	72%	23,61	7,29	69%
Potassio	g	4,72	4,38	7%	5,36	4,69	13%
Magnesio	g	0,07	0,00	100%	0,08	0,00	100%
Calcio	g	0,36	0,27	26%	0,42	0,27	35%

Tabella 61: Quantità massive e consumo percentuale delle componenti di maggiore interesse al termine della fase di crescita (NPF);

I dati relativi ai consumi di glucosio e xilosio al momento dei due campionamenti confermano l'ipotesi dell'aumento della velocità di crescita della coltura microbica e dell'esaurimento delle fonti di zuccheri presenti all'interno del mezzo di coltura. In entrambi i campionamenti infatti la quantità di zuccheri presenti è pressoché nulla. Il consumo di glucosio e xilosio dosati durante questa terza fase di crescita infatti è del 99,3% sia dopo 15 ore di alimentazione costante, che al termine della prova.

In questa fase inoltre non si ha alcun accumulo di acido lattico o etanolo, la quantità di quest'ultimo è nulla in entrambi i campionamenti, mentre l'acido lattico mostra anche in questa terza fase di crescita un progressivo consumo.

La produzione di acido acetico inoltre rappresenta un ulteriore dato positivo durante la fase di alimentazione costante, infatti vengono prodotti solo 11 g di acido acetico, portando la concentrazione finale di acido acetico a 14,47 g/L.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Le basse produzioni di acidi in questa fase denotano quindi che l'elevato consumo di zuccheri di questa terza fase di crescita è imputabile unicamente ad un effettivo aumento della massa cellulare presente all'interno del mezzo di coltura e non ad una conversione degli zuccheri in acidi o alcoli per via fermentativa.

5.2.4. Valutazione finale

Oltre all'analisi della concentrazione dei vari componenti, per ogni campione è stato valutato l'ammontare del peso cellulare secco [g/L], come indice della crescita della popolazione microbica all'interno del bioreattore. Per meglio valutare il significato dei valori ottenuti in tale misurazione nel seguente grafico, oltre al valore del peso cellulare secco (DCW), sono stati riportati il dosaggio del glucosio e il relativo accumulo.

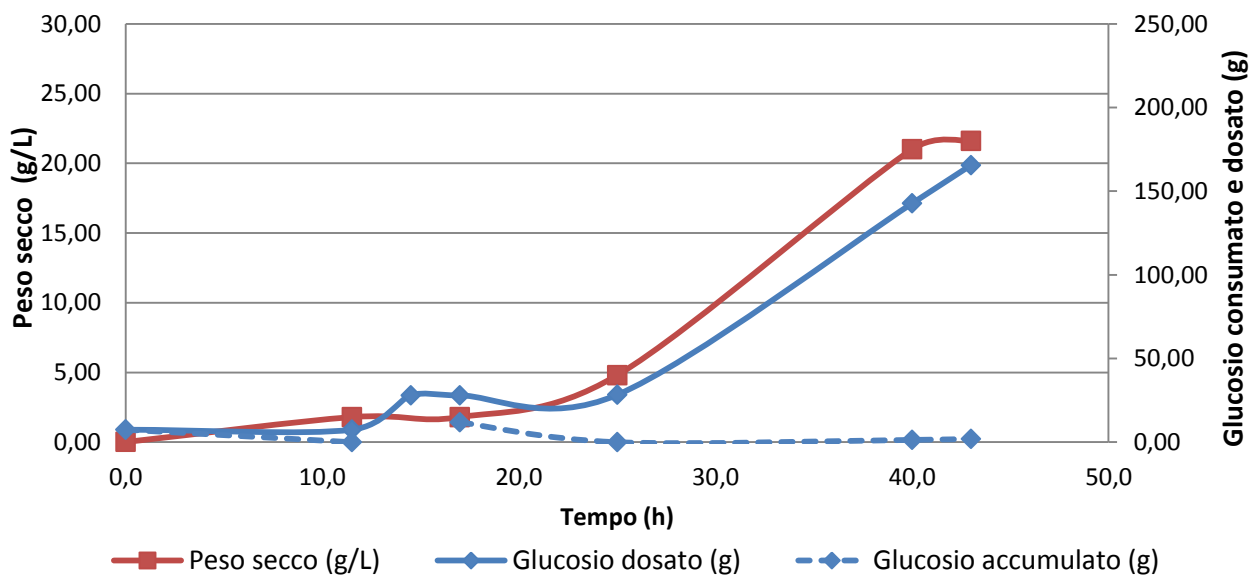


Figura 85: grafico relativo al peso cellulare secco, paragonato al glucosio dosato ed accumulato durante la prova di crescita (PF);

L'andamento del glucosio dosato permette una facile comprensione delle differenti fasi della prova, consentendo così un'analisi più immediata dell'andamento del peso cellulare secco. Osservando l'andamento del DWC si nota come la crescita esponenziale sia sfalsata, rispetto a quanto previsto, di circa 15 ore (inizio alimentazione esponenziale 11,5 ore, inizio crescita esponenziale 24 ore). Ciò è dovuto principalmente alla crescita limitata, che si è verificata durante la prima fase batch. La mancanza di nutrienti è una possibile causa di tale limitazione. Osservando nuovamente l'andamento della

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

concentrazione degli ioni presenti in soluzione all'interno del mezzo di crescita è possibile individuarne la causa:

		PRE-EFB (analitica)	POST-EFB (analitica)	PRE-CFB (analitica)	CFB 15h (teoretica)	POST-CFB (analitica)
Cloruro	g/L	0,15	0,37	0,40	1,13	1,19
Nitrito	g/L					
Bromuro	g/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Nitrato	g/L	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Solfato	g/L	5,37	5,03	4,85	3,19	3,07
Fosfato	g/L	1,11	1,23	0,80	0,79	0,85
Sodio	g/L	0,30	0,33	0,34	0,37	0,37
Ammonio	g/L	3,31	3,82	3,69	5,01	5,30
Potassio	g/L	1,28	1,70	1,70	3,39	3,41
Magnesio	g/L					
Calcio	g/L	0,04	0,09	0,08	0,21	0,20

Tabella 62: Concentrazione degli ioni in soluzione durante la prova di crescita (PF);

