

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE

Dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale
Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**Produzione di enzimi da scarti agro-alimentari
tramite *Pleurotus ostreatus***

TESI DI LAUREA MAGISTRALE SPERIMENTALE

Presentato da:
Fabio Scardovi

Relatore:
Dott. Leonardo Setti

Co-relatore:
Dott.ssa Dayanne C.Masutti

Seconda Sessione

Anno Accademico 2011-2012

Indice

1	INTRODUZIONE	3
1.1	Scarti agroalimentari come risorsa rinnovabile	4
1.1.1	Sottoprodotti derivanti dalla lavorazione agroalimentare	4
1.1.2	Sviluppi tecnologici applicati a fonti rinnovabili	7
1.1.3	Possibilità di utilizzo delle sostanze di recupero.....	8
1.2	Composizione della struttura vegetale.....	9
1.2.1	Struttura e funzione della parete vegetale	10
1.2.2	Composizione chimica della parete cellulare.....	11
1.2.3	Composizione degli scarti vegetali provenienti dalla lavorazione viticola e dei cereali	14
1.3	Trattamento delle biomasse.....	19
1.3.1	Disponibilità della sostanza organica.....	19
1.3.2	Metodi di pretrattamento.....	20
1.3.3	Pretrattamento di tipo chimico.....	22
1.3.4	Pretrattamento di tipo meccanico e termo-meccanico	22
1.1.1	FASE 2.....	23
1.3.5	Pretrattamento di tipo biologico ed enzimatico	27
1.4	Produzione di enzimi esocellulari da <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	28
1.4.1	Biodegradazione di matrici lignocellulosiche da funghi white rot.....	28
1.4.2	Caratteristiche delle classi enzimatiche prodotte da <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
1.5	Fermentazione in stato solido (SSF)	33
1.5.1	Proprietà del sistema SSF nei processi di produzione enzimatica	33
1.5.2	Sistemi di fermentazione a confronto: SmF e SSF	36
2	SCOPO DELLA TESI.....	39
3	MATERIALI E METODI.....	41
3.1	Recupero del percolato	41
3.2	Estrusione del sistema e intervallo di estrazione	41
3.3	Coltura del micelio fungino di <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
3.4	Preparazione del terreno di coltura agarizzato con estratto di malto	42
3.5	Saggi di determinazione enzimatica.....	43
3.5.1	Determinazione dell'attività laccasica	43
3.5.2	Preparazione del bianco di controllo per la determinazione delle attività cellulastica, xilanasica e pectinasi.....	44
3.5.3	Determinazione dell'attività cellulastica	45
3.5.4	Determinazione dell'attività xilanasica	48
3.5.5	Determinazione dell'attività pectinasi	49
3.5.6	Determinazione dell'attività arilesterasi	50

3.6	Bioliquefazione	52
3.6.1	Determinazione degli zuccheri riducenti	52
3.6.2	Determinazione dei polifenoli totali ⁵⁸	53
3.7	Strumenti di laboratorio	54
4	RISULTATI E DISCUSSIONI	55
4.1	Fermentazione in stato solido	55
4.1.1	Pretrattamenti termo-meccanici delle matrici vegetali.....	56
4.1.2	Post-trattamento enzimatico.....	57
4.1.3	Biotrasformazione delle matrici durante la fermentazione in stato solido	58
4.1.4	Analisi delle attività enzimatiche su percolato indotto in biocella.....	60
4.1.5	Valori assoluti delle attività enzimatiche recuperate.....	64
4.1.6	Confronto tra fermentazioni in stato solido statiche o dinamiche tramite stadio di estrusione	75
4.2	Analisi di attività enzimatiche in scarti di lavorazione di funghi Champignons e relativo terriccio di crescita esausto derivante da “lettiere industriali”	78
4.3	Processi di idrolisi enzimatica su matrici di scarto agro-alimentare utilizzando gli enzimi prodotti dalle fermentazioni in stato solido dinamiche e statiche	80
5	CONCLUSIONI	89
6	BIBLIOGRAFIA	91

1 Introduzione

Lo sfruttamento indiscriminato e ricorrente delle risorse naturali da parte dell'uomo ha portato ad enormi problemi a livello globale legati all'equilibrio ambientale. E' da questa problematica che nasce l'esigenza di sviluppare nuove tecnologie sostenibili a livello ecologico ed economico. I rifiuti casalinghi (RSU), le deiezioni animali (letame e liquami), i sottoprodotti della produzione del legno, sfalci e potature, fanghi di depurazione e residui delle lavorazioni agricole e del settore agroalimentare risultano responsabili della produzione di un'enorme quantità di sottoprodotti, per la maggior parte biodegradabili. Il loro accumulo e la difficoltà di smaltimento, creano però una serie di problematiche legate al rischio di inquinamento delle matrici ambientali.

Negli ultimi decenni sono stati proposti diversi tipi di trattamenti di trasformazione di tali scarti, per la produzione di biocombustibili, sostanze chimiche di interesse pratico ed ingredienti alimentari se sottoposti ad opportuni processi di recupero. Parallelamente a questo trend, emerge l'esigenza dello sviluppo di un'industria più ecocompatibile che si sta concretizzando nella sostituzione di processi chimici altamente inquinanti con alternative biotecnologiche, tra cui l'utilizzo di processi enzimatici. Gli enzimi sono catalizzatori "naturali" di numerose reazioni su cui si basano diversi settori industriali, e sono anche responsabili di processi con un impatto ambientale praticamente nullo grazie alla possibilità di trasformare composti senza il supporto di solventi chimici organici ma semplicemente agendo in acqua.

Questo lavoro di tesi intende valutare le proprietà del fungo basidiomicete *Pleurotus ostreatus* nella produzione di un'ampia gamma di enzimi esocellulari per la degradazione e la trasformazione di diverse matrici lignocellulosiche, ricorrendo all'uso di fermentatori in stato solido (SSF). All'interno del SSF, la crescita del fungo avviene su scarti agroalimentari provenienti da diverse filiere (perlopiù derivati dell'industria enologica e cerealicola), in modo da monitorare le specificità di processo dovute alle diverse proprietà dei substrati e verificare le condizioni ottimali di produzione enzimatica. Un lavoro simile era già stato effettuato in precedenza¹ per valutare il migliore intervallo fra un'estrazione enzimatica e l'altra, risultato, per il fungo *Pleurotus*, pari ad una volta a settimana. In questo lavoro di tesi si verifica questo valore modificando il metodo di rimescolamento della matrice ed inserendo un passaggio di estrusione della stessa e del fungo. Ottenuto l'estratto enzimatico e valutatane l'attività, questo verrà utilizzato per determinare la possibilità di degradare un substrato di

scarto in un processo di idrolisi enzimatica che possiamo identificare con il nome di “Bioliqefazione”.

1.1 Scarti agroalimentari come risorsa rinnovabile

1.1.1 Sottoprodotti derivanti dalla lavorazione agroalimentare

Sulla superficie terrestre, circa 200 miliardi di tonnellate di materia organica viene annualmente prodotta attraverso il processo fotosintetico². Tuttavia una rilevante quantità di questa produzione non è destinata all'uso commestibile per la popolazione umana e per quella animale e, in numerosi casi, diventa una fonte di rifiuti nonché di enormi problematiche a livello ambientale. La società attuale è caratterizzata da costi crescenti contro una disponibilità spesso decrescente di materiali grezzi sostenuti da un particolare riguardo per l'inquinamento ambientale³ corrispondente ad un interesse sempre maggiore per il recupero, riciclo e valorizzazione dei rifiuti. Questa tendenza riguarda soprattutto le industrie del settore agroalimentare e le industrie di trasformazione secondaria che trovano vantaggi nella valorizzazione dei propri scarti in quanto questi non vengono più visti come un costo di smaltimento ma come una valida prospettiva di guadagno.

Le aziende appartenenti al settore agroalimentare hanno presentato per la maggior parte della loro storia un impatto ambientale benigno. Anche quando i progressi tecnologici iniziarono ad avanzare, l'attenzione verso la sostenibilità ambientale rimase una parte fondamentale degli obiettivi delle aziende stesse. Gli scarti derivanti dai raccolti venivano reintegrati nel terreno o usati come nutrimento per il bestiame; in tal modo il concime tornava alla terra in quantità tali da poter essere assorbite e utilizzate.

Dal XX secolo si è però assistito ad un forte processo di meccanizzazione delle coltivazioni ed allevamenti e ad un crescente utilizzo di fertilizzanti e pesticidi di sintesi. Dall'avvento di queste pratiche, i residui dei raccolti, che nei precedenti decenni venivano adeguatamente riutilizzati, rappresentano adesso una crescente problematica specialmente per il loro successivo smaltimento o eliminazione.

Gli scarti, i residui e i rifiuti delle industrie agroalimentari di diversa provenienza costituiscono una porzione significativa della produttività globale del settore includendo materiali lignocellulosici, scarti vegetali di frutta e delle industrie dolciarie, così come

operazioni di scarto di animali. A livello europeo si stima una produzione di circa 250 milioni di tonnellate di scarti all'anno da parte di aziende agricole e alimentari^{4,5}.

Considerando a livello italiano, solo tre delle più importanti filiere agroalimentari dell'area mediterranea, la produzione di cereali è stata nel 2004 di circa 22,1 milioni di tonnellate, quella di vite di 9 milioni di tonnellate e quella di olivo di 4,7 milioni di tonnellate⁶.

I residui della lavorazione dei cereali costituiscono circa 11 milioni di tonnellate/anno su base secca di cui il 40-60% viene utilizzato come mangime per animali e nei vari comparti della produzione cartacea⁷. Nelle altre due filiere produttive la quantità di scarti è di rilevante entità e porta ad una produzione di circa 0,9 milioni di tonnellate l'anno di scarti enologici e 4 milioni di tonnellate l'anno di scarti oleari, dei quali solo il 25% viene riutilizzato.

La stima di questi sottoprodotti risulta una complessa operazione da eseguire. Le tonnellate stimate dipendono infatti dalla resa specifica agraria dell'anno in esame variabile a seconda delle condizioni atmosferiche riscontrate nel corso del periodo. Si riportano i dati relativi alla produzione e quindi ai sottoprodotti di filiera della regione Emilia-Romagna del periodo 1996-2004⁸(fig. 1.1).

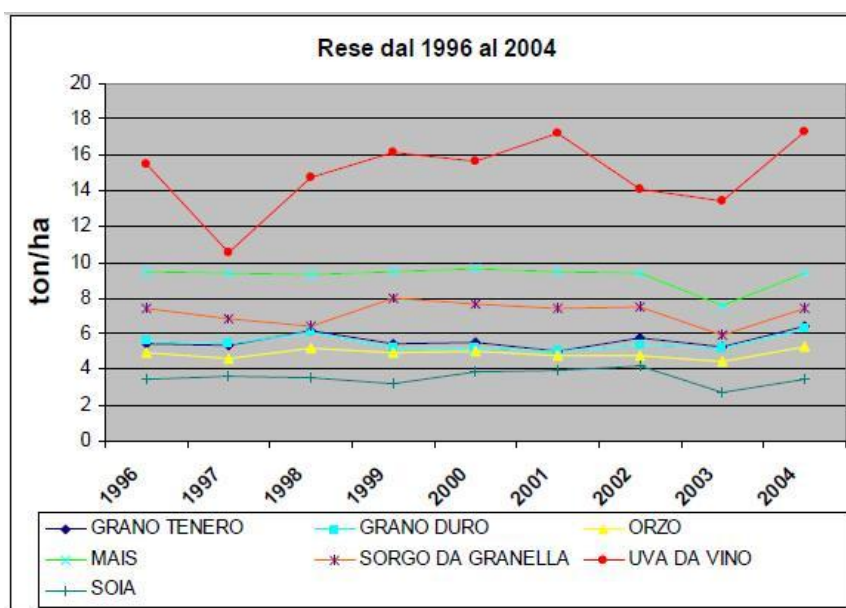


Figura 1.1: andamento delle rese (tonnellate/anno) medie regionali dei prodotti agroalimentari dal 1996 al 2004. Dati ricavati dal sito ufficiale dell'Emilia Romagna⁹

Osservando ad esempio le rese dei prodotti tra l'anno 1996 e il 2004, si possono notare alcune variazioni importanti; in particolare si è verificato un aumento, in termini di resa, per tutte le colture prese in esame nel 2004 rispetto all'anno precedente, in cui si erano riportate delle rese particolarmente basse.

Per quanto riguarda la biomassa disponibile dal comparto agro-alimentare in regione Emilia-Romagna, la tabella 1.1 riporta la stima in tonnellate di sostanza secca (ton ss/anno) suddivisa per provincia e per tipo di residuo.

Tabella 1.1: disponibilità di biomassa in regione suddivisa per provincia e tipologia di residuo

	BIOMASSA DISPONIBILE (ton ss/anno)						
	Frumento duro	Frumento tenero	Granoturco	Orzo	Soia	Vite	Totale
Piacenza	419	5.818	29.969	4.683	1.932	9.180	52.002
Parma	283	5.424	23.802	2.988	1.809	1.632	35.939
Reggio Emilia	146	3.295	22.713	2.953	1.320	18.646	49.074
Modena	213	6.133	43.264	10.324	1.478	18.602	80.015
Bologna	2.610	11.915	27.461	6.559	2.399	14.678	65.623
Ferrara	3.300	7.855	117.964	56.134	262	1.390	186.906
Ravenna	1.173	6.642	14.495	3.364	1.090	34.275	61.040
Forlì-Cesena	379	4.032	1.609	92	2.665	12.272	21.049
Rimini	186	1.960	470	41	766	4.764	8.188
Regione	8.710	53.075	281.749	87.141	13.722	115.440	559.836

Il grafico di figura 1.2, invece, mostra la suddivisione per tipologia dei residui disponibili sia in ogni provincia sia per l'intera regione. Si osserva che, su scala regionale (ultima colonna), la metà dei residui disponibili proviene dalle colture del granturco mentre vite e soia sono le due colture che, dopo il granturco, contribuiscono maggiormente alla disponibilità complessiva.

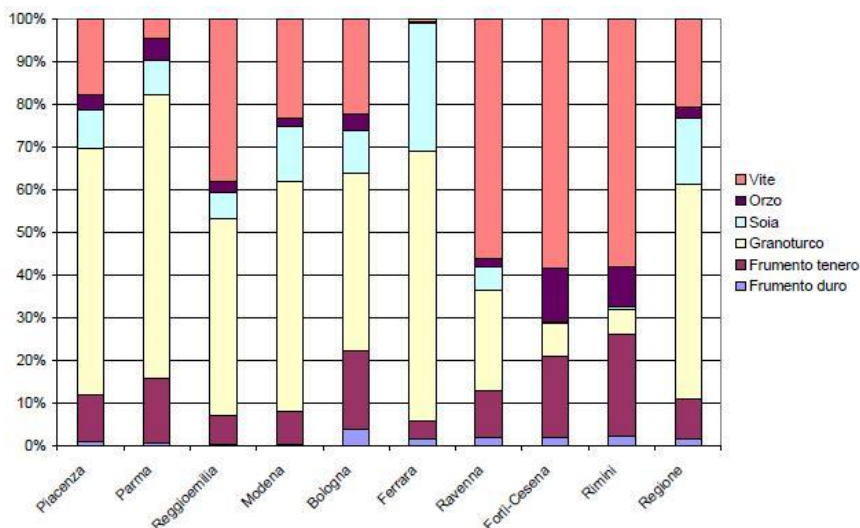


Figura 1.2: Provenienza di diverse categorie di scarti agroalimentari suddivisi in province della regione Emilia Romagna

L'accumulo annuale di enormi quantità di questo tipo di biomassa, crea problemi non solo nell'ambito del deterioramento ambientale ma anche nella perdita di materiale potenzialmente utile per la trasformazione e lo sviluppo di numerosi prodotti di alto valore aggiunto.

In questo contesto le tecnologie di trasformazione possono offrire numerose valide alternative per l'utilizzo dei sottoprodotti dell'agroindustria e la produzione di sostanze con valore aggiunto nel settore energetico, alimentare, agronomico e farmaceutico.

1.1.2 Sviluppi tecnologici applicati a fonti rinnovabili

Lo sviluppo tecnologico e industriale a partire dagli ultimi decenni del XX secolo ha portato la popolazione occidentale ad un relativo grado di benessere pagato tuttavia in termini di consumo di risorse e con la produzione di enormi quantità di rifiuti. La richiesta energetica mondiale inoltre è perennemente in forte crescita dovuta perlopiù ad economie in ascesa come Cina ed India. Attualmente si presenta quindi come fondamentale il problema dell'esaurimento delle risorse non rinnovabili e dei danni causati all'ambiente con conseguente aumento dei costi delle materie prime.

La produzione di energia da combustibili fossili pone oggi un problema di reperimento delle risorse non rinnovabili come il petrolio, che viene anche sfruttato come principale risorsa nella chimica di sintesi per la produzione di materie prime. Tale impiego è dovuto al fatto che la gran parte del petrolio estratto viene utilizzato nella produzione energetica; la valorizzazione energetica del petrolio rende sostenibile il suo utilizzo in ambito chimico. Il problema dell'approvvigionamento delle risorse energetiche presenta quindi una serie di ripercussioni nel reperimento delle materie prime per l'industria chimica. Conseguentemente i governi e il settore aziendale stanno elaborando nuovi piani per lo sviluppo di forniture chimiche ed energetiche, spingendo l'attenzione verso il settore delle energie rinnovabili quali l'eolico, il geotermico, il solare, nel crescente uso di gas e nucleare, in soluzioni ibride elettriche e nelle biomasse. Il binomio ricerca e sviluppo e la forte spinta industriale hanno consentito la realizzazione di notevoli progressi¹⁰. Secondo l'International Energy Agency (IEA), le fonti rinnovabili potranno arrivare a soddisfare il 20% della richiesta di elettricità mondiale nel 2020 e il 50% della domanda energetica mondiale nel 2050. Inoltre secondo dati provenienti dallo stesso ente, la bioenergia offre la possibilità di far fronte al 50% del bisogno energetico mondiale nel XXI secolo e coprire gran parte della produzione relativa alla chimica di sintesi, materiali e polimeri, oggi principalmente basata sulle risorse fossili di petrolio, gas e carbone¹¹.

Gli scarti grezzi agroalimentari, fino a pochi anni fa caratterizzati da costi molto bassi dovuti al continuo aumento della produzione agricola, sono attualmente in mezzo ad una contesa tra biomasse ad uso alimentare e ad uso chimico-energetico, diventando così una questione di dibattito mondiale. Questa tendenza può essere risolta grazie agli importanti sviluppi nell'ingegneria genetica delle piante, soprattutto delle colture industriali¹² e la produzione di bioenergia e sostanze chimiche a partire da residui agroindustriali¹³. Colture industriali come canna da zucchero, barbabietola, mais, grano e altri cereali vengono attualmente processati

all'interno di raffinerie che li trasformano nei relativi zuccheri semplici (amido e zuccheri) e costituiscono in primo luogo substrati per le industrie alimentari, ma anche per numerosi processi fermentativi industriali e chimici^{14,15} capaci di convertire le sostanze vegetali in un'ampia varietà di prodotti chimici tra cui biocarburanti, come bioetanolo e solventi organici, come butanolo¹⁶.

Allo stesso modo semi oleosi come la soia, la colza e la palma da olio vengono trasformati in oli e ulteriormente convertiti in ingredienti alimentari, prodotti oleochimici e recentemente sempre più in biodiesel¹⁷. Mentre questi processi tecnologici di conversione risultano oggi ad un buon grado di avanzamento, gli scarti agroalimentari e i reflui agroindustriali, come crusca, paglia di grano, acque di vegetazione e scarti di mais, barbabietola e del legno, tutti ricchi nella loro struttura di materiale lignocellulosico, sono scarsamente valorizzati o addirittura lasciati decomporre nel terreno¹⁸. Fonti preziose e immediate di risorse energetiche relativamente a poco prezzo possono essere:

- materiali derivanti dalle diverse fasi produttive e distributive del sistema foresta-legno;
- residui e scarti di derivazione agricola e zootecnica e della produzione agro-industriale;
- frazioni organiche dei rifiuti civili ed industriali.

Gli ultimi sviluppi tecnologici puntano ad una produzione di energia sempre più efficiente e pulita, cercando di diminuire il più possibile il consumo di materie prime e soprattutto contenendo al massimo le emissioni nocive. Attualmente oltre l'80% delle emissioni provocate dall'uomo sono causate dall'uso di combustibili fossili e le sue attività portano all'emissione di circa 7 miliardi di tonnellate/anno di CO₂ che si stima diventeranno circa 12 miliardi nel 2020. Negli ultimi anni la Comunità Europea sta puntando fortemente allo sviluppo di concetti legati alla bioraffinazione che, partendo dalle biomasse quali risorse rinnovabili, possono produrre sia vettori energetici (biocombustibili) che materie prime per la chimica industriale nell'era post-petrolifera.

Nuove ricerche in area biochimica e le applicazioni biotecnologiche permettono di considerare tali problematiche secondo un nuovo approccio, valorizzando gli scarti come una risorsa che in molti casi presenta un alto potenziale di utilizzo, sostenibile anche economicamente¹⁹.

1.1.3 Possibilità di utilizzo delle sostanze di recupero

I problemi di gestione degli scarti agroalimentari, che rappresentano probabilmente la risorsa rinnovabile più abbondante della terra, complicano l'economia di diverse categorie agricole. Gestire e smaltire questi scarti costituisce un problema complesso, da affrontare in chiave

sociale, economica e ambientale con l'obiettivo di un uso razionale e sostenibile delle risorse per garantire la sostenibilità della loro trasformazione attraverso varie forme di recupero successive. Data la complessità e la diversità delle matrici di partenza, generalmente trattamenti singoli risultano difficili o scarsamente sostenibili.

Un diverso approccio, basato su trattamenti sequenziali che valorizzino le diverse componenti della matrice vegetale, sebbene con maggiori complessità legate ai costi e le procedure, può permettere di massimizzare il valore aggiunto dallo scarto, ottimizzando contemporaneamente le procedure di smaltimento. In figura 1.3 è riportato uno schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio di scarti agroindustriali:

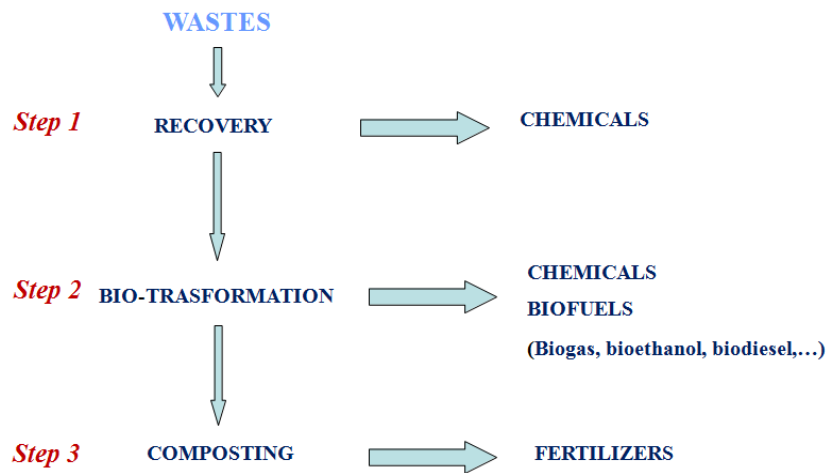


Figura 1.3: Schema della valorizzazione multistadio degli scarti agroindustriali

Gli scarti di origine vegetale sono frequentemente ricchi di specifici fito-composti con attività antiossidante denominati biofenoli, che hanno recentemente trovato un grande interesse nel mercato come prodotti antiossidanti. Le loro applicazioni sono legate soprattutto ai prodotti per la salute dell'uomo sia come nutrienti che nell'ambito della cosmesi e, in prospettiva, anche in campo farmaceutico²⁰. Su questa base gli antiossidanti naturali rappresentano un mercato in crescita per lo sviluppo di prodotti *environmental friendly*.

1.2 Composizione della struttura vegetale

1.2.1 Struttura e funzione della parete vegetale

La maggior parte delle cellule vegetali possiede una matrice extracellulare complessa, esterna alla membrana protoplasmatica, denominata parete cellulare, caratteristica non condivisa con le cellule animali (fig. 1.4). La parete non costituisce semplicemente un substrato inerte, che fornisce resistenza e protezione al protoplasma, ma possiede un intenso metabolismo e si identifica come una struttura attiva e dinamica. Tale involucro cellulare possiede un ruolo protettivo rispetto all'ambiente esterno alla cellula, svolgendo il ruolo di barriera fisica e chimica per gli agenti patogeni. Assume anche un ruolo strutturale, conferendo turgidità e permettendo il mantenimento della forma. Infine rappresenta il primo contatto della cellula con il mezzo esterno, possiede un ruolo attivo nella comunicazione cellulare, media selettivamente il passaggio di sostanze ed è deputata al mantenimento dell'equilibrio osmotico attraverso il passaggio regolato di molecole e fluidi.

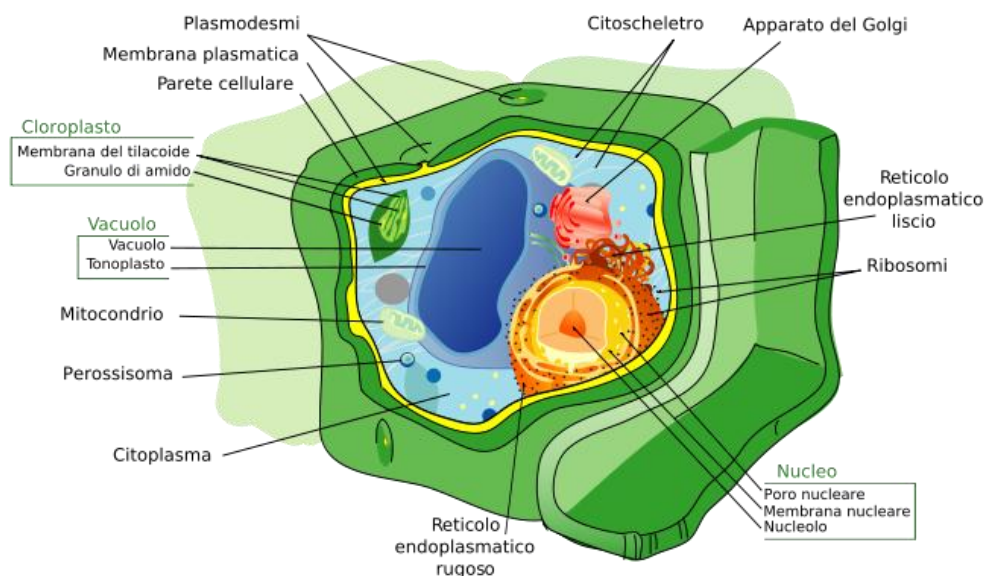


Figura 1.4: Struttura della cellula vegetale vista in sezione

La parete è generalmente divisa in tre strati successivi e tra diversi tra loro:

- La *lamella mediana* è lo strato più esterno di circa $0,1 \mu\text{m}$ di spessore. Si forma durante il processo di mitosi cellulare ed è costituito principalmente da materiale pectico (polisaccaridi come la pectina) che favorisce l'adesione alle cellule adiacenti. E' attraversata da filamenti citoplasmatici che formano i plasmodesmi, strutture deputate alla comunicazione cellulare e allo scambio selettivo di sostanze;

- La *parete primaria* è lo strato più esterno e sottile, presente in tutte le cellule vegetali. Viene creata in seguito al processo di divisione delle cellule in accrescimento in cui il materiale si posiziona nello spazio tra la lamella mediana ed il plasmalemma (o membrana cellulare). Le componenti della parete primaria sono molto elastiche in quanto questa è soggetta a continue rielaborazioni a causa dello stiramento meccanico provocato dalla crescita della cellula;
- La *parete secondaria* si può ritrovare in cellule vegetali particolarmente resistenti, che abbiano completato l'accrescimento per distensione. In questo caso il protoplasto forma una parete secondaria in direzione centripeta tra la parete primaria e il plasmalemma. Questa struttura ha uno spessore indefinibile ed è molto meno elastica della parete primaria. (fig. 1.5)

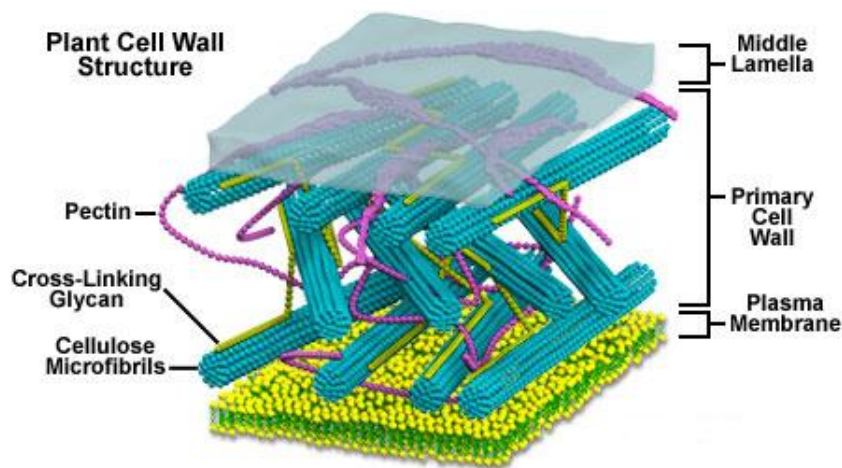


Figura 1.5: Struttura schematica della parete cellulare vegetale

La parete cellulare presenta dunque una struttura complessa che subisce una serie di modificazioni durante il processo di accrescimento. Essa è costituita principalmente da polisaccaridi e in parte ridotta da glicoproteine, esteri fenolici (acido ferulico e cumarico), minerali ed enzimi, un complesso di strutture distribuite in modo peculiare nelle diverse categorie di organismi vegetali.

1.2.2 Composizione chimica della parete cellulare

La parete primaria, quella secondaria e la lamella mediana differiscono notevolmente tra loro per struttura e composizione. Il costituente fondamentale della parete, presente in considerevole quantità rispetto alle altre componenti, è la **cellulosa** (fig. 1.6). La cellulosa è un polisaccaride strutturato in modo tale che le molecole di glucosio siano ruotate di 180° l'una rispetto all'altra consentendo la formazione del legame β 1-4; di conseguenza l'unità

fondamentale della cellulosa è un omodimero chiamato cellobiosio. Oltre al legame covalente si formano anche legami ad idrogeno che uniscono tra loro varie catene di monomeri. Molecole di cellulosa adiacenti, disposte parallelamente, formano numerosi legami ad idrogeno fra filamenti diversi creando una struttura cristallina estremamente resistente, la microfibrilla, di 10-25 nm di diametro. Questo polisaccaride ha principalmente il ruolo di materiale strutturale conferendo forza e rigidità alle piante.

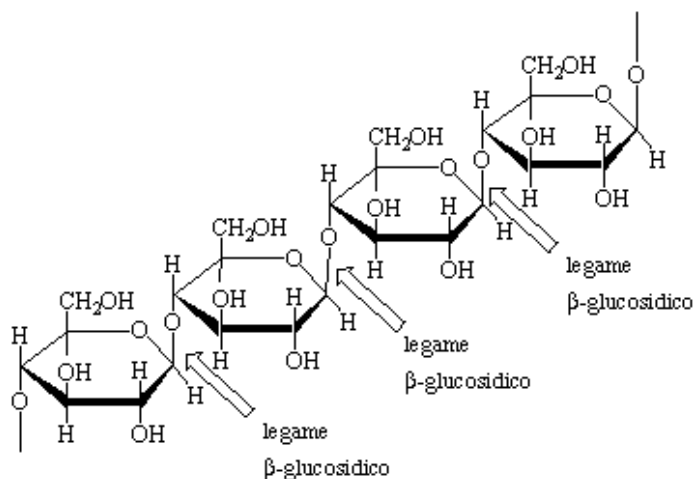


Figura 1.6: Struttura della catena polimerica lineare della cellulosa

Le varie microfibrille di cellulosa sono tenute insieme da altri tipi di molecole dette **emicellulose**, un gruppo di polisaccaridi a catena ramificata, eterogenei per ciò che riguarda il tipo di zuccheri, per il numero e la lunghezza delle catene laterali. Sono formate da una catena principale costituita essenzialmente da zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabinosio e xilosio) policondensati in modo analogo al glucosio nella cellulosa, ossia mediante legami β-1,4. L'emicellulosa predominante in molte pareti cellulari è lo xiloglucano; altre emicellulose sono il glucuronoxilano, l'arabinoxilano, il glucomannano e il galattomannano. La natura eterogenea rende questi polimeri maggiormente coinvolti nel differenziamento fra cellule di diversa provenienza.

Le **pectine** sono fra le principali componenti della lamella mediana e della parete primaria. Sono polisaccaridi ad elevato peso molecolare (tra i 20 e i 400 KDa) che possiedono una natura molecolare acida; la presenza di cariche positive le rende molto solubili e conferisce porosità alla parete. L'unità monometrica principale di questi polisaccaridi è l'acido D-galatturonico che polimerizza mediante legami α-1,4, mentre lo scheletro della molecola è intervallato da residui di 1,2-L-ramnosio. Nella struttura sono presenti anche altri carboidrati come D-galattosio, L-arabinosio, D-xilosio e L-fucosio che formano varie ramificazioni all'interno della catena. La molecola che entra con maggiore frequenza nella costituzione della lamella mediana è un polimero costituito prevalentemente da acido galatturonico, che

può legarsi agli ioni Ca^{2+} formando un gel insolubile che rende rigida la lamella mediana, cementando le cellule adiacenti.

Le **glicoproteine non enzimatiche** sono una componente minoritaria della parete cellulare vegetale e generalmente non superano il 10% del peso secco della parete primaria. Hanno un ruolo di rinforzo e sono coinvolte in fondamentali processi del metabolismo e della crescita della cellula vegetale. Notevole importanza dal punto di vista strutturale è attribuita ad alcune proteine come l'estensina coinvolta nei meccanismi di assemblaggio e di crescita della parete cellulare, altre proteine ricche in prolina sono invece coinvolte nei meccanismi di difesa innescati dalle aggressioni di patogeni.

La parete secondaria è generalmente più spessa di quella primaria e può essere impregnata di **lignina**, un altro costituente non polisaccaridico bensì di natura fenolica, che rende la parete resistente anche a forze di compressione (in misura maggiore rispetto alle sole emicellulose) e rappresenta il 10-15% della massa vegetale. La lignina è un polimero estremamente complesso e ramificato composto di unità fenilpropanoiche (fig. 1.7). È una molecola sintetizzata dagli stessi vegetali a partire da monomeri di acidi cinnamici e alcoli fenilpropilici (cumarilico, conilferilico e sinaptilico) tramite deidrogenazione mediata da perossidasi. Le principali funzioni della lignina sono quelle di conferire resistenza meccanica e chimica, proteggere la pianta dalle aggressioni dei patogeni e mantenere il giusto grado di idratazione (questo grazie alle sue proprietà impermeabilizzanti). La lignina trova il suo principale utilizzo nell'ambito del combustibile, ma attualmente viene anche utilizzata nell'industria come disperdente, indurente, emulsionante, per laminati plastici, cartoni e manufatti in gomma. È inoltre possibile trattarla chimicamente allo scopo di produrre composti aromatici come vanillina, siringaldeide, p-idrossibenzaldeide, la cui utilità viene valorizzata nei settori della chimica farmaceutica, dell'industria cosmetica e di quella alimentare.

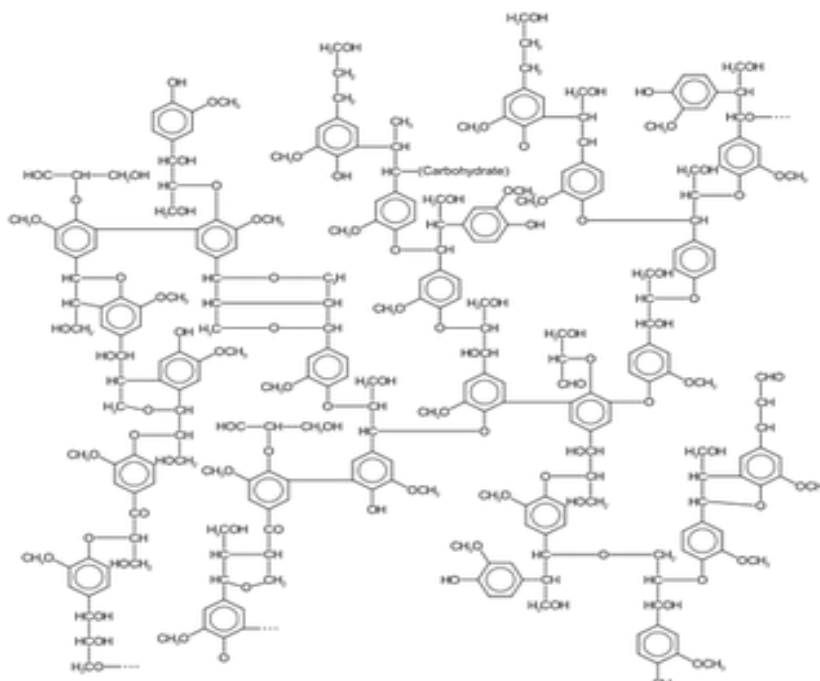


Figura 1.7: Esempio di struttura molecolare della lignina

1.2.3 Composizione degli scarti vegetali provenienti dalla lavorazione viticola e dei cereali

I cereali

I cereali rappresentano una fra le più diffuse ed economiche fonti di apporto energetico, e data la presenza in notevoli quantità di proteine, un alimento di fondamentale importanza, adatto a soddisfare le necessità alimentari della popolazione. I principali cereali coltivati sono frumento, riso, mais, orzo, avena, segale, sorgo e miglio tutti appartenenti alla famiglia delle Graminacee. Le cariossidi (i chicchi) dei cereali sono sensibilmente diverse tra loro e rappresentano il frutto secco indeiscente, formato da un unico seme attorniato da involucri di protezione. L'uso delle cariossidi dei cereali nell'alimentazione è limitato alla parte interna, generalmente farinosa, in quanto la parte periferica e gli involucri esterni sono ricchi in cellulosa e in parte di lignina, entrambi composti non assimilabili dal sistema digerente dell'uomo. La necessità di separare le parti ligneo-membranose della cariosside dalla parte più interna ha dato luogo allo sviluppo di attività industriali in parallelo alla produzione agricola che possono essere considerate industrie agricole complementari.

- Il *frumento* o grano è un cereale di elevata importanza tra le risorse alimentari della popolazione mondiale potendo crescere facilmente nella gran parte dei climi terrestri (escludendo le fasce tropicali e quelle polari). I frutti sono cariossidi e la pianta produce infiorescenze in spighe composte (fig. 1.8).



Figura 1. 8: Struttura delle infiorescenze strutturate in spighe del frumento

La struttura anatomica della cariosside di frumento (fig. 1.9) è simile a quella di altri cereali ed è costituita dall'embrione o germe (2-4% in peso), dai tegumenti o involucri (8% circa) e dall'endosperma amilaceo o mandorla farinosa (87-89%).

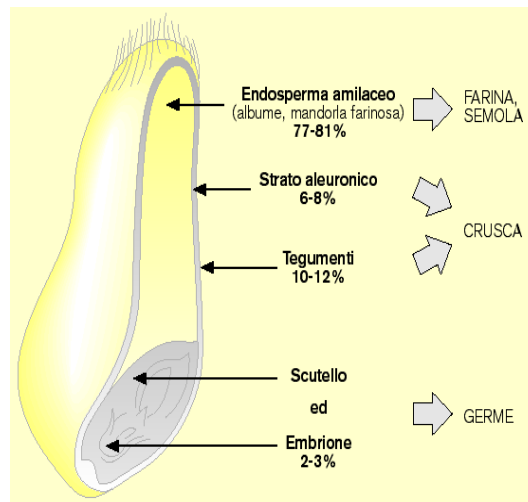


Figura 1.9: Struttura della cariosside in sezione

Dall'endosperma interno si ricava la sostanza farinacea che in seguito ad opportuni processi di trasformazione sarà destinata all'uso alimentare. Le restanti componenti della struttura del frumento costituiscono la porzione residua della fabbricazione dalle quali è possibile elaborare delle linee di sviluppo di processi paralleli. In particolare, nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti scarti:

- **Paglia:** rappresenta il fusto del frumento e dunque ciò che resta dopo la trebbiatura, dopo il processo di raccolta della granella. Compone circa la metà della biomassa aerea di un raccolto medio di orzo, avena, segale o frumento ed è sostanzialmente formata da cellulosa, lignina, cere, minerali e silicati. Trova utilizzo come un elemento integrativo del foraggio e spesso come lettiera sul pavimento delle stalle formando assieme alle deiezioni animali il letame. Attualmente, quando non risulta economicamente conveniente il suo raccolto, viene interrata con le lavorazioni di

preparazione del terreno per la successiva coltura, contribuendo ad aumentare la sostanza organica del terreno;

Tabella 1.2: Composizione chimica della paglia²¹

	Composizione (gr/kg)
Umidità	76
Sostanza secca (s.s.)	924
Costituenti della sostanza secca (gr/kg s.s.)	
Lignina	81,5
Cellulosa	498
Emicellulosa	269
Ceneri	69
Estratto etereo	9
Proteina grezza	20
Altra sostanza organica	53,5

- **Crusca:** è costituita prevalentemente dai tegumenti esterni del seme. Possiede una composizione di nutritivi (proteine, glucidi e lipidi) al 30% e di fibre vegetali (tra cui lignine, cellulosa, emicellulosa e silicati) circa al 55%. Viene utilizzata innanzitutto nell'alimentazione animale e come fonte di fibra per la nutrizione umana.

Tabella 1.3: Composizione chimica della crusca²²

	Composizione (gr/kg)
Umidità	82
Sostanza secca (s.s.)	918
Costituenti della sostanza secca (gr/kg s.s.)	
Lignina	550
Cellulosa	
Emicellulosa	
Zuccheri	140
Ceneri	75
Lipidi	40
Proteina grezza	130
Altra sostanza organica	

Il settore viticolo

La filiera viti-vinicola rappresenta uno dei più importanti settori di produzione agroindustriale. L'uva, frutto della vite, si raggruppa in grappoli composti da un graso che funge da scheletro allo scopo di sostenere numerosi acini di piccola dimensione e di colore chiaro o scuro. L'acino (fig. 1.10) è costituito dall'epidermide esterna, dalla polpa e dai semi (vinaccioli). Dal punto di vista tecnologico e quantitativo, la polpa è l'elemento più importante poiché contiene la maggior parte delle sostanze che costituiscono la parte liquida dell'acino ovvero il mosto. Oltre la produzione delle diverse categorie di vini tramite il mosto e altri componenti, un'importante fonte di lavorazione è rappresentata dalle vinacce, ovvero le bucce degli acini. Da queste si ottengono non soltanto sostanze ad uso alimentare come la grappa ma, se opportunamente trattate con altri scarti della lavorazione agroindustriale, possono entrare nella costituzione del bioetanolo, una nuova forma di carburante alternativa all'uso di combustibili fossili. All'interno di questa trasformazione anche i grasi e i vinaccioli dell'uva possono costituire un'importante fonte da cui ricavare questa forma di energia.

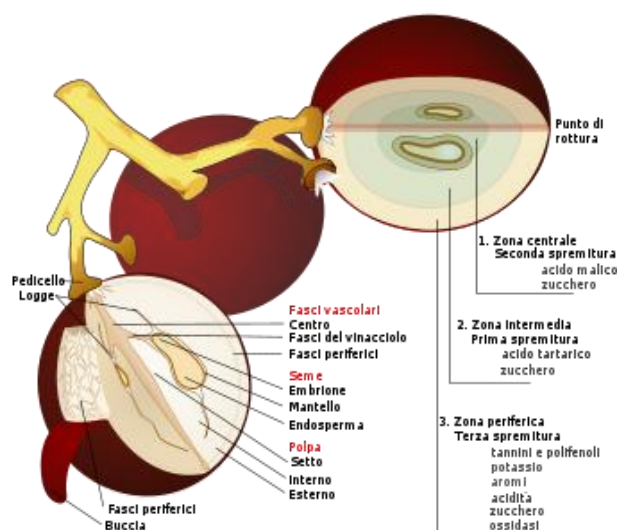


Figura 1.10: Schema in sezione dei componenti dell'acino d'uva

- **Graspi d'uva:** corrispondono alle porzioni del grappolo privo di acini. Si tratta di una struttura ramificata e legnosa, composta per la maggior parte di acqua (fino al 75-80%), zuccheri ma soprattutto con abbondanti quantità di composti tannici e legnosi²³.

Tabella 1.4: Composizione chimica dei graspi d'uva²⁴

	Composizione (gr/kg)
Umidità	690
Sostanza secca (s.s.)	310
Costituenti della sostanza secca (gr/kg s.s.)	
Lignina	230
Cellulosa	235
Emicellulosa	159
Ceneri	80
Proteina grezza	32
Altra sostanza organica	264

- **Vinaccioli:** sono i semi dell'acino dell'uva e rappresentano in peso il 25% della vinaccia e vengono spesso considerati componenti passivi della massa sia nel processo fermentativo che in quello di distillazione. Questo è dato del fatto che possedendo una robusta epidermide ed una particolare forma a cuneo, difficilmente si possono rompere durante le fasi della lavorazione ed hanno un endosperma ricco di olio dal quale si ricava l'olio di vinaccioli particolarmente ricco di polifenoli e oli importanti per la produzione di antiossidanti.

Tabella 1.5: Composizione chimica dei vinaccioli²⁴

	Composizione (gr/kg)
Umidità	260
Sostanza secca (s.s.)	840
Costituenti della sostanza secca (gr/kg s.s.)	
Lignina	100
Cellulosa	260
Emicellulosa	250
Ceneri	80
Proteina grezza	
Olii	150

1.3 Trattamento delle biomasse

1.3.1 Disponibilità della sostanza organica

Le biomasse si possono definire come "la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani"²⁵.

La maggior parte delle biomasse presenti sulla Terra è di origine vegetale mentre solo circa il 10% di origine animale. L'attenzione da parte della ricerca nell'impiego di questa materia prima è rivolta pertanto soprattutto alla biomassa di origine vegetale. Questa viene prodotta sfruttando l'energia solare grazie al processo di fotosintesi clorofilliana ed è disponibile in varie forme: foreste, colture, residui delle industrie agroalimentari e agroindustriali e dalla componente organica proveniente dalla raccolta differenziata dei rifiuti solidi urbani (RSU). Le biomasse costituiscono una delle più importanti risorse a disposizione dell'uomo come fonte rinnovabile di alimenti, energia e materie prime. Il loro utilizzo è di fondamentale importanza per via delle emissioni di CO₂ nette evitabili dal momento che questo gas, noto per gli effetti serra, viene riassorbito per generare attraverso la fotosintesi nuova biomassa (fig. 1.11).