La concentrazione del magnesio durante tutta la prova è risultata nulla sebbene sia all'interno dell'idrolizzato usato come fonte di zuccheri per la prima fase batch, che per l'alimentazione fosse presente in basse concentrazioni (rispettivamente 0,01 g/L e 0,16 g/L). Il magnesio tuttavia è un nutriente fondamentale per il processo di crescita microbica, esso infatti è utilizzato come cofattore nell'enzima *esochinasi*⁸³, nell'enzima *fosfoglicerato mutasi*⁸⁴ e stimola l'azione dell'enzima *enolasi*⁸⁵, tre enzimi presenti all'interno del pathway enzimatico della glicolisi ed inoltre regola l'attività dell'enzima *isocitrato deidrogenasi*⁸⁶ nel ciclo di Krebs.⁸⁷

È evidente inoltre come, a seguito dell'inizio della fase di alimentazione costante (25 h), l'apporto di una quantità sufficiente di magnesio al mezzo di coltura abbia consentito al microrganismo di svilupparsi secondo quelle che sono condizioni di crescita migliori. La coltura batterica si è quindi portata in una fase di crescita esponenziale, perdurata sino al raggiungimento di una seconda fase di limitazione (40 h). Sebbene infatti non ci sia possibile descrivere in maniera esaustiva l'andamento del peso cellulare secco o della

⁸³ Enzima della classe delle transferasi, che catalizzano la reazione di ingresso del glucosio nella glicolisi, con consumo di ATP, in presenza di ioni magnesio: $\text{glucosio} + \text{ATP}(\text{Mg}^{2+}) \rightarrow \text{glucosio-6-fosfato} + \text{ADP}$;

⁸⁴ Enzima della classe delle mutasi, cioè un enzima appartenente al gruppo delle isomerasi, che catalizza l'ottava reazione della glicolisi. Converte, infatti, il 3-fosfoglicerato in 2-fosfoglicerato: $3\text{-fosfo-D-gliceroil fosfato} \rightarrow 2,3\text{-isfosfo-D-glicerato}$;

⁸⁵ Enzima della classe delle liasi, che catalizza la seguente reazione: $2\text{-fosfo-D-glicerato} \rightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + \text{H}_2\text{O}$;

⁸⁶ Enzima della classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione: $\text{isocitrato} + \text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{-ossoglutarato} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$;

⁸⁷ I principi di biochimica di Lehninger; Zanichelli; D.L. Nelson e M.M. Cox (2010);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

concentrazione di zuccheri all'interno del mezzo di crescita (in mancanza dei dati intermedi tra le 25 e le 40 ore) è evidente che la quantità di zuccheri dosati, non sufficiente a supportare la crescita a velocità elevata del microrganismo, abbia generato una limitazione da substrato durante la parte terminale della prova di crescita (tra le 40 e le 43 h).

La crescita infatti non sembra entrare in una fase stazionaria, l'andamento della curva di crescita relativa al peso cellulare secco è principalmente attribuibile alla mancanza di zuccheri. Nel successivo grafico sono riportati i consumi percentuali di glucosio e xilosio dosati durante la prova di crescita, avvenuta utilizzando idrolizzato purificato come fonte di zuccheri.

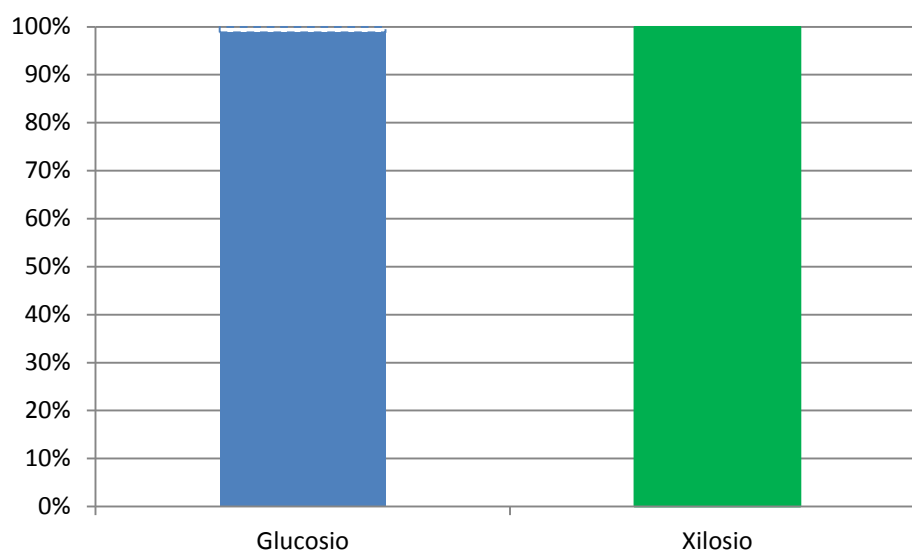


Figura 86: grafico del consumo percentuale di glucosio e xilosio al termine della prova di crescita (PF);

Un bilancio complessivo degli zuccheri durante la crescita di *Escherichia coli* MG1655, utilizzando idrolizzato PROESA® purificato, infatti mostra un consumo del 99,2% degli zuccheri dosati durante la prova.

5.3. Confronto della crescita con idrolizzato non purificato e con idrolizzato purificato

Per effettuare un confronto significativo tra le due prove precedentemente presentate, è necessaria una breve premessa riguardo a quelli che sono i dati effettivamente confrontabili delle due prove. Come è stato possibile notare infatti, sebbene le due prove siano state condotte in macrocondizioni identiche (temperatura, inoculo, terreno di crescita), non possono essere paragonate in maniera immediata, esse infatti hanno avuto tempistiche notevolmente differenti ed hanno raggiunto valori differenti di volume finale, al quale corrisponde quindi anche un dosaggio di idrolizzato e di zuccheri non direttamente

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

paragonabile. La prova con idrolizzato purificato inoltre ha subito una forte limitazione durante la fase batch, sfalsando l'inizio della crescita esponenziale della coltura batterica di 15 ore rispetto a quanto atteso, non è possibile quindi confrontare i dati relativi al termine delle differenti fasi di crescita, poiché avvenute in momenti della prova differenti.

Per effettuare quindi un confronto significativo dei dati raccolti è stato necessario considerare la produzione ed il consumo dei singoli componenti in base al peso cellulare secco raggiunto al termine della prova.

Si consideri quindi da prima il valore del peso cellulare secco raggiunto dalle due differenti prove:

- ✓ Crescita con idrolizzato non purificato (NPF): 27,2 g/L di peso cellulare secco;
- ✓ Crescita con idrolizzato purificato (PF): 21,6 g/L di peso cellulare secco;

Nella valutazione del valore del peso cellulare secco delle due differenti prove, va considerato che la prova con idrolizzato non purificato ha raggiunto la fase di crescita stazionaria, il che rende il valore ottenuto da tale prova il massimo raggiungibile da *Escherichia coli* MG1655 utilizzando un idrolizzato non purificato come fonte di zuccheri in queste specifiche condizioni. La crescita con idrolizzato non purificato invece, al termine della prova, ha raggiunto una limitazione da substrato, con un dosaggio di zuccheri più elevato quindi avrebbe permesso il raggiungimento di una massa cellulare maggiore.

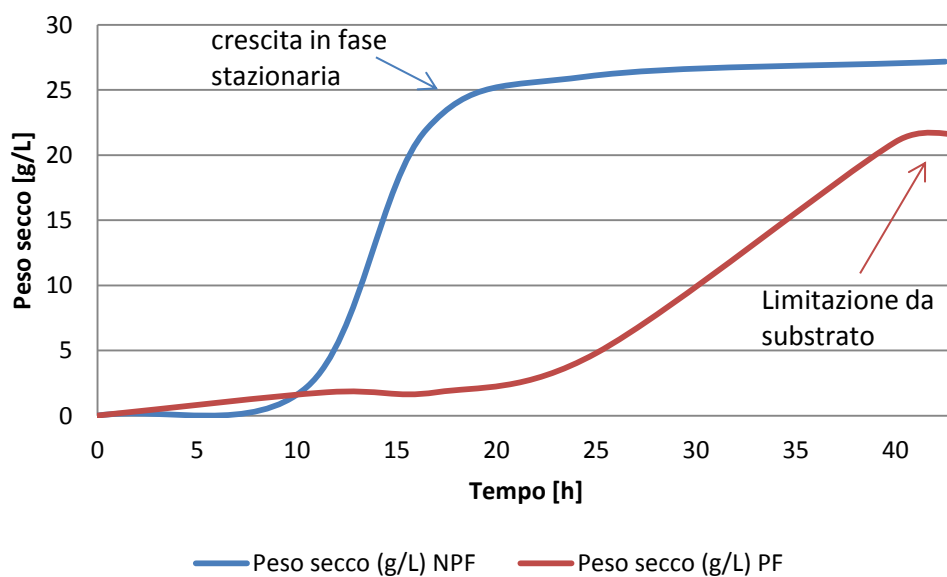


Figura 87: Grafico relativo al peso cellulare secco della prova NPF ed PF a confronto;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Confrontando quindi l'andamento del valore del peso cellulare secco delle due crescite durante le corrispondenti prove, risulta evidente come la limitazione da nutriente, dovuta alla mancanza di magnesio (Mg), nella prova con idrolizzato purificato (PF), abbia comportato una lunga fase di crescita limitata (0-25 h). Mentre la crescita con idrolizzato non purificato (NPF) raggiunge la fase esponenziale dopo circa 10 ore, la popolazione batterica nella prova PF raggiunge la medesima fase circa alle 25h, quando la fase di alimentazione costante (CFB) garantisce un apporto di magnesio sufficiente per superare la fase limitante.

Osservando l'andamento delle due curve sembrerebbe inoltre che la velocità di crescita esponenziale della prova PF sia ridotta rispetto a quella garantita dalla prova NPF ($\mu = 0,38$ [1/h]), tale sensazione tuttavia è dovuta unicamente alla mancanza di dati relativi all'intervallo di tempo tra le 25 e le 40 ore, nelle quali non è stato possibile prelevare un campione della coltura per analizzare il peso cellulare secco, non siamo in grado quindi di calcolare in quale momento sia sopraggiunta la fase di limitazione da substrato, in seguito all'ingresso in fase di crescita esponenziale del microrganismo durante la prova.

Nel seguente grafico vengono riportate le curve di andamento della crescita della prova PF considerando una velocità di crescita in fase esponenziale rispettivamente di 0,20 [1/h] e 0,38 [1/h].

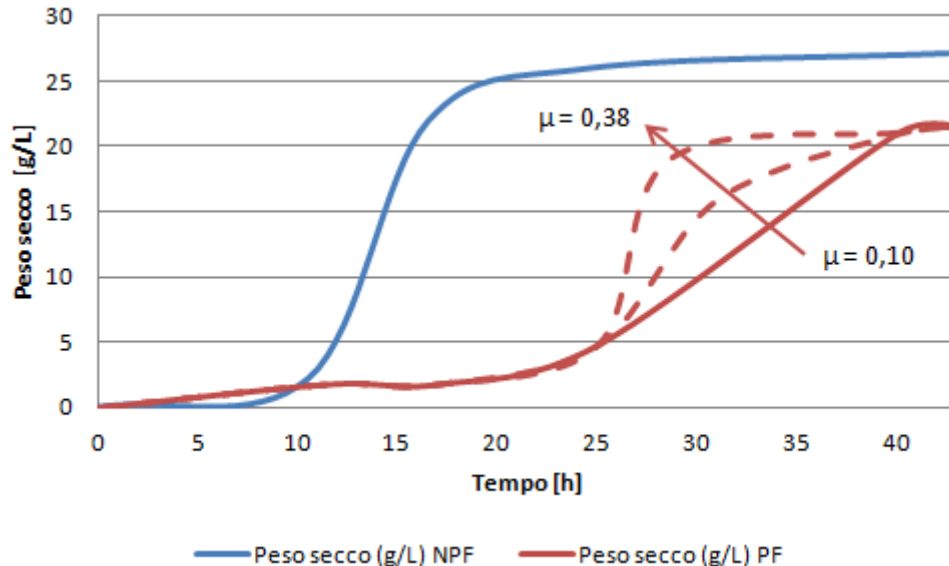


Figura 88: Valutazione della variazione nella velocità di crescita esponenziale nella prova PF;

Un secondo risultato, che appare significativo in termini quantitativi e qualitativi, è il consumo percentuale degli zuccheri dosati durante la crescita, ovvero la quantità di zuccheri metabolizzata dal microrganismo, in relazione alla quantità di zuccheri dosata durante la crescita dello stesso:

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

✓ Crescita con idrolizzato non purificato (NPF):

- Glucosio consumato: 82,0 %
- Xilosio consumato: 39,9 %
- Zuccheri totali consumati: 65,3 %

✓ Crescita con idrolizzato purificato (PF):