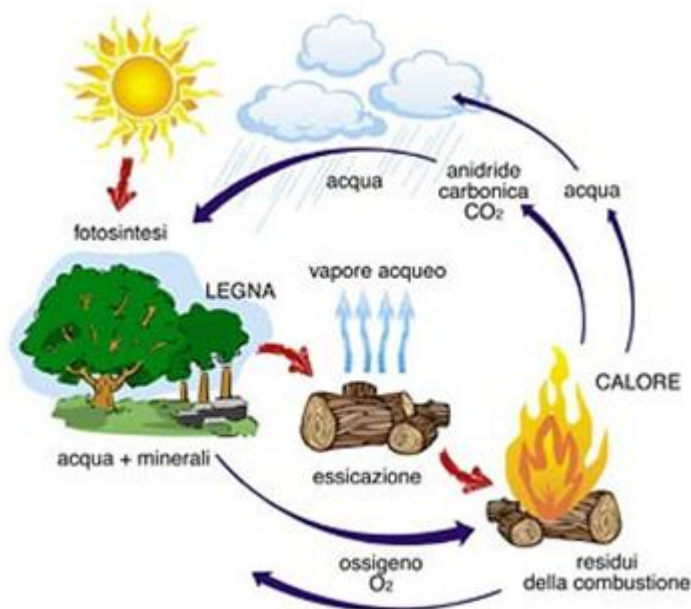


Figura 1.11: Rappresentazione del ciclo del carbonio

Di grande importanza è la biomassa lignocellulosica residuale che viene bruciata allo scopo di produrre energia termica ed elettrica^{26,27}. La tabella 1.6 riporta una stima della quantità di energia termica ed elettrica prodotta in Italia nel 2009 da biomasse.

Tabella 1.6: Energia prodotta dalle biomasse in Italia nel 2009 calcolata in kTep (kilo-Tonnellate di petrolio equivalente).²⁸

	Energia termica	Energia elettrica
Biomasse solide	61	230
Rifiuti solidi urbani (RSU)	56	140

Attualmente la quota di energia elettrica prodotta dalla combustione di biomasse raggiunge circa il 3% del fabbisogno energetico nazionale di cui circa il 35% di tale aliquota prodotta dalla frazione biodegradabile degli RSU.²⁹

1.3.2 Metodi di pretrattamento

Mediante processi di trasformazione termochimica e biochimica si può ottenere una gran varietà di prodotti dalle biomasse. Dal punto di vista tecnologico si possono ricavare prodotti il cui approvvigionamento era un tempo legato alla petrolchimica e ai "fine chemicals" derivanti dal petrolio(fig. 1.12-1.13).

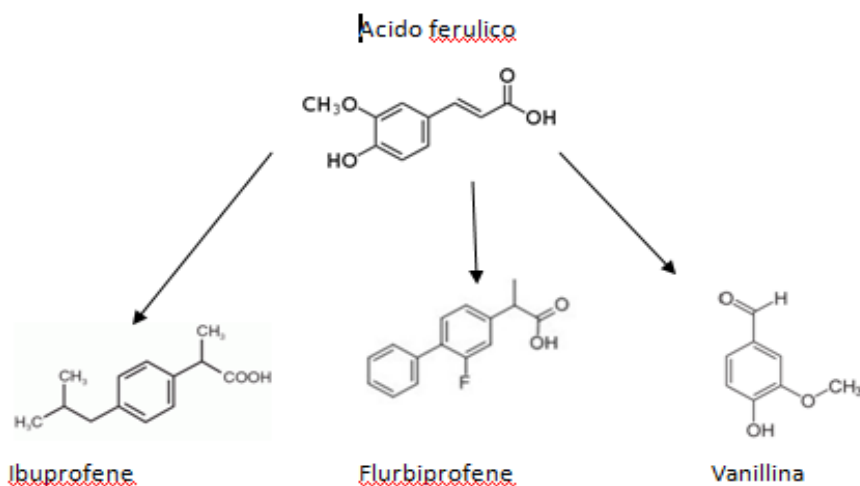


Figura 1.12: Possibili prodotti di sintesi che utilizzano acido ferulico (componente della lignina) come building block

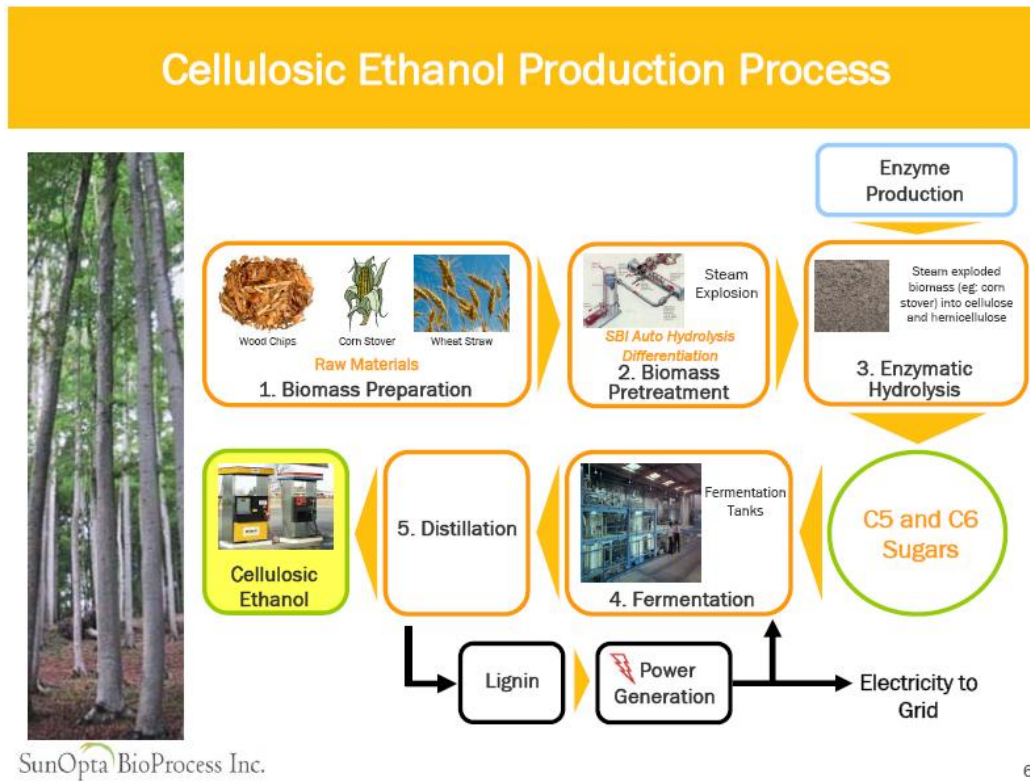


Figura 1.13: Esempio di un processo di recupero di nutrienti da biomasse di scarto

Da un migliore sfruttamento delle biomasse possono pertanto derivare i seguenti vantaggi:

- nuovi sbocchi di mercato per prodotti agricoli in eccedenza;
- produzione di materiali biodegradabili a costi competitivi;
- smaltimento e valorizzazione dei residui agroindustriali;
- valorizzazione delle risorse locali.

Allo stato naturale, il materiale lignocellulosico è molto strutturato e non è possibile convertirlo direttamente nel prodotto desiderato.

Per eseguire la conversione è necessario rompere i legami chimici presenti tra i vari componenti della biomassa in modo tale da determinare, per esempio, un processo di idrolisi a carico della cellulosa tramite trattamento enzimatico.

Di conseguenza, per un'efficace conversione, sono sempre necessari dei trattamenti preliminari che abbiano come principali obiettivi di:

- ridurre al minimo la perdita dei carboidrati;
- massimizzare il recupero di emicellulosa e lignina come validi sottoprodotti;
- minimizzare i costi (sia iniziali che operativi);
- essere fattibili a livello industriale;
- massimizzare le rese di un'eventuale idrolisi enzimatica;

- eliminare sottoprodotti tossici, inibitori di successive idrolisi³⁰.

Il pretrattamento è un importante strumento per la degradazione della struttura di questi scarti costituiti soprattutto da cellulosa, emicellulosa e lignina. La cellulosa è presente in grande quantità negli scarti agroindustriali e, con l'emicellulosa, entra nella costituzione della parete vegetale, dove sono sottoposti alla lignificazione. Esiste dunque una crescente necessità di individuare un metodo efficace e soprattutto economico per separare la cellulosa e l'emicellulosa dalla parete cellulare. Allo scopo si possono utilizzare diversi metodi di pretrattamento di tipo chimico, fisico, biologico (enzimatico) e combinati³¹. Tutti questi metodi sono finalizzati ad ottimizzare la suscettibilità della carica all'idrolisi enzimatica, quest'ultima dipendente oltre che dalla tassonomia della biomassa specifica, dall'insieme di operazioni adottate, per le quali sussistono diverse opzioni alternative quali ammonia fibre explosion (BCI), idrolisi chimica (Arkenol), trattamenti meccanici determinanti per la accessibilità agli enzimi della cellulosa o per la preidrolisi della emicellulosa.

1.3.3 Pretrattamento di tipo chimico

Si tratta di processi che producono un elevato numero di composti chimici ma caratterizzati da un elevato impatto ambientale. Tra questi, si annoverano processi effettuati con soluzioni diluite di acido solforico, soda, o solventi (etanolo/metanolo) in grado di rimuovere parzialmente la lignina.

1.3.4 Pretrattamento di tipo meccanico e termo-meccanico

A questa categoria appartengono la macinatura e la steam explosion. La macinatura è un trattamento meccanico, efficace, ma ad elevato consumo di energia in grado di tritare e ridurre le dimensioni del substrato. Per ciò che riguarda i trattamenti termo-meccanici, lo sfibramento fisico del materiale e l'idrolisi dei legami chimici, ottenuta per riscaldamento con acqua, esplicano un'azione sinergica molto efficace. Il processo però non è selettivo, infatti insieme alla scissione dei legami chimici avvengono reazioni indesiderate come la pirolisi, che abbassano le rese del processo e generano sostanze inibitorie per i successivi stadi di bioconversione.

- **Steam-explosion**

Uno dei processi di pre-trattamento maggiormente adottati per aumentare la biodisponibilità della cellulosa è noto come Steam Explosion (Fig. 1.14-1.15).



Figura 1.14: Impianto di Steam Explosion

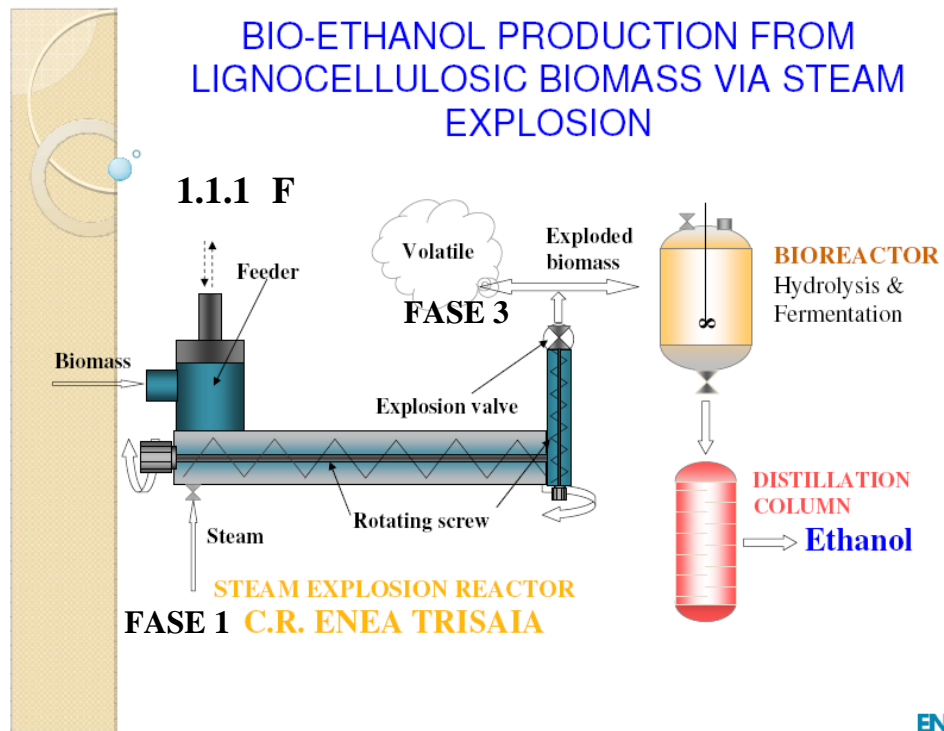


Figura 1.15: Schema di processo di Steam-Explosion

Il processo è diviso in tre fasi:

1. Saturazione con vapore acqueo a 1,5-4 MPa a 180-230 °C per 1-10 minuti
2. Trasferimento a pressione atmosferica
3. Decompressione esplosiva

In questo modo la struttura microcristallina della cellulosa si disgrega aumentando l'area superficiale della biomassa e permettendo agli enzimi di poter attaccare le fibre (Figura 1.16).

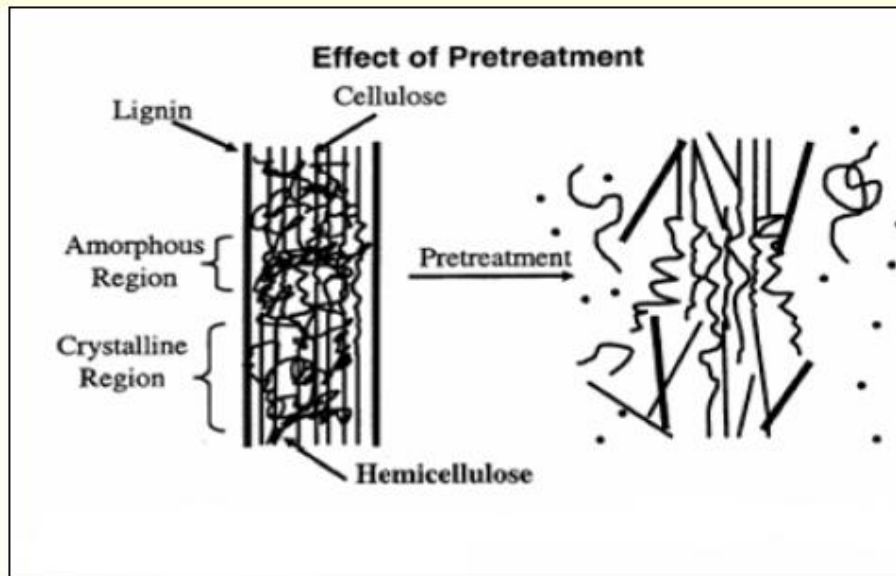


Figura 1.16: Effetto del pretrattamento di Steam-explosion sulla matrice vegetale

Questo passaggio di pre-trattamento è fondamentale per il rendimento dello stadio enzimatico.

Il processo è particolarmente interessante grazie al basso consumo energetico ed al fatto che non richiede l'uso di particolari prodotti chimici. Si basa sull'impiego di vapore d'acqua saturo ad alta pressione per scaldare rapidamente il legno o la paglia o ogni altro tipo di materiale ligno-cellulosico e, in ultima analisi, consiste nella frammentazione dei componenti polimerici della biomassa (cellulosa, emicellulosa e lignina) mediante trattamento idrotermico al quale segue la separazione dei prodotti ottenuti mediante estrazioni acquose. Il materiale rimane per un breve periodo in un reattore alla temperatura scelta, durante la quale la frazione solubile viene rilasciata.



Figura 1.17: Impianto pilota di Steam Explosion delle biomasse (centro ricerche ENEA a Trisaia) con capacità di trattamento di 150 kg/h in continuo

Un importante vantaggio di questo processo rispetto a quelli classici è la possibilità di operare con reattore continuo anziché autoclavi. Alla destrutturazione della matrice ligno-cellulosica partecipano due azioni meccaniche: la compressione della biomassa e l'istantanea decompressione, realizzata passando dall'alta pressione nel reattore alle normali condizioni ambientali. Dopo un tempo preselezionato (1-10 minuti) la pressione è rapidamente abbassata ed il materiale viene scaricato dal reattore attraverso una "blow-valve". Le elevate forze, generate durante lo scarico violento del materiale attraverso un piccolo orifizio, contribuiscono ulteriormente allo sfibramento del materiale stesso.

Dopo pesatura la biomassa è inviata, tramite alimentatore a vite, all'interno del reattore nel quale il vapore ad elevata pressione e temperatura viene fatto fluire. Nella parte terminale del reattore è collocata una valvola che, aprendosi ad intervalli regolari prestabiliti, permette il trasporto ad elevata velocità della biomassa e la successiva espansione nel serbatoio di contenimento.

Questa tecnologia non è però ancora disponibile su scala commerciale in quanto il suo scale-up appare difficoltoso ed il processo economicamente non risulta ancora competitivo, in particolare per gli elevati costi di investimento (oltre 200 milioni di US\$ per impianti da 200.000 tons/anno circa).

- **Wet oxidation**

Il processo di ossidazione ad umido (wet oxidation) consiste nell'ossidazione dei composti inquinanti in fase acquosa con ossigeno, ad elevati valori di pressione (30-250 bar) e di temperatura (150-360 °C). Il campo di applicazione ritenuto "ottimale" (da un punto di vista tecnico-economico) è il trattamento di rifiuti liquidi caratterizzati da un elevato contenuto di sostanza organica (20-200 g/L) e per i quali i processi di trattamento "convenzionali" sono inefficienti e/o troppo costosi.

La wet oxidation su composti lignocellulosici è sostanzialmente il trattamento termico che viene eseguito prima della variazione flash della pressione che porta alla steam explosion già descritta precedentemente.

Questo pre-trattamento è stato particolarmente studiato dal BioCentrum-DTU (Danimarca) in combinazione con condizioni acide o con enzimi mostrando che il 64% del glucosio ed il 95% dello xilosio possono essere rilasciati da biomassa di miscanthus per la successiva fermentazione alcolica.

Un interessante lavoro del BioScience and Technology (BST) Research Group della Technical University of Denmark ha riportato l'input energetico per un processo di produzione di biogas ed un pre-trattamento di wet oxidation.

- **Estrusione a coclea**

Recentemente la BTS Italia (Brunico) ha presentato alcuni risultati circa la produzione di biogas da insilati di mais in cui la biomassa viene sottoposta ad un pre-trattamento fisico tramite un estrusore a coclea.

Dai risultati si evince che l'azione di estrusione aumenta la produzione media di biogas di del 7-8% rispetto alla produzione tradizionale. Questo risultato è particolarmente significativo poiché indica il fatto che la struttura fibrosa della biomassa è uno stadio limitante la biotrasformazione a biogas per cui un pre-trattamento fisico di estrusione può costituire un importante miglioramento nelle performance complessive dell'impianto.

Questi valori hanno ispirato il procedimento utilizzato in questa tesi di laurea che prevede, prima di un trattamento enzimatico, un trattamento termo-meccanico eseguito in autoclave che riporti allo Steam Explosion ed una successiva estrusione.

1.3.5 Pretrattamento di tipo biologico ed enzimatico

La via metabolica delle cellule è basata sulla fermentazione e sulla produzione enzimatica in modo da favorire la trasformazione della biomassa. Sono quindi impiegati microrganismi in grado di delignificare la biomassa, scoprendo la fibra cellulosa della struttura vegetale degli scarti.

Gli enzimi sono tra le più importanti molecole ricavate da fonti microbiologiche, che esplicano la loro funzione in numerosi settori di interesse. Un ampio numero di processi industriali nell'area biotecnologica ambientale, industriale e alimentare ricorre all'uso di questi composti. Recenti sviluppi in campo biotecnologico stanno infatti fornendo nuove applicazioni, considerando le caratteristiche di alcuni microrganismi tra i quali batteri, lieviti e funghi che mostrano la capacità di produrre diverse classi e tipologie di enzimi³².

Nella parete cellulare, la lignina è associata alla cellulosa e l'emicellulosa creando una barriera ed ostacolando la disponibilità di carboidrati per altri processi di trasformazione. I funghi "white-rot" e alcuni batteri vengono comunemente usati nei pretrattamenti biologici di sostanze lignocellulosiche poiché producono enzimi capaci di idrolizzare le matrici vegetali, rendendo maggiormente disponibili composti di interesse. La fermentazione in stato solido permette l'aumento della produttività enzimatica da parte di alcune classi di microrganismi inoculando gli stessi su scarti agroalimentari e la riduzione in termini di costi, poiché questi scarti agroalimentari e industriali possono essere usati come substrati di crescita.

1.4 Produzione di enzimi esocellulari da *Pleurotus ostreatus*

1.4.1 Biodegradazione di matrici lignocellulosiche da funghi white rot

I funghi basidiomiceti del tipo “white-rot” sono tra i microrganismi maggiormente attivi nella degradazione della lignina³³. Questa classe di microrganismi presenta diverse proprietà di notevole interesse:

- sono estremamente efficienti nei confronti dei substrati da trasformare e sono in grado di crescere e riprodursi in loro presenza;
- sono relativamente resistenti alla competizione con altri microrganismi;
- sono in grado di adattare il proprio metabolismo alla composizione del substrato da cui ricavano energia;
- non essendo patogeni, la loro manipolazione non costituisce fonte di pericolo.

Data la loro capacità di degradare la lignina e le strutture polisaccaridiche che costituiscono cellulosa ed emicellulosa, i funghi “white-rot” come *Pleurotus spp*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta* e *Bjerkandera adusta* possiedono il potenziale non solo di agire come pretrattamento biologico ma anche di degradare tutti i maggiori componenti della lignocellulosa in modo da ottenere un prodotto utile attraverso un complesso di enzimi idrolitici. Lo scopo dei funghi “white-rot” è di ottenere un accesso migliore alle componenti di cellulosa ed emicellulosa che costituiscono la fonte di nutrienti per il microrganismo, degradando la protezione effettuata dalla lignina.

1.4.2 Caratteristiche delle classi enzimatiche prodotte da *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus, un fungo edibile basidiomicete, sta riscontrando un crescente interesse biotecnologico legato alla sua capacità di degradare residui lignocellulosici e contemporaneamente produrre metaboliti secondari e proteine. Risulta quindi interessante il suo utilizzo in applicazioni farmaceutiche e di nella produzione di proteine per uso industriale³⁴. Il fungo produce un’ampia tipologia di enzimi esocellulari in grado di degradare diversi tipi di substrati lignocellulosici in sostanze solubili che possono essere usate come nutrienti (fig. 1.18).

Il genere *Pleurotus spp* è dotato di ife settate (quindi con pori che permettono il passaggio, in particolari condizioni, di organuli cellulari) mentre le spore sono sorrette da particolari organi

detti basidi, ciascuno dei quali porta solitamente 4 spore. Il fungo vero e proprio è costituito da un micelio bianco dall'aspetto cotonoso, a sua volta formato da ife filamentose (fig. 1.19 e 1.20). Il micelio aerobio si riproduce con facilità anche per semplice divisione fisica, essendo la sua crescita limitata esclusivamente dalla disponibilità di spazio e nutrienti, purché le condizioni ambientali ricadano in un dato intervallo di umidità relativa e temperatura. In fase sperimentale questi parametri vengono controllati per mantenere il fungo allo stato di micelio (senza svilupparne la parte aerobia), fase in cui vengono prodotti gli enzimi esocellulari.