- Glucosio consumato: 98,9 %
- Xilosio consumato: 100 %
- Zuccheri totali consumati: 99,2 %

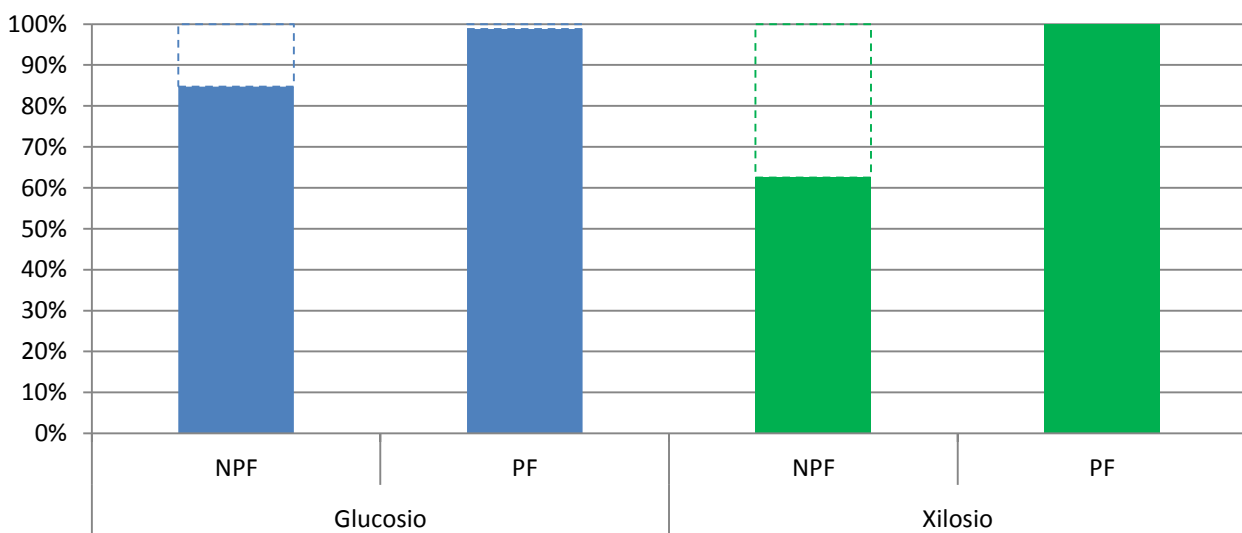


Figura 89: Confronto del consumo percentuale di glucosio e xilosio per la prova NPF e PF;

Quasi la totalità degli zuccheri, dosati durante la prova con idrolizzato purificato, sono stati consumati dal microrganismo, questi dati testimoniano come le condizioni di crescita finali durante la prova con idrolizzato purificato (PF) fossero notevolmente migliori rispetto a quelle della crescita con idrolizzato non purificato (NPF).

Per comprendere la ragione di tale condizione di crescita è necessario confrontare, oltre che il consumo degli zuccheri, anche i dati relativi all'effettiva produzione di biomassa e di inibitori dovuta al consumo di queste fonti di carbonio.

I primi dati che possono essere confrontati risultano quindi le quantità di biomassa prodotta (DWC) in rapporto agli zuccheri dosati. Dividendo il valore del peso cellulare secco per la concentrazione degli

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

zuccheri dosati, si ottiene il valore relativo ai grammi biomassa prodotti (g_b) per la ogni grammo di zucchero speso (g_z):

$$\text{resa in biomassa su zucchero} \left[\frac{g}{g} \right] = \frac{\text{biomassa prodotta [g]}}{\text{zuccheri dosati [g]}}$$

- ✓ Crescita con idrolizzato non purificato (NPF): 0,12 g_b/g_z resa in biomassa su zucchero;
- ✓ Crescita con idrolizzato purificato (PF): 0,11 g_b/g_z resa in biomassa su zucchero;

I valori ottenuti per le due prove sono sostanzialmente paragonabili. Inoltre considerando i limiti di incertezza relativa derivati dalle metodologie di analisi condotte per il calcolo del dosaggio degli zuccheri e il peso cellulare secco, i due numeri risultano a tutti gli effetti identici.

Quindi possono essere confrontati i valori relativi alla quantità di acidi prodotti (g_a). Tale produzione infatti è indice di una crescita in condizioni non ottimali per il microrganismo, dovuta ad un eccesso di zuccheri presenti all'interno del mezzo di coltura (accumulo degli zuccheri dosati), o di una concentrazione eccessiva di inibitori, o di una crescita limitata. Confrontando quindi la quantità di questi inibitori prodotta in ragione del peso di biomassa secca raggiunto dalle due prove:

$$\text{produzione relativa di acidi organici} \left[\frac{g}{g} \right] = \frac{\text{acido lattico prodotto [g]} + \text{acido acetico prodotto [g]}}{\text{biomassa [g]}}$$

- ✓ Crescita con idrolizzato non purificato (NPF): 0,58 g_a/g_b produzione di acidi organici su biomassa;
- ✓ Crescita con idrolizzato purificato (PF): 0,59 g_a/g_b produzione di acidi organici su biomassa;

I dati relativi a produzione, consumi e rese delle due prove risultano del tutto paragonabili, sebbene la prova che utilizza un idrolizzato purificato (PF) abbia riscontrato una notevole limitazione durante la fase di crescita iniziale.

Se infatti si osservano i medesimi valori, ma relativi unicamente alla fase finale di crescita, ovvero la fase di alimentazione costante (CFB) si nota una differenza decisamente più marcata:

- ✓ CFB con idrolizzato non purificato (NPF):
 - 0,07 g_b/g_z resa in biomassa su zucchero;
 - 0,95 g_a/g_b produzione di acidi organici su biomassa;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

- ✓ CFB con idrolizzato purificato (PF):
 - 0,11 g_b/g_z resa in biomassa su zucchero;
 - 0,34 g_a/g_b produzione di acidi organici su biomassa;

Tale confronto risulta maggiormente significativo qual'ora si considera che: è proprio durante la fase di alimentazione costante (CFB) che avviene l'effettiva sintesi dei prodotti di interesse in un processo di fermentazione.

Un altro dato altrettanto importante nel confronto dei risultati ottenuti dai due differenti idrolizzati, riguarda in maniera più diretta proprio il loro utilizzo. È possibile infatti confrontare la concentrazione degli inibitori finali, ovvero gli acidi organici (g_a) ed i sali (g_s), in relazione alla quantità di zuccheri dosati (g_z). Tale rapporto permette di comprendere a quale dose di inibitori si sottopone un microrganismo al consumo di ogni grammo di zucchero.

- ✓ Idrolizzato non purificato (NPF):
 - 0,08 g_a/g_z grammi di acidi organici presenti, per grammo di zucchero dosato;
 - 0,10 g_s/g_z grammi di sali dosati, per grammo di zucchero;
- ✓ Idrolizzato purificato (PF):
 - 0,08 g_a/g_z grammi di acidi organici presenti, per grammo di zucchero dosato;
 - 0,07 g_s/g_z grammi di sali dosati, per grammo di zucchero;

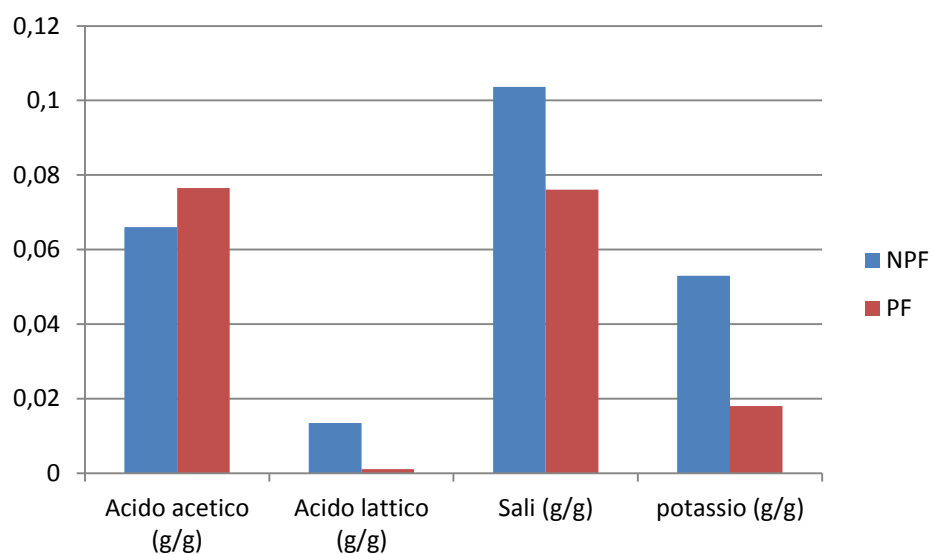


Figura 90: Inibitori presenti al termine della crescita rapportati agli zuccheri dosati;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Come è possibile notare dal confronto dei risultati ottenuti dai due idrolizzati, la quantità relativa alla produzione ed al dosaggio di acidi organici appare del tutto paragonabile, mentre il dosaggio di sali, mediato sul medesimo parametro, comporta per l'idrolizzato purificato un miglioramento di circa il 30%, principalmente attribuibile alla ridotta quantità di potassio (g_p 70%) presente all'interno dell'idrolizzato purificato.

In ragione di tali dati è possibile ipotizzare che le migliori condizioni di crescita finali della prova PF siano principalmente dovute alla quantità ridotta di sali.

BIBLIOGRAFIA

- [1] High cell-density culture of *Escherichia coli*; Sang Yup Lee (1996). Trends Biotechnol. 1996 Mar;14(3):98-105.;
- [2] Acetate Metabolism by *Escherichia coli* in High-Cell-Density Fermentation; G.L. Kleman e W.R. Strohl (1994). Appl Environ Microbiol. Nov 1994; 60(11): 3952–3958.;
- [3] Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions; Je-Nie Phue e Joseph Shiloach (2005). Metab Eng. 2005 Sep-Nov;7(5-6):353-63. Epub 2005 Aug 11.;
- [4] General microbiology, Cambridge University Press; Hans G. Schlegel (1993), p.315 “Mixed acid fermentation”;
- [5] I principi di biochimica di Lehninger; Zanichelli; D.L. Nelson e M.M. Cox (2010);

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Come anticipato nella prefazione di questo elaborato, l'obiettivo di questo progetto di tesi viene efficacemente riassunto dal suo titolo "Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita", lo scopo di questo progetto è stato infatti quello di individuare un sistema di purificazione per la riduzione della concentrazione di sostanze, riconosciute come inibitori della crescita microbica, contenute all'interno di un idrolizzato prodotto con biomasse di seconda generazione, al fine di migliorare le prestazioni durante un processo di crescita batterica, che utilizza come fonte di zuccheri tale idrolizzato.

Per raggiungere tale obiettivo è stata innanzitutto condotta una prima attività in bio-laboratorio, per studiare l'effetto di quelli che sono ritenuti i principali inibitori della crescita di *Escherichia coli* MG1655 contenuti all'interno dell'idrolizzato PROESA®, ovvero acido acetico, acido formico e potassio. Sono state quindi condotte quindici prove di crescita in beute da 500ml utilizzando un terreno commerciale denominato M9YE (100ml) ed aggiungendo come fonte di zuccheri l'idrolizzato PROESA® in ragione di una concentrazione finale di glucosio di 20 g/L. A tale concentrazione di zuccheri tuttavia la quantità corrispondente di acido acetico (0,65 g/L), acido formico (0,35 g/L) e potassio (1 g/L) non sarebbe sufficiente per condurre un'analisi accurata degli effetti di tali inibitori in un processo di fermentazione, ne tantomeno sarebbe possibile effettuare tali valutazioni addizionando questi tre inibitori attraverso il dosaggio di ulteriore idrolizzato, poiché, oltre all'effetto inibente della concentrazione di questi tre composti, si verrebbe a valutare anche l'effetto dell'addizione di ulteriori zuccheri e altri inibitori (sali). Ai terreni di coltura sono state quindi addizionate soluzioni sintetiche dei soli tre inibitori, a differenti dosaggi, così da vagliare l'effetto di questi in quelli che sono ritenuti i range di possibile concentrazione in un processo di fermentazione condotto in scala di laboratorio.