Figura 1.18: Pleurotus ostreatus

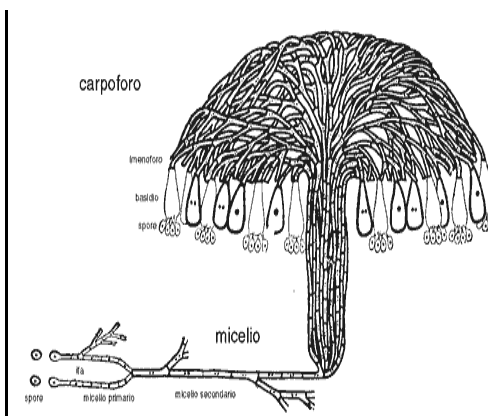


Figura 1.19: Struttura dei basidiomiceti



Figura 1.20: Pleurotus ostreatus cresciuto in piastra

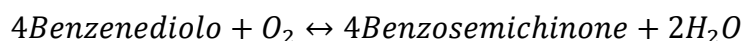
Il fungo è un attivo degradatore di lignina ed è un saprofito, capace di crescere e vivere a spese del materiale lignocellulosico che compone alcune porzioni vegetali di scarti agroalimentari. La difficile biodegradabilità della lignina rispetto alla maggior parte delle molecole biologiche dipende dalla trama molecolare molto fitta che ostacola l'ingresso delle grosse molecole enzimatiche e dal fatto che tale polimero si forma per poliaddizione di alcuni componenti. I microrganismi che si trovano a dover solubilizzare, per poi assimilare, macromolecole essenzialmente insolubili, producono e secernono all'esterno dalle loro ife, alcune classi di enzimi esocellulari che gradualmente attaccano e demoliscono (per

ossidazione nel caso della lignina, per idrolisi nel caso di cellulosa ed emicellulose) i costituenti macromolecolari del materiale lignocellulosico. Le piccole molecole solubili secrete, vengono poi assorbite dalle stesse ife ed utilizzate come nutrienti. La demolizione della lignina è come già accennato, un processo molto complicato e vari enzimi e meccanismi chimici devono cooperare secondo un ordine determinato per la completa degradazione e solubilizzazione di questa sostanza.

Il sistema enzimatico usato dai microrganismi per decomporre composti organici è di tipo ossidativo³⁵ e gli enzimi esocellulari caratteristici del *Pleurotus ostreatus*, considerati soprattutto in riferimento alla degradazione della lignina, sono essenzialmente polifenolossidasi. Questi enzimi sono responsabili dell'attacco primario a composti lignocellulosici, preparando migliori condizioni (monomeri fenolici e cellulosa resa disponibile) per la crescita del microrganismo.

Laccasi

La laccasi (EC:1.10.3.2) è un cuproenzima contenente ioni rame (di solito quattro) necessari alla sua attività di catalizzatore per l'ossidazione di fenoli e ammine aromatiche riducendo l'ossigeno molecolare ad acqua. Il primo stadio della reazione sui fenoli consiste nell'estrazione di idrogeno con la formazione di arilossi radicali come intermedi che possono subire ulteriori processi di ossidoriduzioni non enzimatiche o accoppiare con altre strutture fenoliche. La tipica reazione catalizzata è la seguente:



La capacità della laccasi di ossidare le ammine aromatiche è potenzialmente interessante anche per il trattamento delle acque reflue di colorifici, industrie della carta e processi di decolorazione dei tessuti. Infatti moltissimi coloranti sintetici derivano da ammine aromatiche diazotate, oltre che da composti fenolici, anch'essi spesso substrati delle laccasi³⁶.

Cellulasi

Le cellulasi (EC:3.2.1.4) sono una famiglia di enzimi appartenenti alle idrolasi in grado di idrolizzare il legame β 1-4 glucosidico delle fibre di cellulosa. Sono ottenuti a partire da funghi come *Pleurotus spp* e si dividono in 3 classi principali:

- Endocellulasi, capaci di aggredire i legami ad idrogeno che si formano fra le diverse catene di cellulosa che costituiscono le fibrille;
- Esocellulasi, in grado di attaccare la catena polisaccaridica in posizione terminale, liberando oligomeri di cellobiosio;
- β -glucosidasi in grado di idrolizzare il cellobiosio nei suoi monomeri di glucosio.

Questo gruppo di enzimi insieme ad altri complessi appartengono ad una importante categoria coinvolta nei processi di industria tessile e produzione di fine chemicals e combustibili³⁷.

Xilanasi

Lo xilano si trova nella parete secondaria delle cellule vegetali e forma una sorta di interfase tra la lignina e altri polisaccaridi; costituisce di per sé il composto polisaccaridico non celluloso più importante dell'emicellulosa. La catena principale è composta da residui di xilosio uniti mediante legami glicosidici β -1,4 con catene laterali di varia natura. Le xilanasi (EC: 3.2.1.8) sono una classe di enzimi che catalizzano l'idrolisi dei legami glicosidici tra i residui di xilano. La degradazione completa dello xilano richiede l'azione di xilanasi, endo beta-1,4 xilanasi e beta-1,4 xilosidasi. L'uso di xilanasi termostabili ha trovato negli ultimi anni un'importante funzione sbiancante nell'industria della carta³⁸ e nel rendere più digeribili diversi prodotti per l'alimentazione umana ed animale.

Pectinasi³⁹

Le pectinasi sono una vasta famiglia di enzimi in grado di aggredire le diverse e complicatissime strutture poligalatturoniche dei vegetali. Questi biocatalizzatori sono tra i più diffusi per applicazioni industriali soprattutto nei settori di produzione di succhi e alimenti in generale. Si stima che questi preparati costituiscano il 25% del mercato globale degli enzimi e la più comune fonte dal quale vengono estratti è *Aspergillus niger*.

Le pectinasi sono classificate in base al tipo di legame che idrolizzano nella struttura pectica (Figura 1.21):

- le polimetilgalatturonasi e le poligalatturonasi (EC 3.2.1.15) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico più o meno metilato
- le pectinesterasi (EC 3.1.1.11) rimuovono il gruppo metile delle pectine idrolizzando il legame estere, ove presente, del carbossile del galatturone;
- le pectinliasi (EC 4.2.2.10) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico tramite un meccanismo di trans-eliminazione inusuale per la carboidrati che produce dei galatturonati o metil-galatturonati insaturi

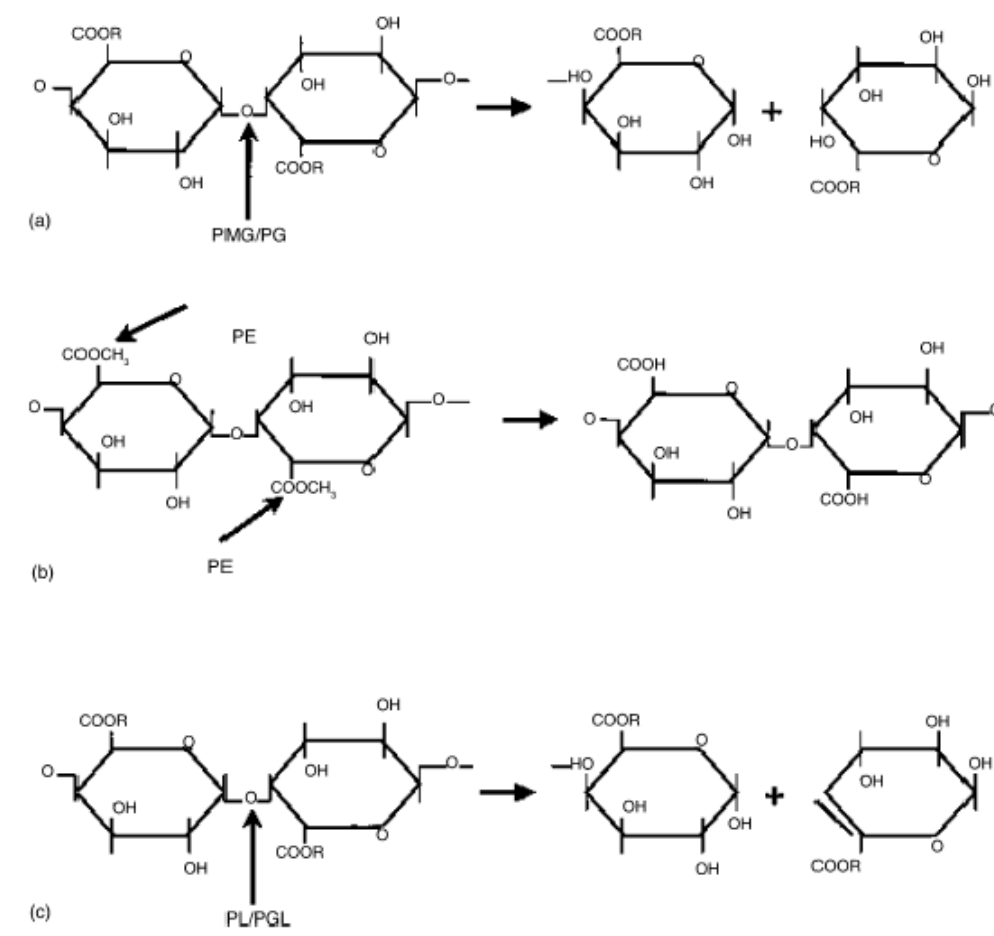


Figura 1.21: Modello di azione della pectinasi: (a) $\text{R}=\text{H}$ per PG e $\text{R}=\text{CH}_3$ per PMG; (b) modello per PE; (c) $\text{R}=\text{H}$ per PGL e $\text{R}=\text{CH}_3$ per PL. La freccia indica il legame idrolizzato. PMG, polimetilgalatturonasi; PG, poligalatturonasi; PE, pectinesterasi; PL, pectinliasi.⁴⁰

Cinnamoilesterasi

Gli esteri cinnamici rientrano nella parziale costituzione della parete vegetale, il cui probabile ruolo è di ridurre la biodegradabilità della parete cellulare e regolare la crescita attraverso il reticolo formato dalle fibre polimeriche della parete vegetale. Il loro contenuto all'interno della matrice vegetale può raggiungere fino al 2,5% (p/p) della parete vegetale. Risulta dunque crescente l'interesse verso enzimi coinvolti nella loro liberazione come le cinnamoilesterasi (in particolare feruloil e p-cumaroil esterasi) in grado di rilasciare vari tipi di acidi cinnamici. Alla categoria delle arilesterasi appartengono enzimi in grado di idrolizzare i legami estere creatisi tra la funzionalità carbossilica di un fenolo acido e una funzionalità idrossile di un carboidrato facente parte delle strutture polisaccaridiche della parete cellulare vegetale. I fenoli esterificati principalmente presenti nelle pareti vegetali sono l'acido cumarico, l'acido cinnamico e l'acido ferulico. Le potenziali applicazioni di questi enzimi includono la degradazione completa di materiale vegetale, l'isolamento di acidi fenolici come produzione di sostanze "fine chemicals" da scarti agroalimentari e la valutazione e miglioramento delle proprietà sensoriali del vino^{41,42}.

1.5 Fermentazione in stato solido (SSF)

1.5.1 Proprietà del sistema SSF nei processi di produzione enzimatica

Il sistema di fermentazione in stato solido sta emergendo come una potenziale strumento tecnologico per la produzione di composti di origine microbica coinvolti nel settore energetico, alimentare, farmaceutico e nell'industria chimica.

Il processo di fermentazione in stato solido (SSF) è caratterizzato dalla crescita di microrganismi, tipicamente funghi o muffe, su materiale solido in assenza o quasi di flusso libero di acqua. La natura dei materiali solidi utilizzati nei SSF può essere classificata in due categorie: inerte, ovvero materiali sintetici che fungono da superficie di attacco per il fungo e da sistema di trattenimento delle porzioni solide, e non inerte, materiali organici che costituiscono la fonte di nutrienti e supporto della crescita, definita substrato di supporto. L'uso di scarti agroalimentari come substrato di supporto nei processi di SSF fornisce un percorso alternativo e di valore aggiunto per tali prodotti che altrimenti resterebbero sotto o

addirittura non sviluppati⁴³. I processi di SSF possiedono caratteristiche che rendono tale sistema particolarmente adatto per la produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi filamentosi, riproducendo con buona approssimazione le condizioni naturali per lo sviluppo e le attività del microrganismo⁴⁴.

Nello sviluppo del modello SSF esiste una serie di importanti aspetti tenuti in considerazione per l'ottimizzazione del processo, tra le quali un'adeguata selezione dei microrganismi e del substrato di crescita. Secondo le classificazioni legate all'attività dell'acqua (a_w) e la capacità di crescita, solamente i funghi e i lieviti sono considerati come i microrganismi idonei alla crescita in SSF (fig. 1.22) così come gli scarti agroalimentari sono generalmente considerati i substrati di elezione del processo. La selezione del substrato per la produzione di enzimi esocellulari in un processo di SSF, dipende da una serie di fattori, soprattutto legati ai costi e alla disponibilità del substrato. Il substrato solido organico non solo fornisce i nutrienti per la crescita, ma riveste un ruolo fondamentale per l'ancoraggio della struttura del microrganismo⁴⁵.

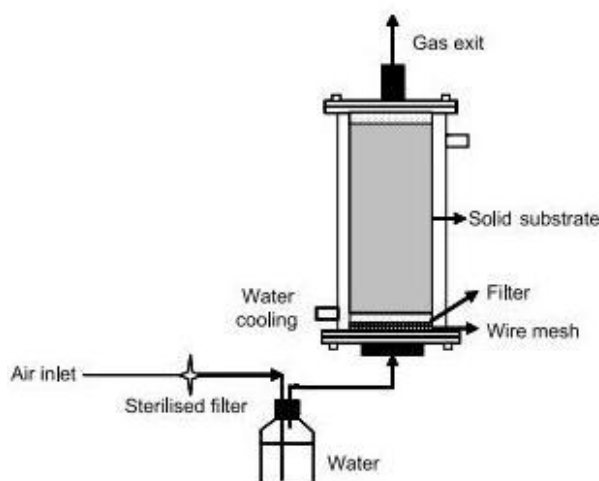


Figura 1.22: Modello di fermentatore in stato solido(SSF)

Un'altra serie di fattori influenzano la sintesi di enzimi da parte dei microrganismi in un sistema SSF includendo: l'eventuale pretrattamento del substrato tale da agevolare il contatto con il microrganismo, la dimensione delle porzioni di substrato (spazio interparticellare e area superficiale disponibile), il contenuto e l'attività dell'acqua del substrato, valore del pH, umidità relativa, tipologia e dimensione dell'inoculo, controllo della temperatura di fermentazione, periodo di crescita della coltura, mantenimento di uniformità nel sistema ambiente del bioreattore SSF e la composizione gassosa dell'atmosfera, come tasso di consumo di ossigeno e produzione di CO₂. Tra questi, l'uso di un substrato reso in piccole porzioni e il livello di umidità e attività dell'acqua sono i punti più critici nel corso della

messa a punto del sistema⁴⁶. Generalmente, porzioni più piccole di substrato forniscono una maggiore area superficiale favorendo l'attacco microbico e rappresentando un notevole vantaggio per la crescita. Tuttavia, parti troppo piccole e fini di substrato rischiano di causare la formazione di accumuli solidi, apportando il rischio di interferimento con i processi di respirazione microbica e causando quindi una crescita ridotta. Di contro, particelle di dimensione maggiore pur garantendo una migliore efficienza di respirazione ed aerazione (dovuta al maggiore spazio interparticellare), possiedono una limitata superficie per l'attacco microbico diminuendo il rendimento di crescita. Questo parametro necessita quindi di un compromesso nella selezione della dimensione delle particelle basato sulla specificità del processo. A differenza dei bioreattori in stato sommerso (SmF), nel SSF, la crescita microbica e la formazione dei prodotti di fermentazione avvengono sulla superficie delle porzioni di substrato solido in cui è presente un basso livello di umidità, fondamentale per mantenere un contenuto di acqua ottimizzato e controllare l' a_w del substrato fermentante in quanto l'elevata o modesta disponibilità di acqua influenza negativamente l'attività microbica. Il contenuto di acqua ha pure una profonda influenza sulle proprietà chimico-fisiche dei solidi costituendo un ulteriore parametro da stabilire per la produttività del processo complessivo. Il principio base del SSF è il "substrato di supporto solido" che include la fase solida ed il vuoto interparticellare⁴⁷. Il sistema SSF è maggiormente utilizzabile con funghi filamentosi in grado di crescere sulla superficie delle particelle e raggiungere le diverse parti del supporto, infiltrandosi attraverso gli spazi interparticellari. In natura questo processo si svolge in molti casi in condizioni aerobiche che vengono mantenute anche in questo lavoro di tesi. In numerosi altri lavori, sono stati studiati e potenziati diversi modelli di SSF, sulla base della finalità di utilizzo del sistema.

Il processo SSF in laboratorio viene generalmente condotto in fiasche, becker, piastre Petri, colonne in vetro, pirex e bottiglie in vetro mentre su scala industriale occorre progettare un reattore adatto a superare problemi come l'influenza della temperatura, il trasferimento di massa e l'estrazione di metaboliti, oltre alla messa a punto di un metodo di aereazione e agitazione del complesso. Attualmente tutte queste problematiche sono oggetto di approfondimento per ciò che riguarda i sistemi di progettazione dei sistemi di fermentazione in stato solido⁴⁸.

1.5.2 Sistemi di fermentazione a confronto: SmF e SSF

Buona parte della produzione enzimatica a livello industriale avviene attraverso l'uso di fermentatori in stato sommerso (SmF). Negli ultimi decenni tuttavia si è assistito ad una crescente tendenza verso l'uso del modello di fermentazione in stato solido (SSF) per lo sviluppo produttivo di diverse classi di enzimi. Questa tecnica riproduce i processi microbiologici naturali portandoli a livello industriale, all'interno di un sistema controllato per la produzione del metabolita richiesto. Presenta inoltre una serie di vantaggi rispetto al SmF tradizionalmente usato (fig. 1.23).

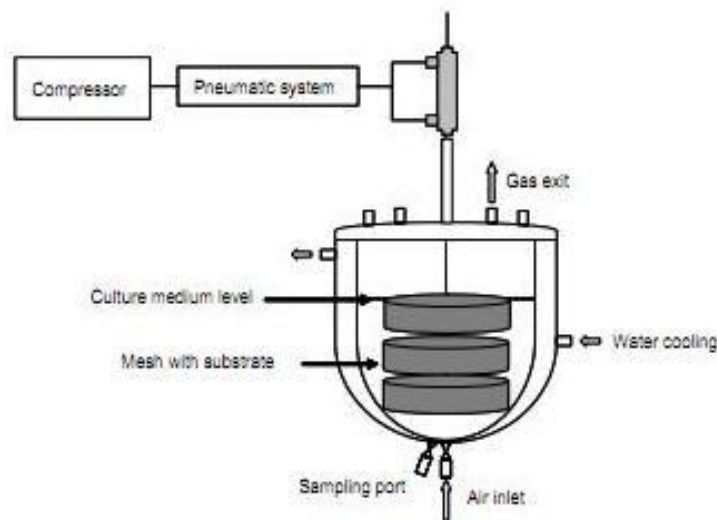


Figura 1.23: Schema di fermentatore sommerso (SmF)

Un confronto diretto tra i due sistemi di fermentazione non è semplice da elaborare considerando le sostanziali differenze di base. Studi sulla produzione enzimatica da parte di funghi filamentosi in SSF hanno mostrato che questo, rispetto al sistema SmF, fornisce maggiori volumi in termini di produttività, risulta meno sottoposto a problematiche di inibizione da substrato e garantisce una maggiore stabilità del valore di pH, inoltre la produzione enzimatica può avvenire a temperature più elevate. Anche il tempo previsto per il processo fermentativo risulta minore e la degradazione degli enzimi prodotti da parte di proteinasi non desiderate è minimizzata⁴⁹. Inoltre, il modello SSF ha il vantaggio di essere un processo statico, senza la necessità di consumare energia meccanica. Nonostante gli evidenti vantaggi rispetto al sistema SmF, numerose ricerche hanno come obiettivo il potenziamento di alcuni aspetti del SSF. Si presentano infatti una serie di problemi nel controllo di parametri come pH, temperatura, aereazione, trasferimento di ossigeno, umidità e agitazione. Su scala di

laboratorio, un certo numero di attività hanno riportato notevoli risultati in termini di produzione tuttavia, quando questi processi vengono riprodotti su scala industriale, i risultati si presentano piuttosto deludenti, confermando le difficoltà di un buono scale up per ciò che riguarda il modello SSF. Questo può essere attribuito alle condizioni di crescita dei microrganismi, radicalmente differenti, rispetto al sistema su scala industriale. In scala di laboratorio infatti, condizioni come la temperatura, l' a_w e il pH possono essere controllate con maggiore facilità e mantenute a livelli di optimum costante. Alcune simulazioni effettuate con un impianto SSF pilota, hanno fatto emergere problematiche legate alle basse temperature, al ridotto trasferimento della massa (caratteristica del supporto poroso solido) ed alla scarsa agitazione del complesso atto ad evitare il danneggiamento dei microrganismi. Il controllo dei parametri e della progettazione ottimale di sistemi SSF è tuttora in fase di studio. Nonostante ciò, i processi SSF hanno mostrato di essere particolarmente adatti per la produzione di enzimi da parte di funghi filamentosi poiché ne riproducono le condizioni ambientali naturali⁵⁰ favorendo la colonizzazione e la penetrazione nei substrati di supporto solido, per la ricerca di nutrienti. L'uso di scarti agroalimentari nei processi di SSF, fornisce quindi un substrato alternativo, riducendo al contempo i problemi di inquinamento causati dal loro accumulo. In questo contesto trova una importanza fondamentale l'utilizzo di funghi "white-rot", microrganismi in grado di degradare il sistema delle matrici vegetali tramite la secrezione di un complesso lignocellulolitico esocellulare durante il loro secondo metabolismo in risposta alla limitazione di nutrienti.

2 Scopo della tesi

Le biomasse vegetali costituiscono una fonte rilevante di *secondary chemical building blocks* attualmente non pienamente sfruttata in genere composta da cellulosa, emicellulose, lignina, amido, proteine, acidi grassi/trigliceridi, oli essenziali, gomme a cui sono legati dal 3 all'8% p/p secco di fenoli. Il recupero di tutte queste componenti può costituire una valida via di valorizzazione per l'ottenimento di materie prime a basso costo, ma ad alto valore aggiunto da inserire come prodotti in diversi settori dell'industria come quello cosmetico, farmaceutico, alimentare, nutraceutico, e non ultimo quello della chimica di sintesi. Grazie all'utilizzo di enzimi (es: cellulasi, amilasi, pectinasi, polifenolossidasi, arilesterasi,...), aventi diverse attività sfruttate in sequenza e/o simultaneamente, è possibile idrolizzare le strutture che legano e/o imprigionano il pool di composti chimici che compongono il fitocomplesso attivo, andando a bioliquefare il vegetale e ottenendo così un bioliquefatto, un prodotto liquido acquoso altamente ricco in principi attivi naturali. I biocatalizzatori enzimatici sono sempre più largamente impiegati in molti settori dell'industria chimico-farmaceutica e della e trasformazioni agroalimentari a causa della loro intrinseca regio e stereo-selettività, nonché per il loro potenziale come efficienti catalizzatori alternativi per la chimica verde. E' evidente che un processo di bioraffinazione industriale ha il suo tallone di Achille proprio nel costo dell'enzima che può rendere insostenibile l'impianto. La necessità di produrre enzimi a costi contenuti ha spinto la ricerca verso la possibilità di sviluppare fermentazioni in stato solido su scarti agro-alimentari attraverso l'utilizzo di biomasse fungine come i basidiomiceti. *Pleurotus ostreatus* così come *Agaricus bisporus* sono tipici funghi superiori ampiamente coltivati su scala industriale in quanto commestibili. Il loro carattere edule li rende piuttosto interessanti per lo sviluppo di nuovi processi industriali.