A seguito delle prove condotte è stato possibile osservare che:

- ✓ Il grado di inibizione risulta *non accettabile* quando la concentrazione di acido acetico ed acido formico supera rispettivamente i valori di soglia di 2,79 g/L e 0,87 g/L e la concentrazione di potassio è superiore a 3,37 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione non risulta influenzato dalla concentrazione di potassio quando almeno la concentrazione di uno degli acidi organici supera i valori di soglia (2,79 g/L per l'acido acetico e 0,87 g/L per l'acido formico). Mentre l'effetto della concentrazione del potassio sembra più evidente

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

quando la concentrazione di acido acetico è inferiore a 1,95 g/L o la concentrazione di acido formico è inferiore a 0,61 g/L;

- ✓ Il grado di inibizione risulta *elevato* a concentrazione di potassio di 1,35 g/L, di acido acetico di 1,95 g/L ed a concentrazioni di acido formico superiori a 0,61 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta variare tra *lieve* e *moderato* a concentrazione di potassio di 1,35 g/L , di acido acetico di 1,12 g/L ed a concentrazioni di acido formico superiori a 0,61 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta *non accettabile* a concentrazione di potassio di 5,39 g/L, di acido acetico di 1,95 g/L ed a concentrazioni di acido formico superiori a 0,87 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta variare tra *elevato* e *moderato* a concentrazione di potassio di 1,35 g/L, di acido formico di 0,35 g/L ed a concentrazioni di acido acetico comprese tra 5,58 g/L e 1,95 g/L;
- ✓ Il grado di inibizione risulta *non accettabile* a concentrazione di potassio di 5,39 g/L, di acido formico di 0,61 g/L ed a concentrazioni di acido acetico superiori a 4,46 g/L;

I risultati raggiunti sono stati quindi efficacemente riproporti nella seguente tabella, dove ai differenti gradi di inibizione viene associato un colore differente, distinguendo i dati relativi a prove sperimentali, dai dati desunti in base ai risultati delle prove effettuate. Secondo la seguente legenda:

	Grado di inibizione	Valore cromatico
sperimentale	lieve inibizione	
	inibizione moderata	
	inibizione elevata	
	inibizione non accettabile	
ipotesi	lieve inibizione	
	inibizione moderata	
	inibizione elevata	
	inibizione non accettabile	

Tabella 63: Legenda relativa al valore cromatico dei gradi di inibizione per prove sperimentali e ipotesi effettuate;

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

		Acido formico [g/L]						
		1,74	1,39	0,87	0,61	0,35		
Acido acetico [g/L]	5,58	1	5	9	13	17	6,73	Potassio [g/L]
		2	6	10	14	18	5,39	
		3	7	11	15	19	3,37	
		4	8	12	16	20	1,35	
4,46	21	25	29	33	37	6,73		
	22	26	30	34	38	5,39		
	23	27	31	35	39	3,37		
	24	28	32	36	40	1,35		
2,79	41	45	49	53	57	6,73		
	42	46	50	54	58	5,39		
	43	47	51	55	59	3,37		
	44	48	52	56	60	1,35		
1,95	61	65	69	73	77	6,73		
	62	66	70	74	78	5,39		
	63	67	71	75	79	3,37		
	64	68	72	76	80	1,35		
1,12	81	85	89	93	97	6,73		
	82	86	90	94	98	5,39		
	83	87	91	95	99	3,37		
	84	88	92	96	100	1,35		

Tabella 64: Tabella riassuntiva dei gradi di inibizioni dovuti a acido acetico, acido formico e potassio a diverse concentrazioni (dati sperimentali ed ipotesi);

Sono stati quindi testati differenti sistemi di purificazione, in scala di laboratorio, per ridurre la concentrazione dei principali inibitori all'interno dell'idrolizzato utilizzato come fonte di zuccheri per processi di produzione attraverso l'utilizzo di microrganismi.

Il loro eventuale beneficio ai fini di un processo di crescita micorbica è stato quindi valutato, in ragione dei risultati della prima attività condotta sulla crescita di *Escherichia coli*. I sistemi testati a livello di laboratorio ed a livello di impianto pilota, sono stati quindi vagliati, oltre che secondo quello che sarebbe stato il loro effettivo beneficio nel processo di fermentazione, anche attraverso alcune valutazioni di tipo processistico economiche, che hanno permesso di selezionare una metodologia di purificazione che, oltre ad essere efficace, potesse risultare anche pratica e non eccessivamente onerose.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Da tali caratteristiche nasce quindi l'idea di un sistema di purificazione che preveda da prima la decationizzazione dell'idrolizzato PROESA®, utilizzando una resina cationica forte, ed in seguito la sua filtrazione, utilizzando una membrana di osmosi inversa.

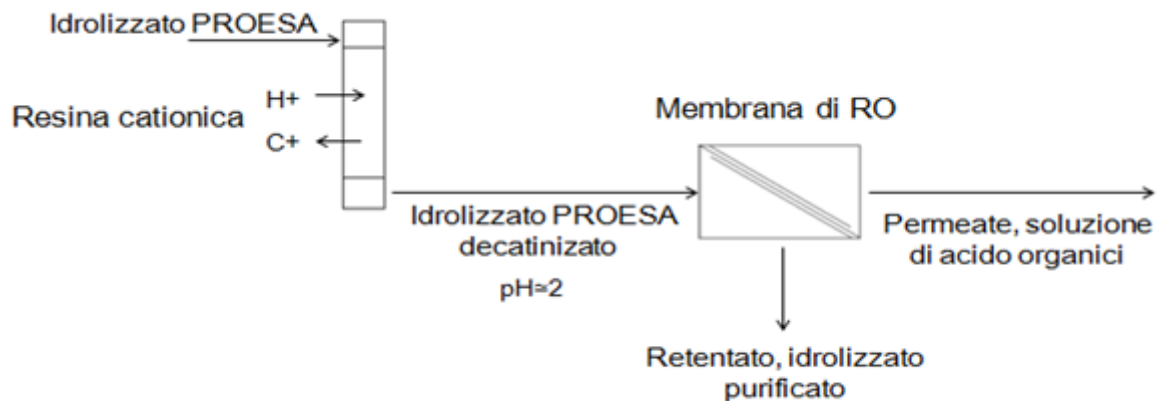


Figura 91: Schema impianto di purificazione per l'idrolizzato PROESA®;

Utilizzando una resina cationica forte (EXA 14 RELITE), lo scambio dei cationi contenuti nell'idrolizzato PROESA® con ioni idrogeno (H⁺), riduce infatti la concentrazione dei sali all'interno dello stream zuccherino, abbassandone inoltre il pH (pH<2). In queste condizioni il processo di osmosi inversa, utilizzando una membrana RO98 della Alfa Laval, mostra una ritenzione del 99% degli zuccheri monometrici (glucosio e xilosio), una rimozione efficace degli acidi organici.