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio di fermentazioni in stato solido su scarti agro-alimentari tramite *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus*. In particolare si intende esplorare:

- La produzione di enzimi lignocellulotici da parte di *Pleurotus ostreatus* all'interno di un fermentatore in stato solido (SSF) su diversi substrati di scarto di provenienza agroalimentare del settore cerealicolo (paglia e crusca di grano) e viti-vinicolo (graspi d'uva e vinaccioli). Per questo motivo in questo lavoro si è esplorato l'effetto di una fase di estrusione durante la fermentazione al fine di superare gli stati limitanti che tipicamente sono legati alla biodisponibilità del substrato e alla diffusione dell'ossigeno.

- La presenza di attività enzimatiche all'interno di matrici di scarto della produzione industriale di *Agaricus bisporus* (meglio conosciuto con il nome di Champignon) nell'ambito di una valorizzazione di rifiuti industriali da produzione di biomasse eduli.
- La possibilità di utilizzare gli estratti enzimatici, ottenuti dai percolati dei fermentatori in stato solido dinamico da *Pleurotus ostreatus* o statico da *Agaricus bisporus*, per l'idrolisi degli scarti agro-alimentari utilizzati come substrati di crescita.

3 Materiali e metodi

3.1 Recupero del percolato

La produzione enzimatica da parte del fungo *Pleurotus ostreatus* viene indotta all'interno di un fermentatore in stato solido denominato biocella, in cui il fungo è posto a contatto con la matrice vegetale dello scarto e il sistema viene chiuso con un tappo in cotone che consente l'ossigenazione del sistema. Per il recupero e l'estrazione enzimatica, viene aggiunta una quantità d'acqua sterile sufficiente al prelievo di un volume di percolato in cui siano presenti i prodotti di fermentazione.

I saggi descritti successivamente, prevedono l'analisi del percolato raccolto per la determinazione dell'attività degli enzimi esocellulari ottenuti in seguito al processo di fermentazione.

3.2 Estrusione del sistema e intervallo di estrazione

Nel corso di precedenti lavori di tesi all'interno del laboratorio è stato verificato come l'intervallo di estrazione e la movimentazione del sistema influiscano significativamente sulla produzione enzimatica e sull'attività riscontrata all'interno di una stessa matrice. L'intervallo di movimentazione ed estrazione ideale è risultato essere ogni 7 giorni permettendo in questo modo di analizzare più di un substrato di crescita nel corso della settimana in quanto ognuno di essi è stato fatto partire in maniera sfalsata rispetto agli altri. È stato inoltre notato come la periodica movimentazione del sistema permetta la rottura delle ife e la contemporanea ossigenazione del substrato rendendo possibile un aumento della produzione enzimatica. In questo lavoro si è valutato l'utilizzo di un sistema di estrusione meccanica con il duplice scopo di movimentare il sistema e ridurre contemporaneamente le dimensioni tentando di confrontarlo con il precedente metodo di semplice spostamento del substrato.

L'operazione di estrusione viene effettuata tramite l'utilizzo di un "trita-carne manuale" opportunamente sterilizzato per ridurre fenomeni di contaminazione esterna. L'apparato estrusore (figura 3.1) è costituito da una coclea in grado di comprimere la matrice su una griglia forata avente fori del diametro di 5 mm.

Prima di ogni estrazione è stato quindi aggiunto il passaggio all'interno del trita-carne seguito dall'aggiunta di un'aliquota di acqua distillata sterile, dal recupero del percolato e dalla sua successiva analisi.



Figura 3.1: passaggio di estrusione della matrice

3.3 Coltura del micelio fungino di *Pleurotus ostreatus*

Per la produzione di enzimi extra-cellulari è stato utilizzato un ceppo di micelio del fungo basidiomicete *Pleurotus ostreatus*, cresciuto su chicchi di grano e commercializzato come prodotto umido, acquistato presso l'Azienda Agricola Funghi Mara ®, BO.

3.4 Preparazione del terreno di coltura agarizzato con estratto di malto

E' stato utilizzato il seguente terreno di coltura solido:

3 g estratto di malto

2 g agar

100 ml acqua distillata

Tutti i componenti vengono sciolti sotto agitazione magnetica ad una temperatura di circa 70°C e successivamente sterilizzati in autoclave a 120°C per 20 minuti.

Dallo stock di partenza, si preleva un pezzetto di micelio cresciuto su chicchi di grano e lo si inocula al centro di una piastra Petri agarizzata con il terreno a base di malto e posto in stufa a 30°C per indurne la crescita.

Per cercare di evitare eventuali contaminazioni, dopo 5-6 giorni sono state prelevate, sterilmente sotto cappa biologica, le ife cresciute intorno al micelio di partenza di piastre in cui non si evidenziava alcuna contaminazione. Queste sono state inoculate sulla superficie di una nuova piastra agarizzata con un terreno di uguale composizione. La crescita delle colonie avviene in stufa a 30°C.

3.5 Saggi di determinazione enzimatica

Tutti i saggi enzimatici sono stati sviluppati utilizzando il percolato ottenuto dal processo di fermentazione di *Pleurotus ostreatus* cresciuto sulle matrici vegetali provenienti da scarti agroalimentari all'interno dei fermentatori in stato solido a biocella. I prodotti di reazione sono stati determinati spettrofotometricamente e tutte le prove sono eseguite con campioni preparati in doppio.

3.5.1 Determinazione dell'attività laccasica

Per la determinazione dell'attività laccasica è stata utilizzata una metodica messa a punto da Setti et al⁵¹ basata sulla reazione di accoppiamento ossidativo tra il 3-metil 2-benzotiazolinone idrazone (MBTH) e l'orto-metossifenolo (guaiacolo Sigma) come mostrato in figura 3.2

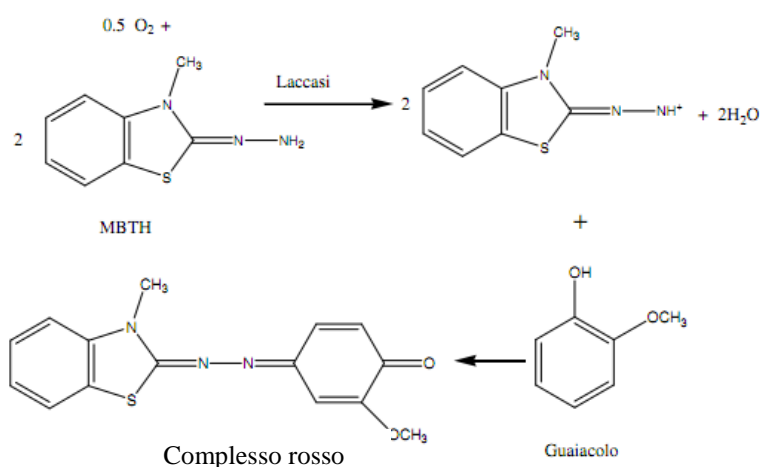


Figura 3.2: reazione di accoppiamento ossidativo tra MBTH e guaiacolo per la determinazione dell'attività laccasica

I campioni sono preparati aggiungendo a 3 ml di tampone fosfato (25 mM, pH 6,5), 100 µl di percolato, 50 µl di guaiacolo 500 mM in etanolo all'interno di una provetta e lasciati in incubazione sotto agitazione, a 30°C per 7 minuti (il bianco è preparato allo stesso modo, ma senza guaiacolo). A questa soluzione si aggiungono poi 500 µl di MBTH 0,05% (p/v) per un intervallo di tempo necessario allo sviluppo di un complesso cromatico di colore rosso, che rientri nel range di lettura spettrofotometrica, corrispondente al prodotto della reazione. La reazione è fermata aggiungendo in rapida successione 500 µl di H₂SO₄ 1 N e 1 ml di acetone. I campioni sono letti allo spettrofotometro a 502 nm contro il bianco (l'assorbanza è stabile fino a 30 minuti). L'attività è calcolata con la seguente formula:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{Abs}_{502\text{nm}} * 10^3}{t * \epsilon * b} * \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enz}}}$$

Abs = valore di assorbanza a 502 nm

t = tempo di reazione (minuti)

b = spessore della cuvetta (1 cm)

ε = coefficiente d'estinzione molare 8,355 mM⁻¹cm⁻¹

V_{tot} = volume totale di reazione (ml)

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

3.5.2 Preparazione del bianco di controllo per la determinazione delle attività cellulasica, xilanasica e pectinasica

I saggi delle attività cellulasica, xilanasica e pectinasica prevedono l'uso di un bianco preparato con la stessa procedura del campione, sostituendo però all'aggiunta del percolato recuperato dai fermentatori, un volume equivalente di acqua distillata nella soluzione. Dato che il percolato potrebbe contenere una certa quantità di zuccheri riducenti endogeni di partenza e dare quindi una possibile interferenza nella determinazione delle attività enzimatiche, è stato preparato un campione definito "bianco di controllo" con il percolato alle stesse concentrazioni usate nei saggi, e acqua o tampone in sostituzione al substrato (nel caso del saggio di attività xilanasica e zuccheri riducenti) o senza substrato (nel caso del saggio di attività cellulasica con carta funzionalizzata) per fare in modo che la reazione non venga innescata ma si possa quantificare l'eventuale presenza di zuccheri riducenti presenti nel percolato e non dovuti al processo idrolitico degli enzimi esocellulari in analisi. Il "bianco di controllo" viene letto contro un bianco preparato esclusivamente con acqua, alle lunghezze d'onda di lettura stabilite dai saggi e il valore viene sottratto dalla lettura spettrofotometrica del corrispondente campione di riferimento.

3.5.3 Determinazione dell'attività cellulasica

Per l'analisi dell'attività cellulasica sono stati utilizzati due metodi: saggio con la carta funzionalizzata e determinazione degli zuccheri riducenti.

- Saggio di determinazione con carta funzionalizzata

La procedura segue il metodo di Poincelot et al⁵² basato sulla lettura spettrofotometrica del prodotto di reazione ottenuto dalla degradazione della cellulosa funzionalizzata dopo incubazione con il percolato raccolto dai processi di fermentazione. I campioni sono preparati aggiungendo a 2 ml di tampone sodio citrato (0,05 M pH 4.8), 1 ml di percolato, 50 mg di cellulosa funzionalizzata con Remazol Brillant Bleu R (RBBR)¹ ed incubati a 50°C, sotto agitazione per 6 ore. Il bianco viene preparato con la stessa procedura sostituendo il volume di percolato aggiunto, con acqua distillata. La lettura spettrofotometrica viene eseguita ad un lunghezza d'onda di 595 nm dopo aver lasciato decantare la soluzione per 5 minuti al termine delle 6 ore di incubazione. Da lavori di tesi precedenti⁵³ è stata individuata nel corso di prove in laboratorio una relazione costante tra il rilascio di colore della carta funzionalizzata e la quantità di glucosio in soluzione. Tale rapporto è rappresentato dal fattore di determinazione 27,3.

L'attività cellulasica viene espressa come:

$$\text{Attività (mM glucosio rilasciato/min)} = \frac{27,3 *}{360}$$

¹ Funzionalizzazione della cellulosa con RBBR: 3 filtri di cellulosa (Whatman Ø = 7cm) all'interno di una vaschetta, sono stati aggiunti in sequenza: 250 ml di H₂O a 100°C; 250 ml di RBBR (1.5 g in 250 ml) a 100°C in cui il colore viene distribuito agitando la vaschetta; 5 aliquote di 20 ml ciascuna di Na₂SO₄(30 g in 100 ml) a 100°C a intervalli di 2 minuti l'una dall'altra durante cui la vaschetta viene mantenuta in agitazione, infine vengono aggiunti 15ml di Na₃PO₄ (1.5 g in 15 ml) a 100°C, si agita e si lascia riposare per 10 minuti. La carta viene quindi lavata più volte con H₂O fino a quando questa non risulta incolore; l'ultimo lavaggio viene fatto con metanolo.

27,3 = fattore di conversione per la determinazione di mM di glucosio rilasciato in 6 ore (360 minuti)

Abs = valore di assorbanza a 595 nm

- Metodo della determinazione degli zuccheri riducenti

Per la determinazione degli zuccheri riducenti è stata seguita la procedura basata sul metodo di Bailey et al.⁵⁴ che consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti, tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS)². Gli zuccheri riducenti da determinare sono le frazioni di glucosio liberate dall'idrolisi della cellulosa funzionalizzata catalizzata dall'attività cellulase presente nel tubo di reazione.

La reazione che avviene tra il reattivo ADNS e uno zucchero, alla base del metodo, è riportata in figura 3.2:

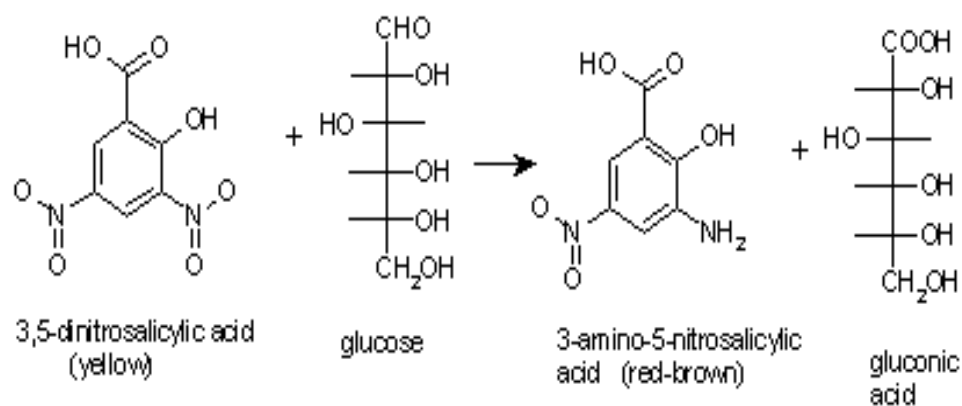


Figura 3.3: reazione ossidativa fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso)

Per determinare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse presenti nei campioni si utilizza la retta di taratura preparata a partire da soluzioni standard di D(+)-glucosio (p.m. C₆H₁₂O₆ 180,16 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 0,8 mg/ml in acqua come mostrato in figura 3.3.

² 75g di sodio potassio tartrato vengono scolti in 50 ml di NaOH 2M , portando a volume di circa 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di Acido Dinitrosalicilico (la dissoluzione di ADNS è lenta ma non bisogna riscaldare, e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni). Quando ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con H₂O distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

$$\text{Glucosio rilasciato (mg/ml)} = (\text{Abs}_{550\text{nm}} + 0,0591) / 1,1121$$

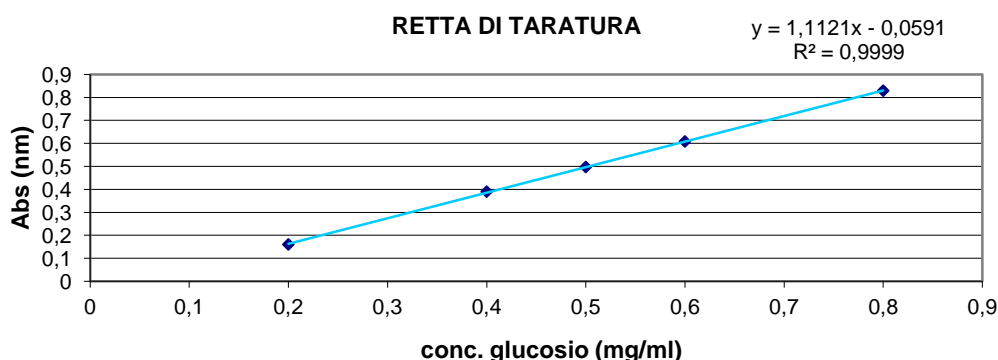


Figura 3.4: Retta di taratura per la determinazione degli zuccheri riducenti (glucosio) nei campioni ottenuti dalla reazione tra l'attività cellulasica presente nel volume di percolato raccolto e la carta funzionalizzata

Per la determinazione degli zuccheri riducenti presenti nella soluzione ottenuta dall'incubazione di 6 ore tra il percolato e il substrato carta funzionalizzata, si aggiungono 400 μl della soluzione ricavata dai campioni e dal bianco (preparato aggiungendo 1 ml di acqua distillata al posto del percolato) a 600 μl di ADNS, lasciando in acqua bollente per 7 minuti. Dopo aver raffreddato e centrifugato (13000 rpm per 5 minuti) viene eseguita la lettura spettrofotometrica a 550 nm. Per il calcolo dell'attività cellulasica viene utilizzata la seguente formula:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{glucosio (mmol/ml)} * 10^3 * V_{\text{tot}}}{t * b * V_{\text{enz}}}$$

$$\text{glucosio (mmol/ml)} = \text{zuccheri ricavati (mg/ml)} / \text{ml}$$

t = tempo di reazione (minuti)

b = spessore della cuvetta (1 cm)

V_{tot} = volume totale di reazione (ml)

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

3.5.4 Determinazione dell'attività xilanasica

Per la determinazione dell'attività xilanasica, è stato seguito il metodo descritto da Bailey et al.⁵⁴. La procedura consente la determinazione spettrofotometrica dello xilosio (unità che costituisce la struttura polimerica dello xilano), zucchero riducente liberato tramite reazione ossidativa della xilanasi, con acido 3,5-dinitrosalicilico (ADNS)². Per verificare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse, presenti nei campioni si utilizza la retta di taratura preparata a partire da soluzioni di xilosio (p.m. 150,13 g/mol) riportata in figura 3.5.

$$\text{Xilosio rilasciato (mg/ml)} = (\text{Abs } 550_{\text{nm}} + 0,055)/1,1895$$

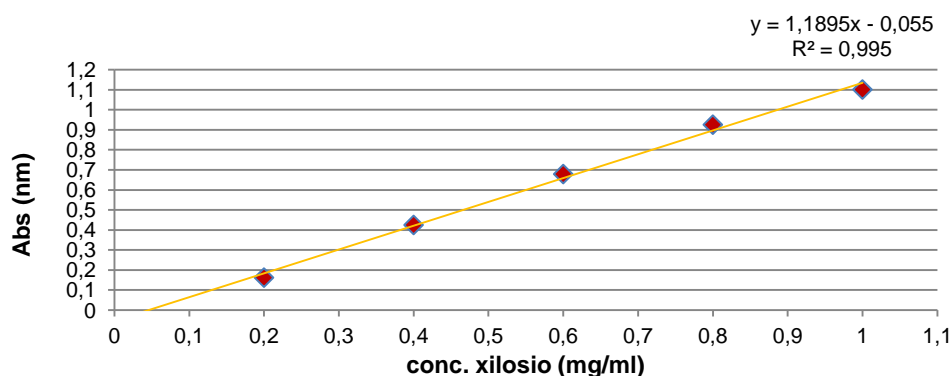


Figura 3.5: retta di taratura per la determinazione dell'attività xilanasica

Per la preparazione del substrato modello su cui verrà saggiata l'attività xilanasica presente nel percolato raccolto dai fermentatori, si utilizza lo xilano (xylan from beechwood, Sigma-Aldrich). Le soluzioni di xilano vengono preparate in tampone citrato-fosfato pH 5 (valore di pH ottimale del tampone per l'attività xilanasica) allo 0,3%. Lo xilano viene solubilizzato mantenendo la soluzione in ebollizione e sotto agitazione magnetica per 3 minuti. Dopo il raffreddamento, il substrato viene incubato a temperatura costante di 30°C sotto agitazione per 4 ore.

La reazione enzimatica viene eseguita aggiungendo 200 µl di percolato raccolto ad 1,8 ml di substrato xilano ed incubati sotto agitazione a 30°C per 3 minuti. Successivamente si determinano gli zuccheri riducenti come descritto per il metodo di determinazione degli zuccheri riducenti nel paragrafo 3.5.3. La lettura spettrofotometrica viene effettuata contro un bianco preparato analogamente ai campioni, aggiungendo a 1,8 ml di substrato, 200 µl di acqua distillata.

L'attività xilanasica viene determinata con la formula seguente:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{xilosio (mmol/ml)} * 10^3 * V_{\text{tot}}}{t * b * V_{\text{enz}}}$$

xilosio (mmol/ml) = zuccheri ri

t = tempo di reazione (minuti)

b = spessore della cuvetta (1 cm)

V_{tot} = volume totale di reazione (ml)

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

3.5.5 Determinazione dell'attività pectinasica

Per la determinazione dell'attività pectinasica, si segue un procedimento analogo a quello per il calcolo dell'attività xilanasica (Bailey et al). La procedura consente la determinazione spettrofotometrica dell'acido galatturonico (unità che costituisce la struttura polimerica della pectina), zucchero riducente liberato tramite reazione ossidativa della pectinasi, con acido 3,5-dinitrosalicilico (ADNS). Per verificare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse, si utilizza la retta di taratura preparata a partire da soluzioni di acido galatturonico (p.m. 150,13 g/mol) riportata in figura 3.6.

$$\text{Acido galatturonico rilasciato (mg/ml)} = (\text{Abs } 550_{\text{nm}} + 0,044)/1,112$$

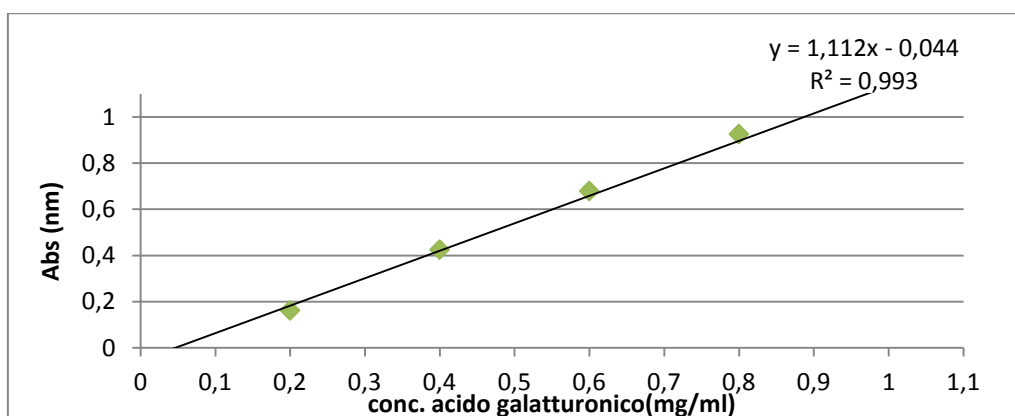


Figura 3.6: retta di taratura per la determinazione dell'attività pectinasica

Per la preparazione del substrato modello su cui verrà saggiata l'attività pectinasica presente nel percolato raccolto dai fermentatori, si utilizza la pectina (Pectin from citrus peel, Fluka). Le soluzioni di pectina vengono preparate in tampone citrato-fosfato pH 3,8 (valore di pH ottimale del tampone per l'attività pectinasica) allo 0,3%. Lo xilano viene solubilizzato mantenendo la soluzione in ebollizione e sotto agitazione magnetica per 3 minuti.

La reazione enzimatica viene eseguita aggiungendo 200 μl di percolato raccolto ad 1,8 ml di substrato xilano ed incubati sotto agitazione a 30°C per 3 minuti. Successivamente si determinano gli zuccheri riducenti come descritto per il metodo di determinazione degli

zuccheri riducenti nel paragrafo 3.5.3. La lettura spettrofotometrica viene effettuata contro un bianco preparato analogamente ai campioni, aggiungendo a 1,8 ml di substrato, 200 µl di acqua distillata.