Al termine del processo di purificazione i dati relativi al confronto dell'idrolizzato di partenza con quello purificato rivelano una rimozione del 36% dell'acido acetico, del 74% dell'acido formico ed una riduzione del 62% della concentrazione di sali presenti in soluzione, con una rimozione per il solo potassio di oltre il 69%. Riportando i risultati ottenuti sulla tabella dei gradi di inibizione, è possibile osservare che, a seguito del processo di purificazione, in una crescita di *Escherichia coli* MG1655, nelle condizioni testate durante le prove in beuta, il grado di inibizione atteso si ridurrebbe dal valore *non accettabile* (Idrolizzato PROESA®), al valore *moderato* (Idrolizzato purificato).

A seguito di tale processo di purificazione sono state elaborate quindi due prove di crescita in bioreattore adoperando le medesime condizioni di crescita, ma utilizzando come fonti di zuccheri due idrolizzati differenti: in una prima prova l'idrolizzato PROESA® non purificato ed in una seconda prova l'idrolizzato PROESA® purificato. Non ci è stato tuttavia possibile effettuare questo confronto a causa di una contaminazione dell'idrolizzato purificato. L'effettivo grado di purificazione per gli acidi organici

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

dell'idrolizzato testato quindi è stato ridotto a solo il 20% per l'acido acetico ed a poco più del 35% per l'acido formico.

I dati raccolti a seguito delle due prove in bioreattore, utilizzando quindi l'idrolizzato PROESA® non purificato (NPF) e l'idrolizzato PROESA® purificato e decontaminato (PF), sono stati messi a confronto per valutare l'effetto di questo grado di purificazione in un processo di crescita di *Escherichia coli* MG1655.

Per effettuare un primo confronto dei dati raccolti, si consideri il valore del peso cellulare secco raggiunto dalle due differenti prove. La crescita con idrolizzato non purificato (NPF) ha raggiunto un valore di 27,2 g/L di biomassa, mentre la crescita con idrolizzato purificato (PF) un valore di 21,6 g/L. Nella valutazione del valore del peso cellulare secco va considerato che la prova con idrolizzato non purificato ha raggiunto la fase di crescita stazionaria, il che rende il valore ottenuto il massimo raggiungibile da *Escherichia coli* MG1655 in queste specifiche condizioni. La crescita con idrolizzato purificato, invece, al termine della prova ha raggiunto una limitazione da substrato. All'interno del mezzo di crescita perciò non era presente un quantitativo di zuccheri sufficiente a garantire la crescita della coltura batterica, con un dosaggio di zuccheri più elevato avrebbe potuto probabilmente garantire il raggiungimento di una massa cellulare maggiore.

La limitazione di crescita finale, dovuta alla mancanza di una sufficiente quantità di zuccheri tuttavia, non è stata l'unica fase limitata di crescita che la prova con idrolizzato purificato (PF) ha riscontrato durante la prova in bioreattore. La ridotta quantità di magnesio presente all'interno del mezzo di crescita, dovuta alla riduzione spinta (96%) di tale componente all'interno dell'idrolizzato utilizzato (Capitolo 4), ha infatti indotto una forte limitazione della crescita durante le prime 25 ore della prova in bioreattore. Tale limitazione da nutriente ha quindi posticipato la fase di crescita esponenziale dalla fase di alimentazione esponenziale (EFB) alla fase di alimentazione costante (CFB).

Non è possibile quindi effettuare un confronto diretto dei dati raccolti nelle singole fasi della prova, ma è lecito ed utile confrontare solamente i risultati ottenuti al termine della stessa, in termini di concentrazione di inibitori, consumo degli zuccheri e produzione di biomassa.

Confrontando quindi da prima la resa di biomassa ottenuta al termine della prova, è possibile notare come per entrambe le crescite tale rapporto risulti di 0,11 grammi di biomassa prodotta per ogni grammo di zucchero dosato. Sebbene tale dato sembri rendere le due prove paragonabili, risulta invece evidente, considerando la percentuale di zuccheri consumata rispetto agli zuccheri dosati, come la prova con idrolizzato purificato permetta di raggiungere condizioni di crescita notevolmente migliori.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

La crescita con idrolizzato non purificato mostra infatti un progressivo accumulo di zuccheri a seguito dell'inizio della fase di alimentazione costante (CFB), indice di una riduzione della velocità di crescita della coltura batterica, riscontrata anche nella valutazione del peso secco, che sembrerebbe indicare proprio con l'inizio della fase di alimentazione costante, l'ingresso della popolazione microbica nella fase di crescita stazionaria. Al termine della prova oltre il 20% del glucosio e il 70% dello xilosio dosati durante la fase CFB si sono accumulati all'interno del mezzo di crescita, riducendo così la percentuale degli zuccheri totali consumati al 65,3 %.

Durante la crescita con idrolizzato purificato invece, la fase di limitazione dovuta alla mancanza di magnesio all'interno del mezzo di crescita è stata superata proprio con l'aggiunta di tale componente ad opera della fase di alimentazione costante, nella quale si riscontra un considerevole aumento della velocità di crescita. Durante la fase CFB della prova con idrolizzato purificato la quasi totalità degli zuccheri dosati viene efficacemente assimilata e metabolizzata dalla coltura batterica, consumando oltre il 99 % degli zuccheri dosati.

Sebbene risulti complesso comprendere la ragione di tale differenza tra le due crescite, è possibile formulare alcune ipotesi basandosi sui dati relativi alla concentrazione di quelle che sono ritenute le specie inibenti la crescita di *Escherichia coli* MG1655. La concentrazione degli acidi organici infatti sembra del tutto paragonabile, almeno in termini di acidi presenti in ragione della quantità di biomassa raggiunta, notevolmente differente appare invece la concentrazione di sali presente all'interno del mezzo di coltura. L'idrolizzato purificato infatti contiene il 30% in meno della quantità di sali, per grammo di zucchero, rispetto all'idrolizzato non purificato. La concentrazione dei sali presenti all'interno del mezzo di crescita infatti aumenta di circa il 122 % durante la fase CFB della prova con idrolizzato non purificato, mentre nella prova con idrolizzato purificato, nel medesimo periodo si riscontra un aumento solo del 20 %.

Un'elevata concentrazione di sali all'interno del mezzo di crescita genera infatti una consistente pressione osmotica sulla membrana cellulare dei microrganismi, batteri gram-negativi, come *Escherichia coli*, inoltre risultano particolarmente sensibili all'osmolarità del mezzo di coltura, poiché un'eccessiva concentrazione di ioni (in particolare il potassio) all'interno della cellula inibisce i normali processi di interazione tra DNA e proteine.⁸⁸

Risulta quindi evidente come la concentrazione dei sali presenti all'interno dell'idrolizzato, utilizzato come fonte di zuccheri in un processo di fermentazione batterica, sia una caratteristica critica. Infatti una concentrazione eccessivamente ridotta di quegli stessi sali, necessari al normale sviluppo dei microrganismi, comporta una limitazione nelle capacità di crescita della coltura batterica nella fase iniziale

⁸⁸ Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments; B.Kempf e E.Bremer (1998);

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

del processo di fermentazione (fase batch), mentre una concentrazione eccessiva di questi stessi composti genera un forte stress osmotico sulla membrana cellulare durante le fasi finali del processo di crescita (fase di alimentazione costante) riducendone le capacità di sviluppo e crescita.

In ragione dei risultati ottenuti da questo elaborato è stata individuata una possibile applicazione del sistema di purificazione presentato. Per garantire infatti un ridotto accumulo di inibitori, quali acidi organici e sali, durante le fasi di alimentazione esponenziale e costante, senza tuttavia privare il mezzo di crescita di quelli che sono i nutrienti, come il magnesio, necessari per lo sviluppo e la crescita della coltura batterica di *Escherichia coli* MG1655, sarebbe infatti possibile utilizzare l'idrolizzato PROESA® non purificato come fonte di zuccheri nella fase batch, mentre per le fasi fed-batch del processo di fermentazione verrebbe utilizzato l'idrolizzato purificato e concentrato.

Considerando quindi lo schema di produzione dell'idrolizzato PROESA®, è possibile effettuare un ipotesi di lavoro. Utilizzando il processo di purificazione proposto per la produzione dell'idrolizzato concentrato, un possibile schema degli step del processo potrebbe essere quello schematizzato di seguito.

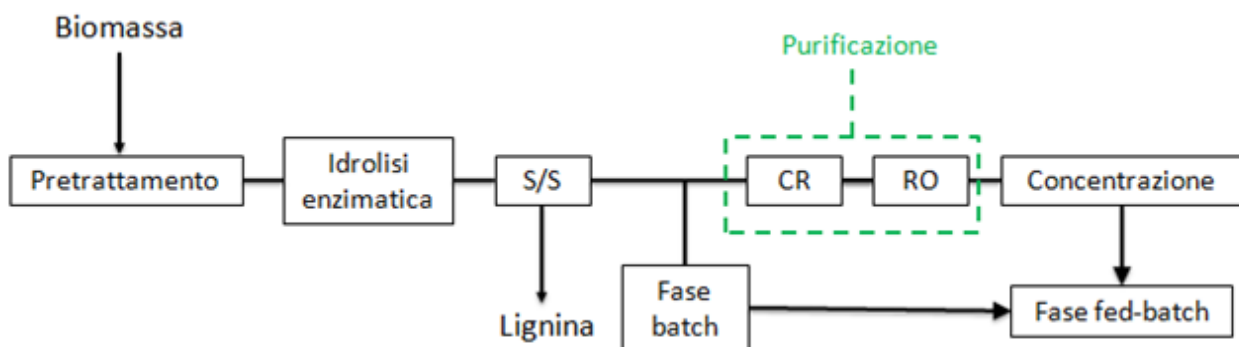


Figura 92: Schematizzazione del processo di fermentazione, utilizzando il processo di purificazione;

Una parte dell'idrolizzato (circa il 10%), a seguito della separazione della lignina, viene quindi prelevato dalla linea di produzione ed utilizzato come fonte di zuccheri per la prima parte della crescita microbica di un processo di fermentazione. La concentrazione degli zuccheri di tale idrolizzato (70-90 g/L) è sufficiente a garantire la quantità di glucosio e xilosio necessari per la prima fase della crescita di un microrganismo.

La restante parte dell'idrolizzato viene invece inviato al processo di purificazione e successiva concentrazione, così da raggiungere la concentrazione di zuccheri desiderata (500 g/L) e poter essere utilizzato come fonte di glucosio e xilosio nella fase fed-batch del processo di fermentazione.

Purificazione di zuccheri di seconda generazione tramite la rimozione degli inibitori della crescita microbica

Considerando quindi i vantaggi relativi alla concentrazione dei vari composti (acidi organici e sali) presenti all'interno del mezzo di coltura, l'utilizzo dell'idrolizzato non purificato, nelle ridotte quantità necessarie alla prima fase di crescita, verrebbe compensato dalla presenza in tale idrolizzato di quelli che sono elementi essenziali per la crescita microbica (es: magnesio). Nelle fasi successive del processo di fermentazione invece, utilizzando un idrolizzato purificato, il ridotto dosaggio di acidi organici e sali garantirebbe la possibilità di raggiungere rese più elevate e prolungare la fase di crescita esponenziale della coltura microbica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments; B.Kempf e E.Bremer (1998). Arch Microbiol. 1998 Oct;170(5):319-30.;

RIEPILOGO SIGLE

°B: gradi Brix;

5-HMF: Idrossimetilfurfurale;

BV: volumi di letto;

CFB: fase di alimentazione costante;

DWC: peso cellulare secco;

EFB: fase di alimentazione esponenziale;

FERM-M: terreno utilizzato dalla Biochemtex s.p.a. per la crescita di *E.coli* nelle prove che utilizzano idrolizzato come fonte di zuccheri. Esso contiene una fonte di ammonio, di solfato, di fosfato, di sali e di metalli in tracce;

HPLC: Cromatografia liquida ad alte prestazioni;

IC: cromatografia ionica;

LB: terreno di coltura definito "ricco", il "Luria Broth (LB), Miller (1900)";

M9YE: terreno di crescita derivante dall'unione di un terreno minimale commerciale "M9 salt minimal" ad estratto di lievito (yeast extract – YE);

NF: nano-filtrazione;

NPF: idrolizzato non purificato;

OD: densità ottica;

OR: osmosi inversa;

PF: idrolizzato purificato;

pO₂: percentuale di ossigeno disciolta;

POST-XXX: prelievo effettuato al termine della fase citata;

PRE-XXX: prelievo effettuato all'inizio della fase citata;

STIR: velocità di agitazione;

SUBA: dosaggio idrolizzato;

VCR: rapporto di concentrazione in volume;