L'attività pectinasi viene determinata con la formula seguente:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{Ac. galatturonico (mmol/ml)} * 10^3 * V_{\text{tot}}}{t * b * V_{\text{enz}}}$$

Acido galatturonico (mmol/ml) t * b * V_{enz} (ml)

t = tempo di reazione (minuti)

b = spessore della cuvetta (1 cm)

V_{tot} = volume totale di reazione (ml)

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

3.5.6 Determinazione dell'attività arilesterasica

La cinetica di formazione degli acidi cinnamici⁵⁵, ferulico e caffeico, dai relativi metil esteri è stata determinata spettrofotometricamente misurando la variazione d'assorbanza a 335 nm come estinzione del substrato e formazione degli acidi corrispondenti. L'attività esterasica di un enzima nei confronti degli esteri tipicamente nella struttura della parete cellulare come ferulati (fig. 3.7) e caffeati (fig. 3.8) può essere determinata nel modo descritto:

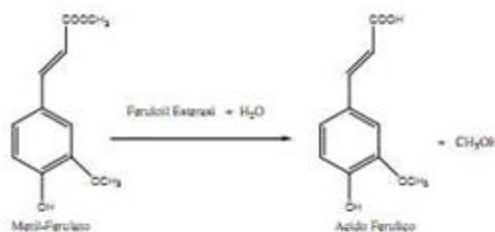


Figura 3.7: reazione idrolitica su metil-ferulato di una feruloil esterasi

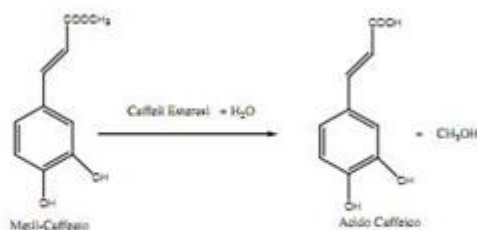


Figura 3.8: reazione idrolitica su metil-caffeato di una caffeoil esterasi

Per la preparazione delle soluzioni dei substrati 0,1 mM, il metilcaffeato e metiferulato vengono sciolti in 1 ml di metanolo e successivamente solubilizzati in 100 ml di tampone fosfato 100 mM a pH 6.

Il campione è stato preparato aggiungendo a 900 μl di tampone fosfato 100 mM a pH 6, 100 μl di substrato e 50 μl di percolato. Il decremento del substrato all'interno della cuvetta di reazione viene letto a 335 nm contro un bianco preparato secondo la stessa procedura del campione, ad eccezione dell'aggiunta del percolato. L'attività enzimatica viene calcolata secondo la formula:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta \text{Abs} * 10^3 * V_{\text{tot}}}{\Delta t * \epsilon * V_{\text{enz}}}$$

ΔAbs = differenza tra il valore massimo e minimo di assorbimento nell'intervallo lineare del decremento a 335 nm

Δt = intervallo di tempo della porzione lineare del decremento (minuti)

b = spessore della cuvetta (1 cm)

V_{tot} = volume totale di reazione (ml)

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

ϵ = coefficiente estinzione molare metilcaffèato $12,56 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e metilferulato $12,21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3.6 Bioliquefazione

Sono state eseguite alcune prove di degradazione enzimatica allo scopo di idrolizzare matrici agro-alimentari di scarto (bioliquefazione). In questo caso non è stato utilizzato un microrganismo che attaccasse il substrato ma direttamente gli enzimi da esso prodotti e recuperati nel corso delle precedenti prove in modo tale da verificarne l'efficacia.

Prima del passaggio di bioliquefazione è stato eseguito un trattamento termo-meccanico triturando il substrato e riducendone le dimensioni per poi sterilizzarlo in autoclave a 120° per 20 minuti favorendo il rilascio di componenti di interesse. Da precedenti studi^{56,57} è risultato come il trattamento termico ideale che massimizzi il rilascio di metaboliti sia da eseguire su di una matrice di scarto immersa in acqua nel rapporto di 1:7, substrato:acqua.

Si sono quindi posti 10 g di scarto in una beuta e si sono aggiunti 70 ml di acqua distillata, si è chiusa la beuta con carta stagnola in modo da evitare l'evaporazione e si è effettuato il trattamento meccanico.

Si è poi passati al trattamento enzimatico vero e proprio in cui le proporzioni fra enzima, substrato e liquido surnatante al substrato sono state determinate incrociando i valori di attività enzimatica trovati con quelli di enzimi commerciali.

E' stato valutato come i quantitativi necessari ad un corretto procedimento di bioliquefazione siano i seguenti:

- 1 g di substrato di scarto
- 5 ml di liquido surnatante al substrato (successivo al trattamento termico)
- 2 ml di percolato enzimatico (proveniente dalle estrazioni eseguite in precedenza)

La reazione è stata portata avanti per 48 ore e sono state fatte analisi per la ricerca di zuccheri riducenti e polifenoli a 24 e 45 ore dall'inizio dell'aggiunta di enzima.

3.6.1 Determinazione degli zuccheri riducenti

Si determinano gli zuccheri riducenti come descritto per il metodo di determinazione degli zuccheri riducenti nel paragrafo 3.5.3 mediante il metodo dell'ADNS.

3.6.2 Determinazione dei polifenoli totali⁵⁸

La determinazione dei polifenoli totali viene eseguita mediante il metodo di Folin-Ciocalteu⁵⁹.

Si preparano 5 soluzioni di catechina (Sigma-Aldrich), utilizzata come polifenolo di riferimento, in metanolo a concentrazioni comprese tra 20 e 300 mg/l. In matracci da 20 ml, ad 1 ml di ciascuna soluzione, sono aggiunti: 1 ml di metanolo, 5 ml d'acqua, 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10% w/v. Si porta a volume con acqua distillata e si legge l'assorbanza a 700 nm dopo 90 minuti d'incubazione a 30°C. La concentrazione di polifenoli in soluzione è calcolata tramite la seguente retta di taratura (figura 3.9.):

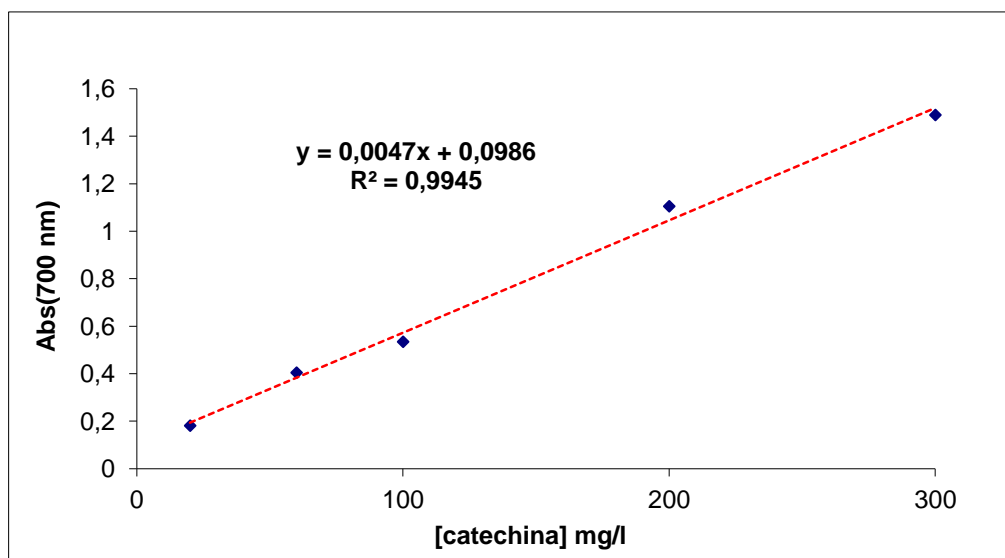


Figura 3.9: Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30°C.

$$[\text{Polifenoli}] \text{ (mg/l)} = \text{Abs}_{700 \text{ nm}} * 212.8 * l \text{ (cammino ottico)}$$

Per la determinazione dei polifenoli totali, al fine di eliminare sostanze organiche che possono interferire nella lettura, si effettua un passaggio in cartuccia C-18 end-capped, Phenomenex-Strata, 1.0g/ 6ml, secondo il metodo descritto di seguito: si lava la cartuccia con 2 ml di metanolo e si condiziona con 5 ml d'acido solforico 0.01 N. Si adsorbe 1 ml di campione, opportunamente diluito in acido solforico 0.1 N per ottenere un'assorbanza compresa nel range della retta di taratura, e si aggiungono 2 ml d'acido solforico 0.01 N. Si collega la cartuccia ad un matraccio da 20 ml e si eluisce con 2 ml di metanolo e 5 ml d'acqua distillata. Al contenuto del matraccio si aggiunge 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti,

4 ml di carbonato di sodio 10 % w/v portando poi a volume con acqua. Dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm, avendo cura di centrifugare il campione per sedimentare il precipitato di carbonato che si forma, contro un bianco preparato in un matraccio da 20 ml contenente tutti i reagenti e 2 ml di metanolo non contenente fenoli.

3.7 Strumenti di laboratorio

- Spettrofotometro 923, Double Beam UV/VIS - UVIKON;
- Termoshake – GERHARDT ;
- pH-metro micro pH 2001 - CRISON;
- Centrifuga Micro 20 - HETTICH;
- Stufa a ventilazione forzata – FALC;
- Autoclave – PBI INTERNATIONAL
- Cappa biologica a flusso laminare - GEMINI
- Pompa peristaltica, Minipuls 2 - GILSON

4 Risultati e discussioni

4.1 Fermentazione in stato solido

Il processo di fermentazione in stato solido richiede la messa a punto di un reattore statico o biocella in cui il substrato di crescita in forma solida viene via via biotrasformato da un microorganismo tipicamente filamentoso. Nei nostri esperimenti la biocella è costituita da una bottiglia pirex da 500 ml chiusa con un tappo in cotone per permettere l'ossigenazione del sistema interno (fig. 4.1). Come substrati di crescita per il fungo filamentoso della specie *Pleurotus Ostreatus*, sono state selezionate matrici di scarto ottenute da processi agroindustriali:

- graspi d'uva rossa (50 g peso umido; 9,1g peso secco)
- vinaccioli (50 g peso secco)
- paglia di grano (30 g peso secco)
- crusca di grano (50 g peso secco)



Figura 4.1: SSF a biocella sviluppati in laboratorio su pirex da 500 ml e tappo in cotone subito dopo l'inoculo con *P.ostreatus*. a) biocella con substrato graspi d'uva; b) biocella con substrato paglia di grano

La biocella è stata sterilizzata in autoclave (120°C per 20 minuti), e inocolata a temperatura ambiente con 7,5 g di *P.ostreatus* cresciuto preventivamente in piastra su estratto di malto agarizzato.

La reazione in biocella ha durata di fermentazione di 28 giorni, ad una temperatura di 25°C e con schermatura dalle fonti luminose. Le condizioni operative sono tali da impedire lo

sviluppo del corpo fruttifero che avviene generalmente dopo la crescita abbondante di micelio in condizioni di elevata umidità e di bassa temperatura (inferiore a 20°C) in presenza di luce solare. In ciascuna biocella il recupero dei prodotti della reazione viene effettuato aggiungendo una minima quantità di acqua al reattore che costituisce un percolato adatto ad essere raccolto. Il campionamento della biocella avviene ogni 7 giorni ed è preceduto ogni volta da un'operazione di estrusione meccanica tale da ottenere una riduzione delle dimensioni del substrato e contemporaneamente movimentare le ife del fungo allo scopo di aumentare il processo fermentativo.

4.1.1 Pretrattamenti termo-meccanici delle matrici vegetali

L'azione idrolitica degli enzimi richiede un substrato caratterizzato da una buona biodisponibilità all'attacco biologico. La struttura della parete cellulare vegetale risulta una rete polisaccaridica piuttosto complessa e dipendente dalla loro tipologia (monocotiledone o dicotiledone)⁶⁰. La capacità degli enzimi idrolitici di destrutturarla dipende dalla loro capacità di accedere alla struttura primaria. Per questo motivo i pre-trattamenti meccanici e termici sono ben noti per favorire l'apertura delle fibre della matrice piuttosto che a rigonfiarle favorendo l'assorbimento dell'acqua .

I pre-trattamenti meccanici vengono effettuati generalmente con mulini a coltello o omogeneizzatori in grado di ridurre la pezzatura delle fibre e ad aumentare l'area superficiale.

I pre-trattamenti termici inducono al coordinamento dell'acqua di reazione sulla struttura polisaccaridica della parete cellulare vegetale.

In questo caso il pre-trattamento meccanico è stato eseguito con un omogeneizzatore a taglio (comune frullatore da cucina) mentre il pre-trattamento termico consisteva nell'autoclavare il substrato vegetale prima dell'inoculo del fungo *P.Ostreatus* a 120° per 20 minuti che conferisce il doppio vantaggio sia di rigonfiare che di sterilizzare la matrice . La sterilizzazione è indispensabile nelle prove idrolitiche per via enzimatica anche al fine di ridurre gli effetti di una contaminazione esterna.

Tabella 4.1: Dimensioni e descrizione della matrice interna alla biocella a seguito dei trattamenti effettuati

MATRICE	MOMENTO DELLA MISURA	DIMENSIONE	DESCRIZIONE
Graspi	<i>Prima del trattamento</i>	20-100 mm di lunghezza per 2-3 mm di diametro	Normali graspi
	<i>Trattamento termo-meccanico</i>	5-20 mm di lunghezza per 0,1-0,5 mm di diametro	Sottili fili fibrosi
Vinaccioli	<i>Prima del trattamento</i>	5x3x2 mm	Piccoli semi
	<i>Trattamento termo-meccanico</i>	2x1 mm	Solido polveroso
Paglia	<i>Prima del trattamento</i>	100-300 mm di lunghezza per 3 mm di diametro	Steli di paglia
	<i>Trattamento termo-meccanico</i>	20-30 mm di lunghezza per 2 mm di larghezza per 0,5 mm di spessore	Sottili fili fibrosi
Crusca	<i>Prima del trattamento</i>	0,1-0,5 mm	Solido polveroso
	<i>Trattamento termo-meccanico</i>	0,1-0,5 mm	Solido polveroso umido

E' stata effettuata una misura qualitativa delle matrici vegetali prima e dopo i trattamenti meccanici e termici da cui si può notare come in tutti i casi esaminati vi sia una riduzione delle dimensioni più significativa nei graspi e nella paglia in quanto matrici fibrose rispetto ai vinaccioli e alla crusca (Tabella 4.1). Nei vinaccioli, tuttavia, la riduzione delle dimensioni deve essere valutata sulla riduzione complessiva del volume del particolato che si può stimare in circa 10 volte al pari della paglia e dei graspi. La crusca, invece, si presenta all'origine già in forma di polvere fine per cui l'azione meccanica dell'omogenizzatore favorisce l'assorbimento di acqua durante lo stadio termico.

4.1.2 Post-trattamento enzimatico

La staticità del reattore induce diversi fenomeni limitanti il processo fermentativo come la disponibilità di substrato e lo scambio di ossigeno sulla superficie. L'ossigeno è chiaramente uno dei maggiori fattori limitanti in quanto la fermentazione con funghi filamentosi richiede un ambiente completamente aerobico. Masutti et al. (2012) hanno osservato che l'azione meccanica di rivoltamento del substrato in un fermentatore in stato solido con *Pleurotus ostreatus* favorisce la produzione dell'attività enzimatica da parte del fungo. Lo stesso fenomeno è ben conosciuto nella produzione industriale di compost in cui da protocollo è previsto il rivoltamento periodico dei cumuli al fine di favorire l'ossigenazione della matrice. Per questo motivo è stata progettata una fase di estrusione periodica della matrice durante il periodo di fermentazione in stato solido. L'estrusione del substrato prima dell'operazione di campionamento avrebbe quindi lo scopo di aumentare la biodisponibilità del substrato e l'arieggiamento della biocella stessa. L'azione meccanica sul substrato migliora evidentemente anche la capacità dell'acqua, come solvente, di penetrare nella matrice al fine di recuperare i sottoprodotti della fermentazione stessa.

Il substrato estruso viene quindi ricaricato dentro la biocella a cui si aggiunge un volume noto di acqua distillata sterile sufficiente al recupero dei prodotti di fermentazione sottoforma di percolato. Il percolato viene poi recuperato tramite una pipetta sterile, centrifugato per eliminare le parti solide in sospensione e analizzato per determinarne i parametri biochimici di interesse.

Si è potuto notare un differente effetto del comportamento delle biocelle all'azione di estrusione, in maniera particolare si è potuto assistere a fenomeni di contaminazione esterna prevalentemente sui graspi che già dopo la seconda settimana assumevano una colorazione delle colonie fungine diversa dal bianco cotonoso tipico del *Pleurotus*. Nel corso della terza settimana tendono a manifestarsi contaminazioni anche all'interno delle altre biocelle individuando la presenza di nuove muffe.

4.1.3 Biotrasformazione delle matrici durante la fermentazione in stato solido

L'azione idrolitica del fungo è ben visibile da un punto di vista qualitativo, infatti, tutte le matrici dopo il processo di fermentazione in stato solido risultano tipicamente scure come avverrebbe a valle di un tipico processo di compostaggio (Figure da 4.2 a 4.5). L'azione idrolitica del fungo è stata valutata attraverso la determinazione della quantità di frazione solubile presente nella matrice vegetale originale prima e dopo il processo fermentativo. L'ammontare della frazione solubile nella matrice è inversamente proporzionale al peso molecolare medio delle fibre che in seguito all'azione idrolitica tende a ridursi. .



Figura 4.2: Evoluzione dei graspi d'uva all'inizio, dopo il trattamento termo-meccanico e successivamente a quello di fermentazione in stato solido

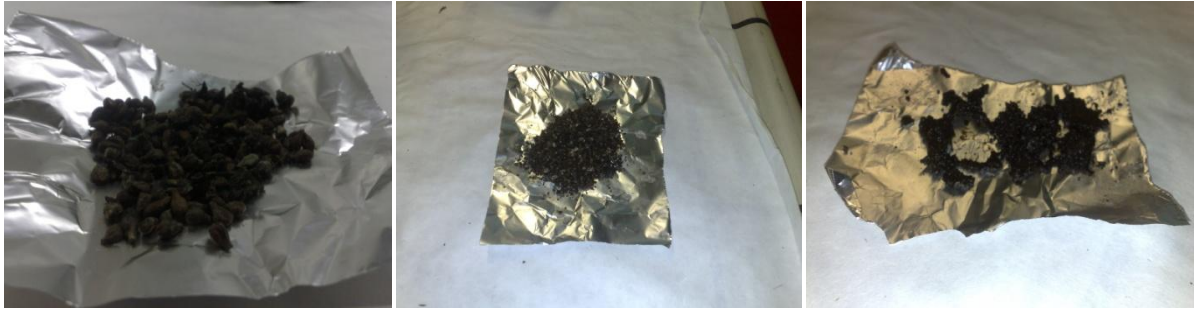


Figura 4.3: Evoluzione dei vinaccioli all'inizio, dopo il trattamento termo-meccanico e successivamente a quello enzimatico



Figura 4.4: Evoluzione della paglia di grano all'inizio, dopo il trattamento termo-meccanico e successivamente a quello enzimatico



Figura 4.5: Evoluzione della crusca di grano all'inizio, dopo il trattamento termo-meccanico e successivamente a quello enzimatico

La quantità di frazione solubile è stata determinata sospendendo la matrice vegetale secca (0,1 g) in acqua distillata (1 mL) da cui il solido sospeso viene separato per centrifugazione e pesato a secco. La differenza di peso secco prima e dopo la sospensione fornisce la quantità matrice che si è solubilizzata nell'acqua.

Tabella 4.2: Prova di solubilità sui graspi d'uva

GRASPI	Matrice non solubilizzata			Matrice solubilizzata			Totale
	Umido	Secco	% solido	Umido	Secco	% solido	% di solido solubilizzata
Peso iniziale	0,8452	0,4251	50,30	0,1005	0,0472	46,97	6,62
Peso finale	1,002	0,2028	20,24	0,0999	0,0182	18,22	9,99

Tabella 4.3: Prova di solubilità sui vinaccioli

VINACCIOLI	Matrice non solubilizzata			Matrice solubilizzata			Totale
	Umido	Secco	% solido	Umido	Secco	% solido	% di solido solubilizzata
Peso iniziale	0,9939	0,8395	84,47	0,1013	0,0898	88,65	-4,95
Peso finale	1,0062	0,5565	55,31	0,1026	0,0589	57,41	-3,80

Tabella 4.4: Prova di solubilità sulla paglia di grano

PAGLIA	Matrice non solubilizzata			Matrice solubilizzata			Totale
	Umido	Secco	% solido	Umido	Secco	% solido	% di solido solubilizzata
Peso iniziale	1,0003	0,9634	96,31	0,0578	0,0540	93,43	3,00
Peso finale	1,0087	0,2811	27,87	0,0659	0,0166	25,19	9,61

Tabella 4.5: Prova di solubilità sulla paglia di grano

CRUSCA	Matrice non solubilizzata			Matrice solubilizzata			Totale
	Umido	Secco	% solido	Umido	Secco	% solido	% di solido solubilizzata
Peso iniziale	1,0001	0,9519	95,18	0,0978	0,0819	83,74	12,02
Peso finale	1,0073	0,2441	24,23	0,1140	0,0228	20,00	17,47

Si può notare come, a parte il caso dei vinaccioli, tutti i substrati aumentino la propria percentuale di solido solubilizzato rispetto al valore iniziale dimostrando perciò l'efficacia del trattamento nel favorire la degradazione degli scarti agroalimentari in esame con la possibilità di una riduzione dei costi di smaltimento e di una diminuzione per ciò che riguarda l'impatto ambientale dei rifiuti stessi.

Il caso dei vinaccioli si discosta dagli altri casi in quanto rispetto agli altri substrati è maggiore la presenza di lignina di più difficile idrolizzazione e dunque la percentuale di solido solubilizzato risulta nulla o addirittura negativa (errore statistico della prova).

4.1.4 Analisi delle attività enzimatiche su percolato indotto in biocella

In questo lavoro di tesi l'interesse è stato centrato sulla produzione di alcune classi di enzimi esocellulari lignocellulolitici secreti dal fungo *P.ostreatus*. L'analisi di questi enzimi,

direttamente sul percolato raccolto dalla biocella, è facilitata dalla loro natura esocellulare che quindi non richiede una tecnica particolare di estrazione dal comparto intracellulare. Per la determinazione delle attività enzimatiche, sono stati messi a punto saggi colorimetrici di rapida e semplice esecuzione, al fine di evitare tecniche più laboriose che prevedano una separazione delle proteine, come ad esempio l'elettroforesi su gel di poliacrilammide.

I percolati presentavano generalmente una forte colorazione di partenza, quantificabile attraverso un'analisi UV-visibile. La presenza di questa colorazione potrebbe indurre a falsi positivi nella determinazione delle diverse attività enzimatiche tramite metodi colorimetrici. Per questo motivo i valori di assorbanza, in corrispondenza delle lunghezze d'onda di lettura dei saggi enzimatici, sono stati sottratti dall'attività enzimatica allo scopo di eliminare le interferenze del substrato di partenza.

Tutte le prove sono state svolte in doppio e di ciascun campione in doppio sono state effettuate due letture. Il valore per il calcolo dell'attività finale è stato ottenuto come la media sui quattro valori. Per determinare l'errore statistico della misurazione, è stato calcolato il valore della deviazione standard sulla media ottenuta.

I calcoli delle attività enzimatiche determinate secondo le formule dei saggi colorimetrici descritti nei materiali e metodi, sono riportati nella tabella 4.6 per ogni ml di percolato raccolto.

Tabella 4.6: Attività enzimatica per ml di percolato raccolto ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$ percolato) alla frequenza di prelievo settimanale dei 4 substrati analizzati

		0	7	14	21	28
graspi d'uva	<i>-cellulasica</i>	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
	<i>-zuccheri riducenti</i>	1,47	3,28	3,11	1,49	0,00
	<i>-laccasica</i>	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
	<i>-xilanasica</i>	1,39	20,27	33,09	0,00	0,00
	<i>-pectinasica</i>	1,44	23,63	26,46	0,00	0,00
	<i>-caffeoilsterasica</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>-feruloilsterasica</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
vinaccioli	<i>-cellulasica</i>	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
	<i>-zuccheri riducenti</i>	1,28	4,03	4,86	2,91	2,97
	<i>-laccasica</i>	0,00	16,14	22,74	24,52	23,23
	<i>-xilanasica</i>	1,56	2,76	2,81	2,29	1,81
	<i>-pectinasica</i>	1,67	3,14	3,31	2,64	2,54
	<i>-caffeoilsterasica</i>	0,00	189,21	1352,61	1312,50	439,32
	<i>-feruloilsterasica</i>	0,00	410,97	995,61	754,11	439,33
Paglia di grano	<i>-cellulasica</i>	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
	<i>-zuccheri riducenti</i>	1,10	4,30	5,22	4,59	2,86
	<i>-laccasica</i>	0,00	0,07	0,02	0,58	1,59
	<i>-xilanasica</i>	2,17	3,47	2,99	2,66	3,13
	<i>-pectinasica</i>	2,09	4,00	3,47	3,46	4,38
	<i>-caffeoilsterasica</i>	0,00	12,60	49,35	78,75	85,05
	<i>-feruloilsterasica</i>	0,00	11,34	98,70	495,61	44,73
crusca di grano	<i>-cellulasica</i>	0,00	0,02	0,11	0,04	0,01
	<i>-zuccheri riducenti</i>	2,87	34,49	145,10	25,15	4,98
	<i>-laccasica</i>	0,05	0,25	0,19	0,17	0,07
	<i>-xilanasica</i>	8,42	25,85	27,37	36,50	16,32
	<i>-pectinasica</i>	6,98	21,26	28,06	28,50	13,65
	<i>-caffeoilsterasica</i>	0,00	10,71	26,25	75,60	34,65
	<i>-feruloilsterasica</i>	0,00	41,16	61,43	75,98	35,12

Il valore iniziale, definito “tempo zero”, si riferisce all’attività endogena di partenza di ciascun substrato che risulta praticamente assente per le attività arilesterasiche (caffeoilsterasica e feruloilsterasica) e laccasica (tranne nella crusca di grano). Il valore di attività che si riscontra per tutti i substrati di partenza in corrispondenza delle attività xilanasica, pectinasica e cellulasica potrebbe essere legato ad una certa quantità di zuccheri riducenti liberi presenti nella struttura della matrice vegetale (sottoforma di glucosio, xilosio, pectina e altri composti di natura polisaccaridica) non risultanti come prodotto di processi enzimatici.

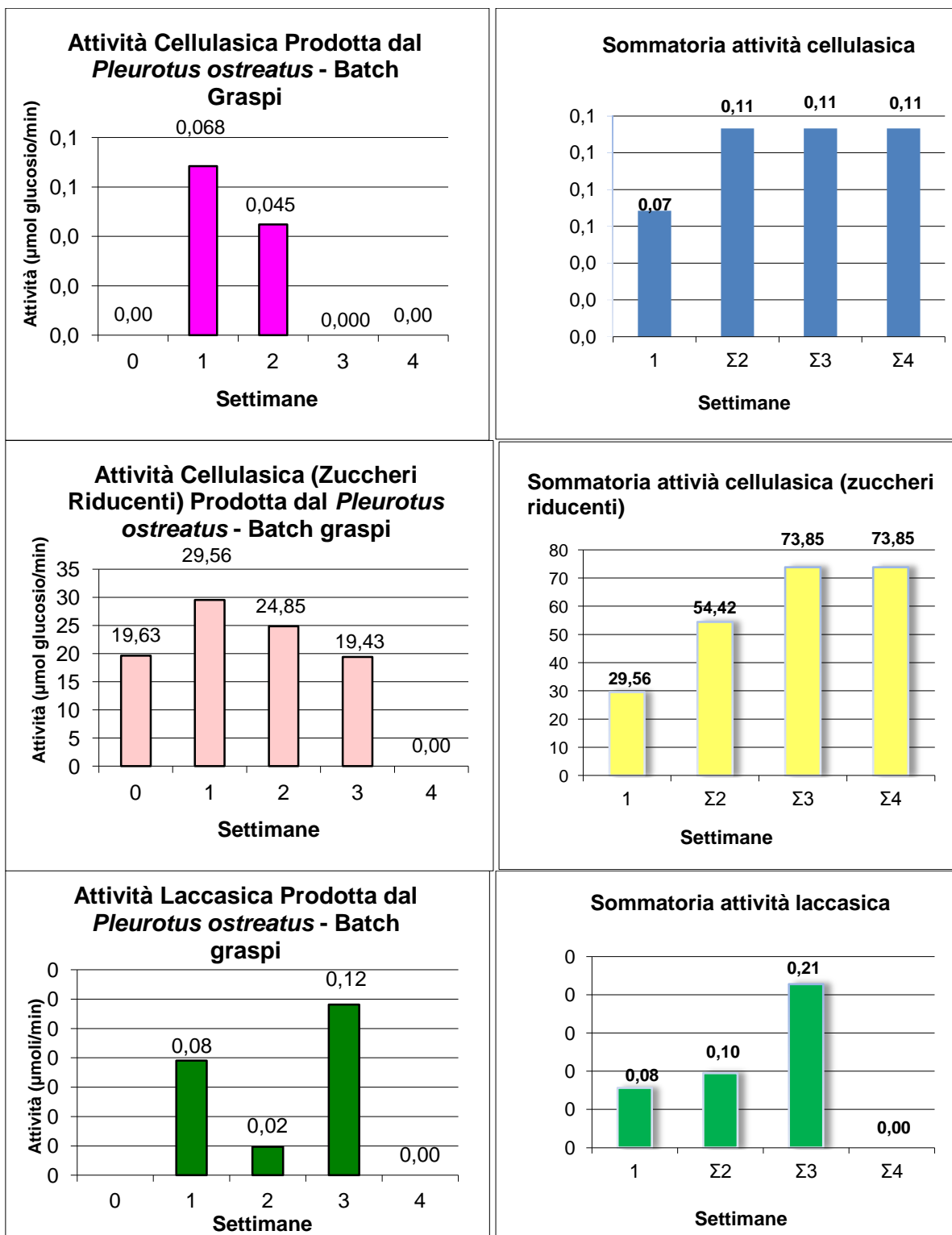
L’attività cellulasica è stata determinata sia con il metodo della carta funzionalizzata (cellulasica) che con il saggio della ADNS attraverso il quale vengono quantificati gli zuccheri riducenti rilasciati dalla reazione idrolitica sulla cellulosa (zuccheri riducenti dell’attività cellulasica). Tutti i substrati presentano valori elevati in corrispondenza dell’attività cellulasica determinata con la quantificazione degli zuccheri riducenti con il

metodo dell'ADNS rispetto al metodo della carta funzionalizzata in cui i valori rimangono pressoché trascurabili in tutte le prove. Questa maggiore attività è ragionevolmente legata al tipo di cellulasi prodotta, che sembra agire come eso-cellulasi piuttosto che come endo-cellulasi.

Durante i prelievi, la quantità di percolato presente è stata raccolta completamente al fine di non lasciare acqua libera nella biocella. I volumi raccolti di volta in volta presentavano una certa variabilità dovuta alla quantità di acqua aggiunta per il mescolamento del contenuto della biocella che doveva garantire un minimo di acqua libera da poter essere separata dal solido e recuperata con una sonda. La quantità di acqua aggiunta dipendeva evidentemente dalle caratteristiche della matrice vegetale e dalla modalità con cui il micelio si era adattato al substrato di crescita. Le attività enzimatiche dei substrati calcolate per ml (tab. 4.6), sono state moltiplicate per il volume totale di percolato raccolto in modo da determinare l'attività totale ottenuta dal processo di fermentazione alle diverse frequenze di prelievo (vedere successivi paragrafi).

4.1.5 Valori assoluti delle attività enzimatiche recuperate

- GRASPI D'UVA



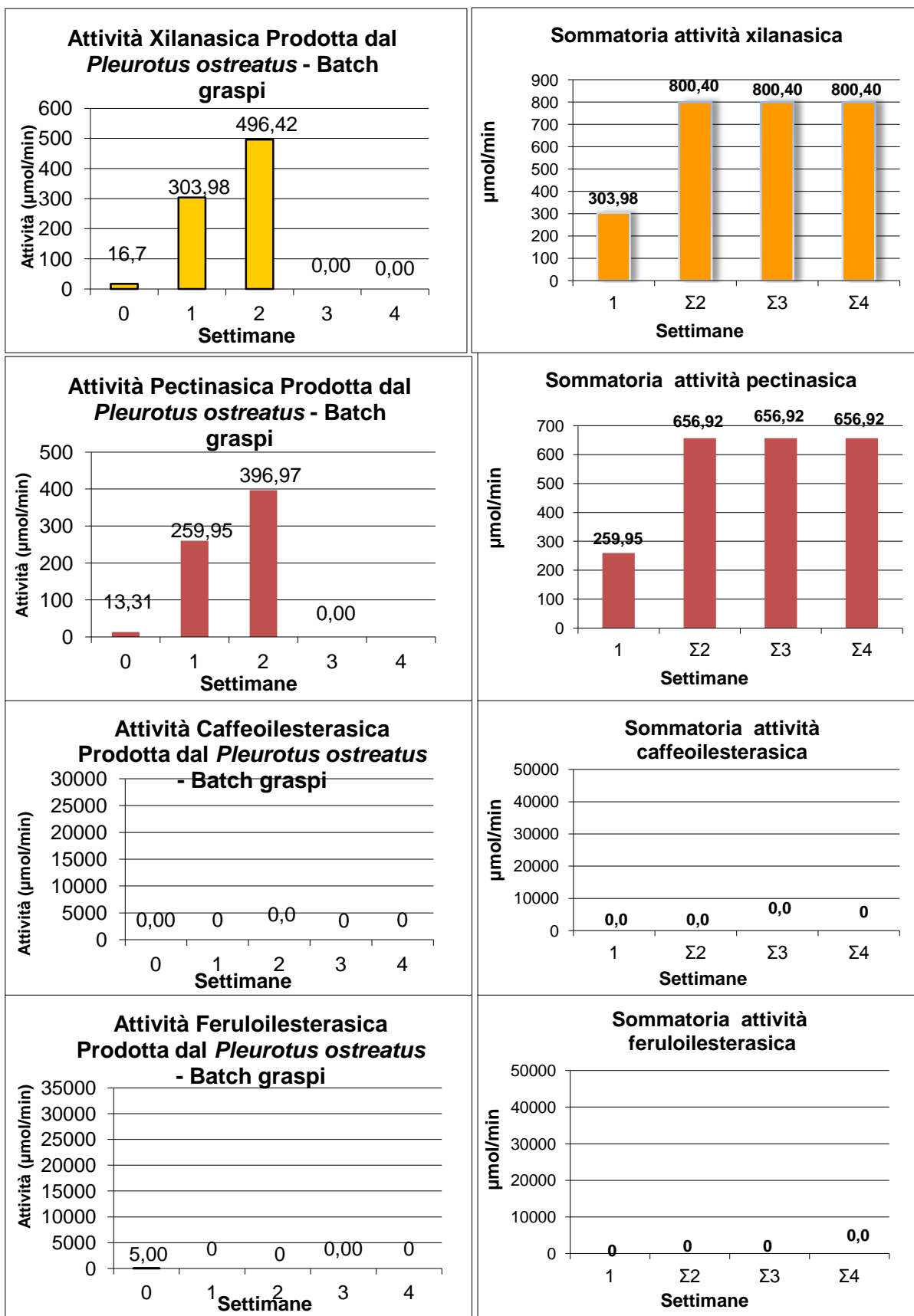


Figura 4.6: Valori di attività enzimatica dei graspi d'uva

L'estratto enzimatico dei graspi mostra buone attività di degradazione di zuccheri complessi (cellulosa, arabino-xilani e pectina) liberando eccellenti quantità di zuccheri semplici (rispettivamente glucosio, xilosio e acido galatturonico).

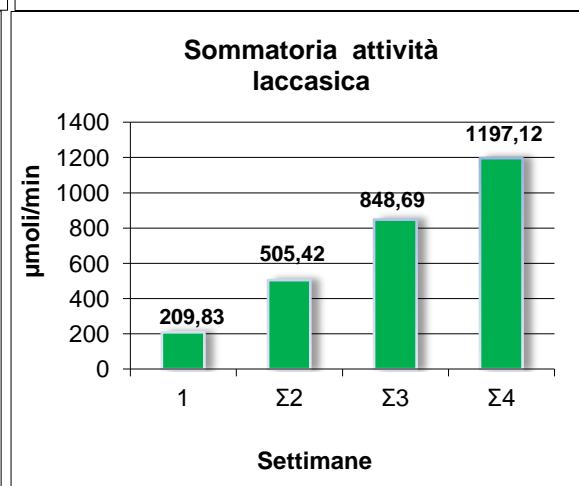
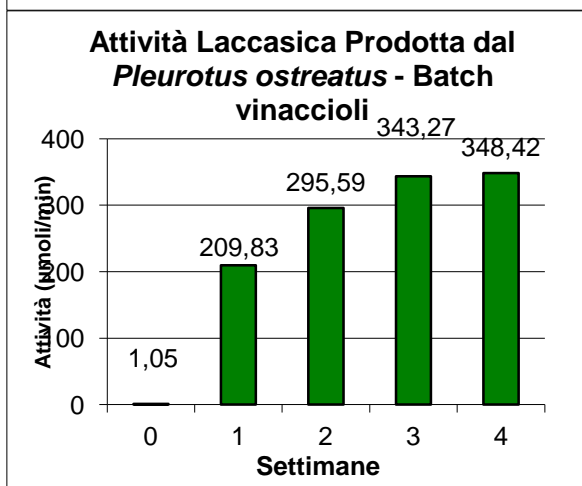
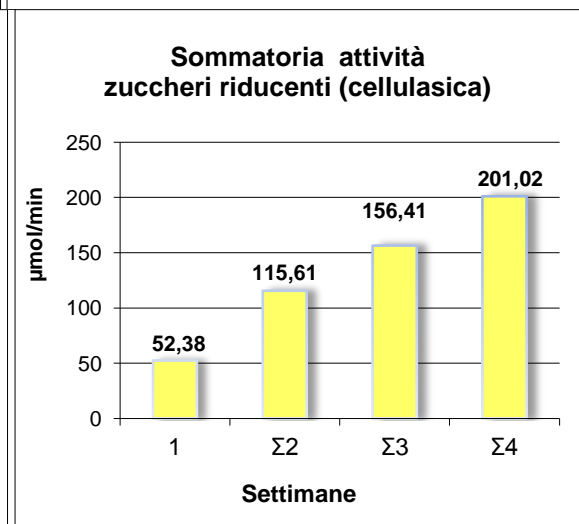
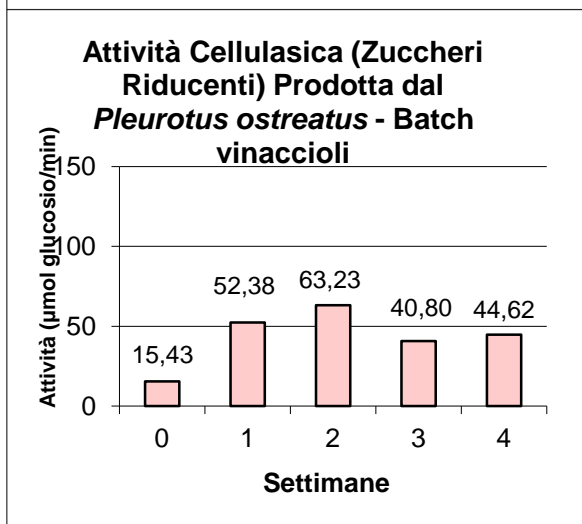
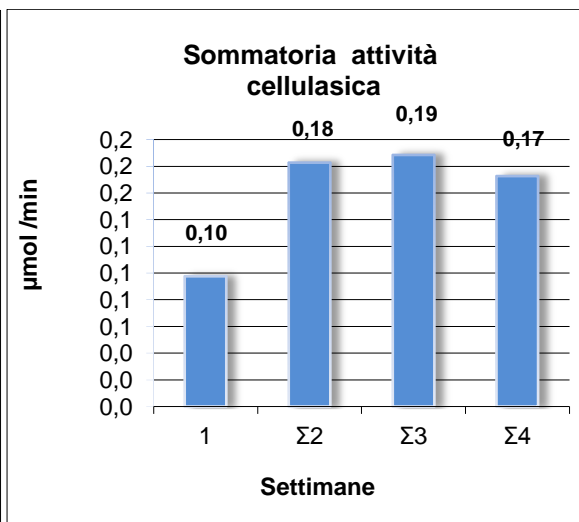
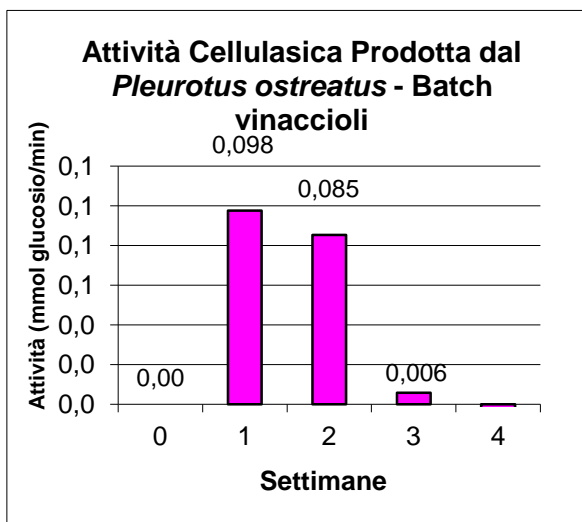
Non si può dire lo stesso per ciò che riguarda la degradazione della parte lignocellulosica dei graspi. L'attività laccasica è infatti molto bassa e non in grado di liberare le componenti intrappolate nella matrice vegetale. Da questo deriva anche l'attività cinnamoilesterasica pressoché nulla.

Questo risultato si discosta parecchio dai risultati ottenuti negli esperimenti precedenti nei quali i graspi venivano movimentati ma non estrusi.

È probabile che la mancata produzione di enzimi, che invece si era riscontrata nelle prove precedenti, possa essere dovuta a una contaminazione latente che si è espressa chiaramente solo dalla terza settimana da parte di una muffa infestante probabilmente identificabile come *Aspergillus*. Non è comunque da escludere il fatto che lo stress al quale è stata sottoposta la biomassa durante il processo di estrusione abbia impedito al fungo *Pleurotus* di produrre quantità rilevanti di enzima laccasi non permettendo una degradazione completa della matrice ligno-cellulosica.

Dalla terza settimana in poi tutte le attività prima importanti si riducono drasticamente per via di una contaminazione della biocella.

• VINACCIOLI



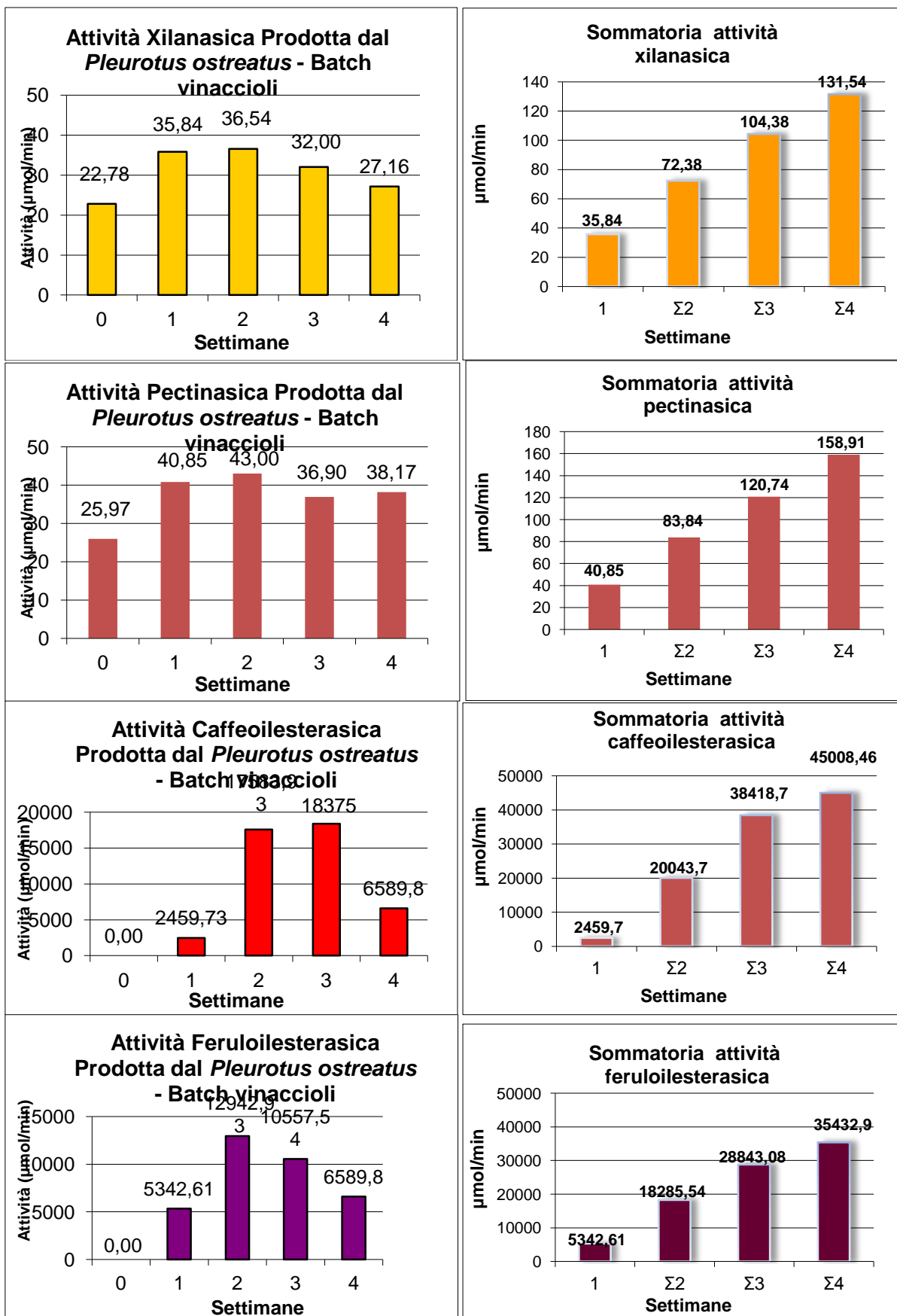


Figura 4.7: Valori di attività enzimatica dei vinaccioli

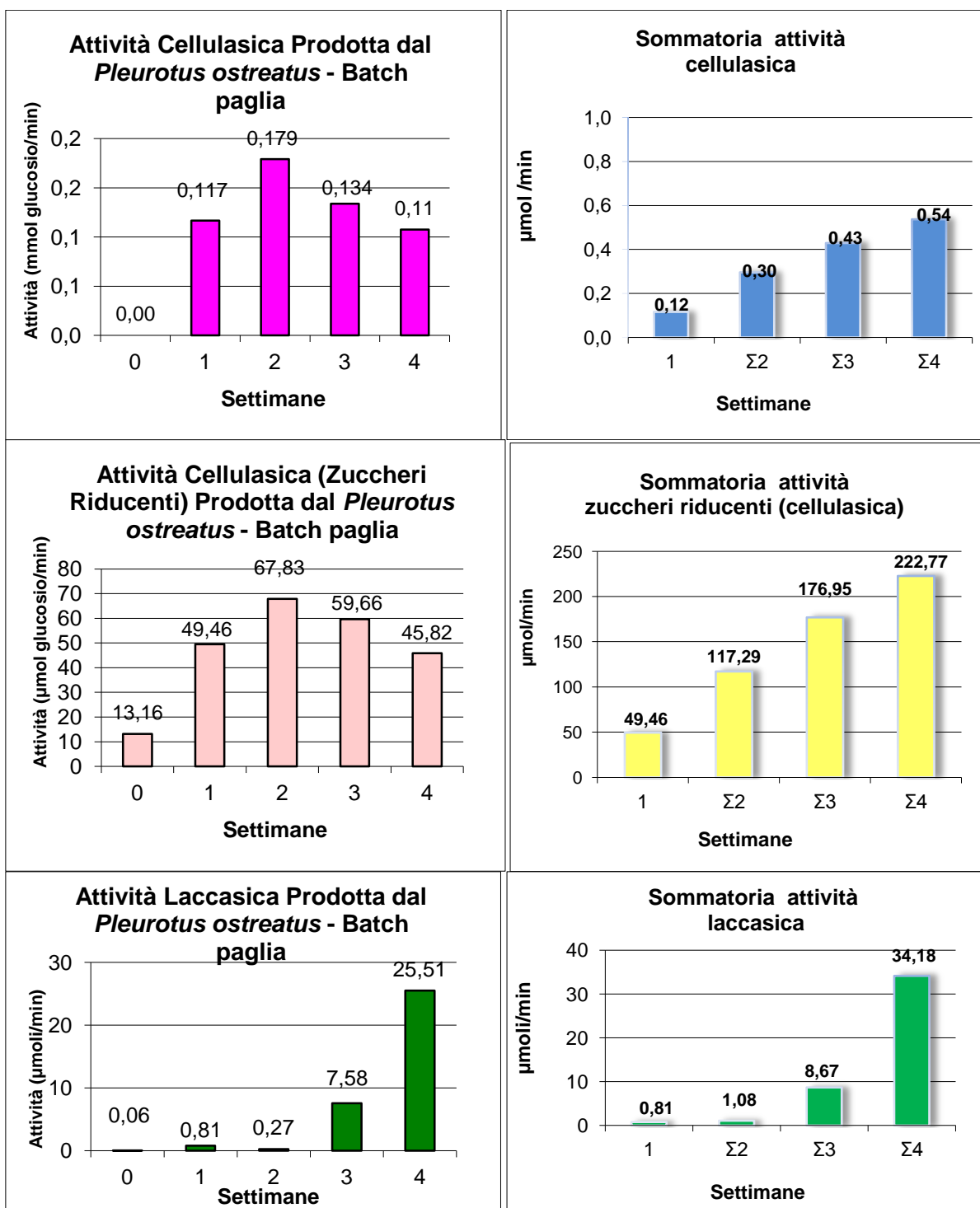
A differenza del caso precedente per ciò che riguarda i vinaccioli ci troviamo di fronte ad attività di degradazione di zuccheri complessi relativamente basse mentre abbiamo delle attività laccasica e cinnamoilesterasica particolarmente sviluppate.

Questo può essere spiegato considerando la struttura dei vinaccioli ricca di polifenoli e lignina ma relativamente più poveri di zuccheri complessi da essere degradati.

Vi è quindi un maggiore sviluppo degli enzimi di laccasi e cinnamoilesterasi interessanti per un eventuale recupero di sostanze di interesse da matrici di scarto.

Il fenomeno di induzione sulla produzione di enzimi da parte delle biomasse fungine è ben conosciuta e messa recentemente in evidenza per questa tipologia di fermentazioni in stato solido da Masutti et al. (2012).

• PAGLIA DI GRANO



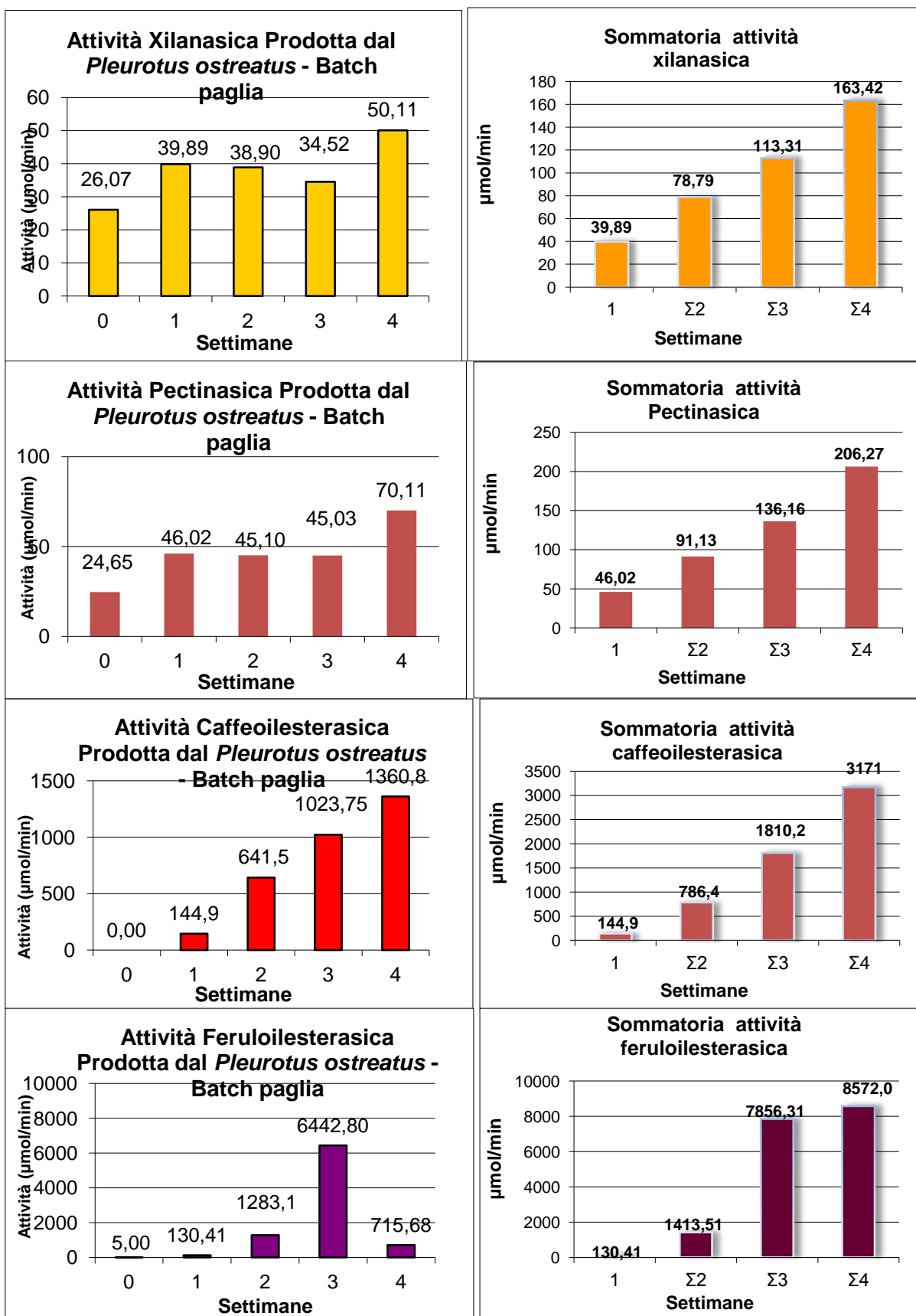
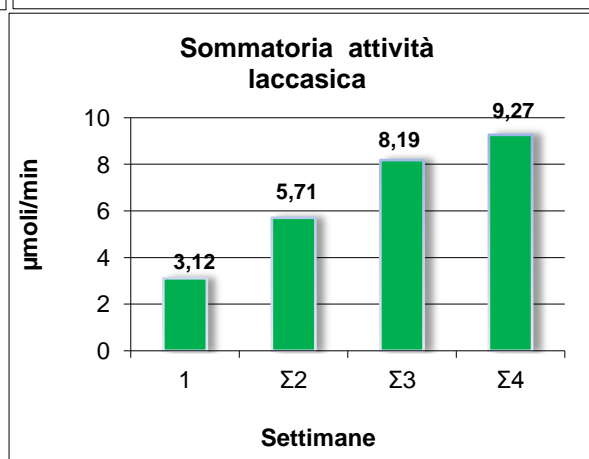
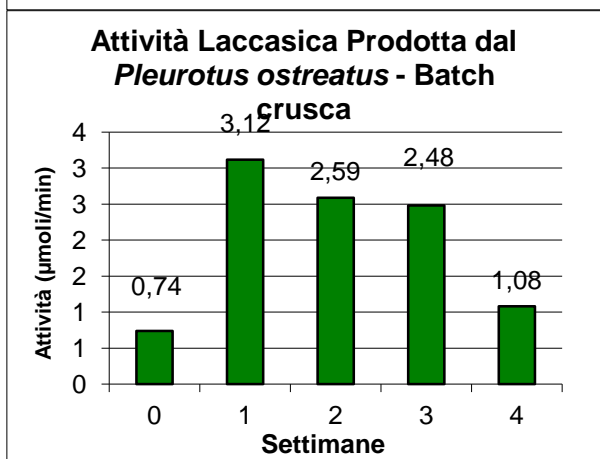
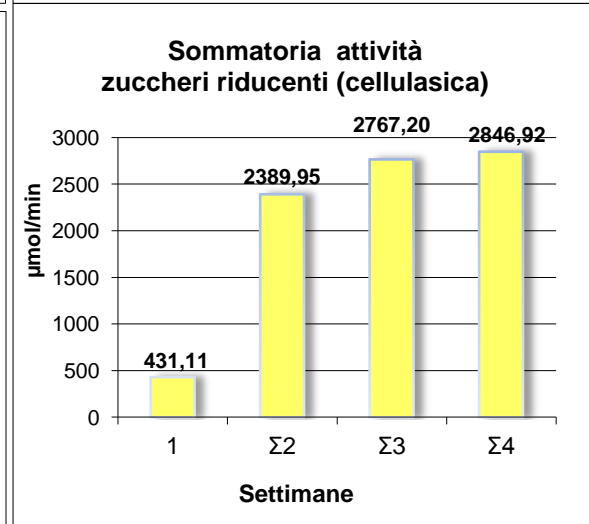
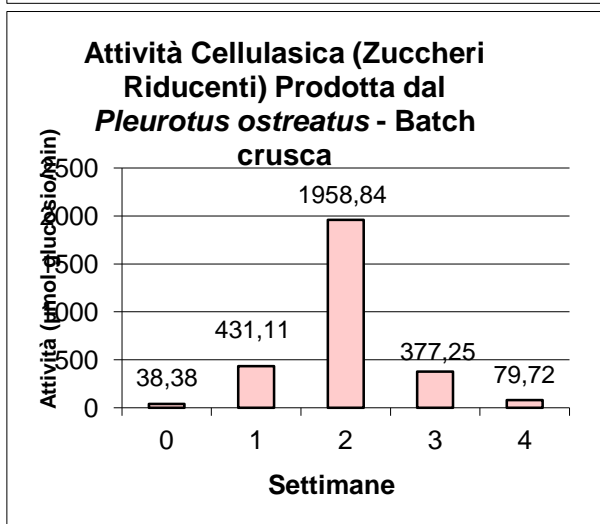
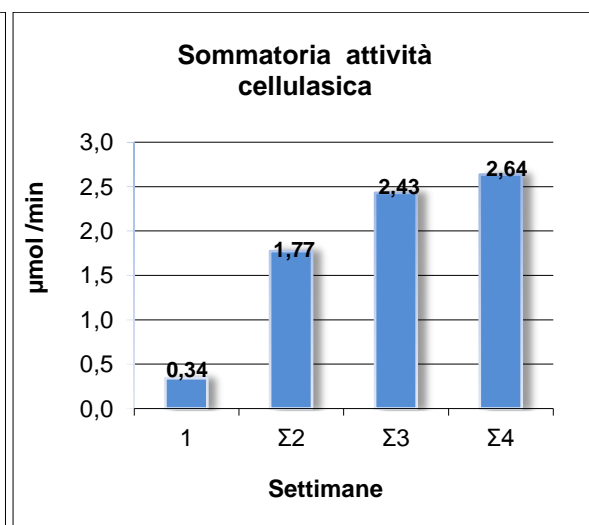
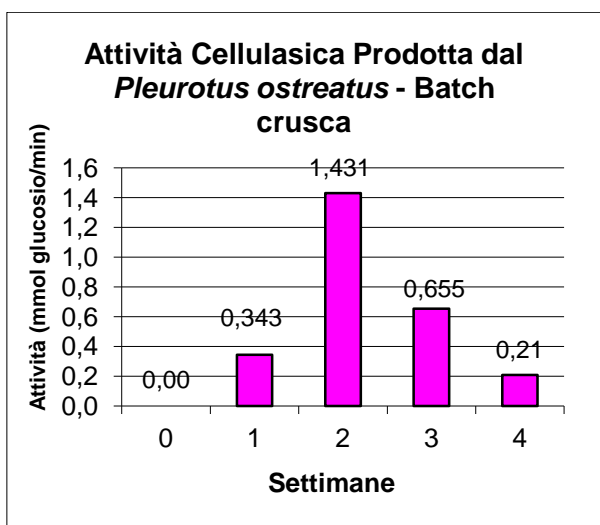


Figura 4.8: Valori di attività enzimatica della paglia

L'estratto enzimatico della paglia possiede una buona capacità di degradazione degli zuccheri complessi nell'arco delle 4 settimane dell'esperimento mentre mostra una capacità di attacco alla matrice ligno-cellulosica solo a partire dalle settimane 3 e 4, quando, infatti, comincia a svilupparsi un'attività laccasica in grado di degradare la lignina e rendere disponibili alla trasformazione i metil-esteri per una valida attività cinnamoilesterasica (che infatti aumenta in concomitanza con la laccasica).

• CRUSCA DI GRANO



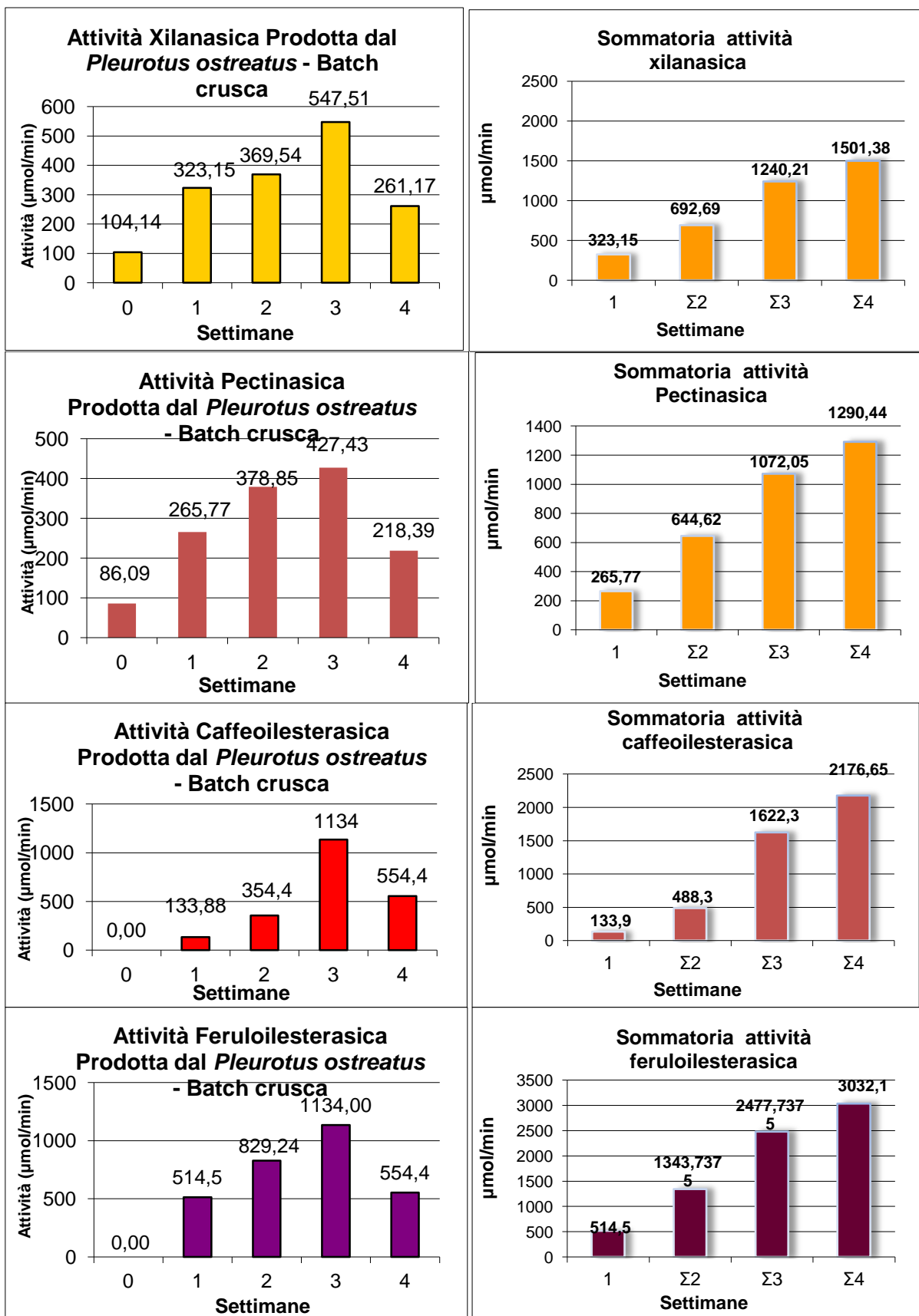


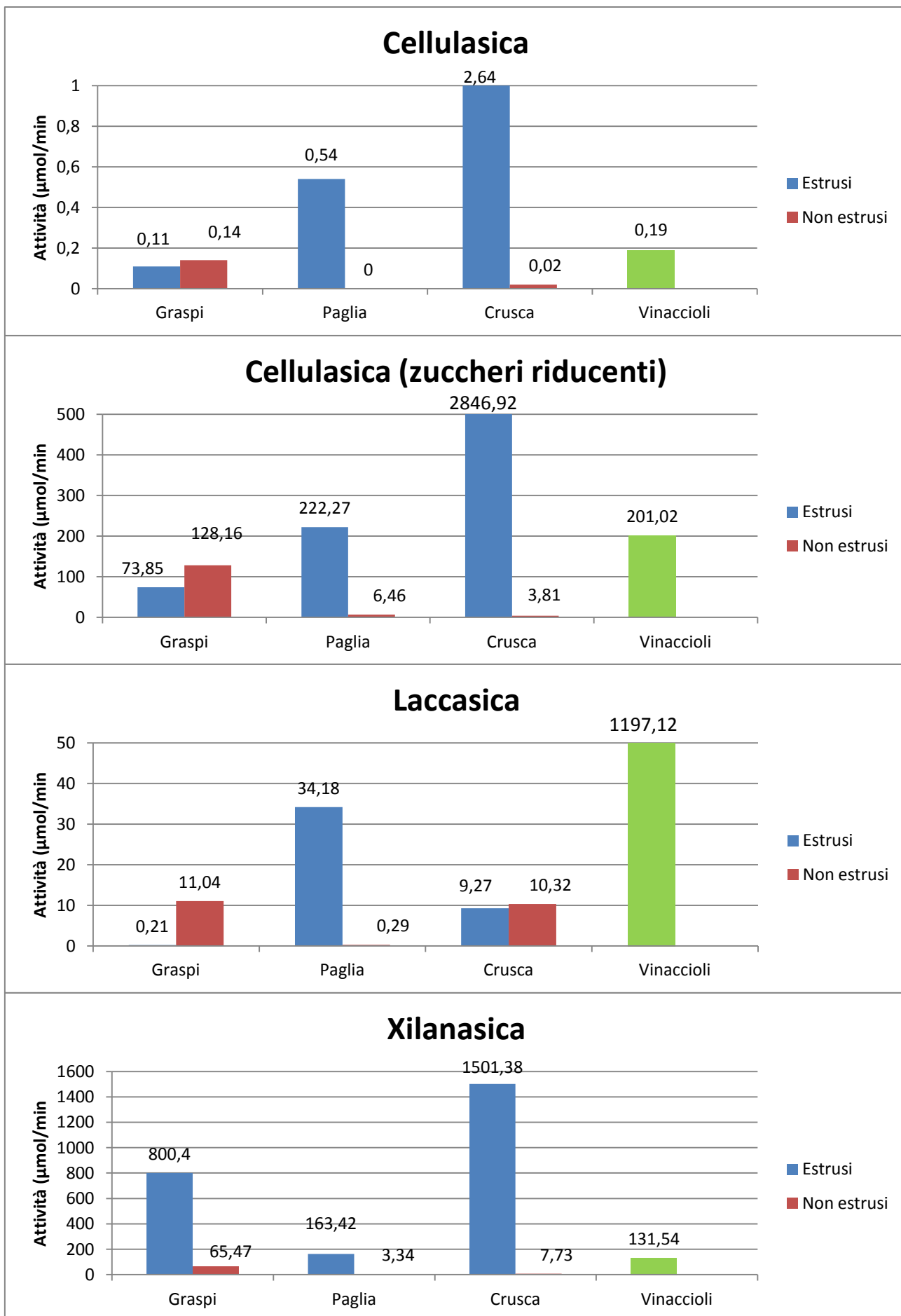
Figura 4.9: Valori di attività enzimatica della crusca

Gli enzimi prodotti nella biocella contenente crusca possiedono tutti una buona attività. In particolare la degradazione di zuccheri complessi è particolarmente efficiente. Ciò è molto probabilmente da attribuire alla struttura della crusca ricca di nutrienti (circa 30%) di facile estrazione e di una parte di fibre (lignine, cellulosa e emicellulosa nella quale abbondano gli arabinoxilani) che raggiunge il 55%. La struttura della parete cellulare di una monocotiledone come il grano è naturalmente ricca di acidi cinnamici che costituiscono i fenoli acidi strutturali che legano le catene ariboxiliche⁶¹. L'azione delle xilanasi rende disponibile l'attacco delle arilesterasi ai legami arilesterasici tra acidi ferulici singoli o dimerizzati alle fibre polisaccaridiche. L'azione delle arilesterasi in strutture di questo tipo non richiede una significativa attività laccasica per demolire la frazione ligninica.

4.1.6 Confronto tra fermentazioni in stato solido statiche o dinamiche tramite stadio di estrusione

La fermentazione in stato solido che viene sottoposto a una fase di estrusione periodica si può definire come dinamica rispetto a quella statica tradizionale. La fermentazione dinamica esplorata in questo lavoro di tesi mostra fenomeni di produzione enzimatica indotti dalla tipologia di substrato utilizzato per la crescita della biomassa fungina. Si può notare come in tutti i casi osservati, vi sia una buona attività iniziale di degradazione di zuccheri complessi che poi tende a diminuire durante la fermentazione in quanto gli zuccheri liberati dagli enzimi vengono utilizzati dalle cellule fungine per il proprio metabolismo. A fronte di questa diminuzione di attività vi è però un aumento della presenza di enzimi laccasi e successivamente cinnamoilesterasi prodotti dalla cellula per permetterle la degradazione delle matrici ligno-cellulosiche presenti ed ottenere ulteriori componenti utili al suo sviluppo.

Le migliori attività carboidrasiche si ottengono con le matrici più ricche di fibre polisaccaridiche come la paglia e la crusca mentre le attività fenolosidasiche (laccasi) vengono espresse con le matrici ricche di lignina come i vinaccioli e in parte la paglia (Figura 4.10). Le attività arilesterasiche sono invece indotte da matrici ricche di acidi fenolici come il caso della paglia o dei vinaccioli. I graspi hanno presentato una contaminazione latente che non permette una significativa standardizzazione.



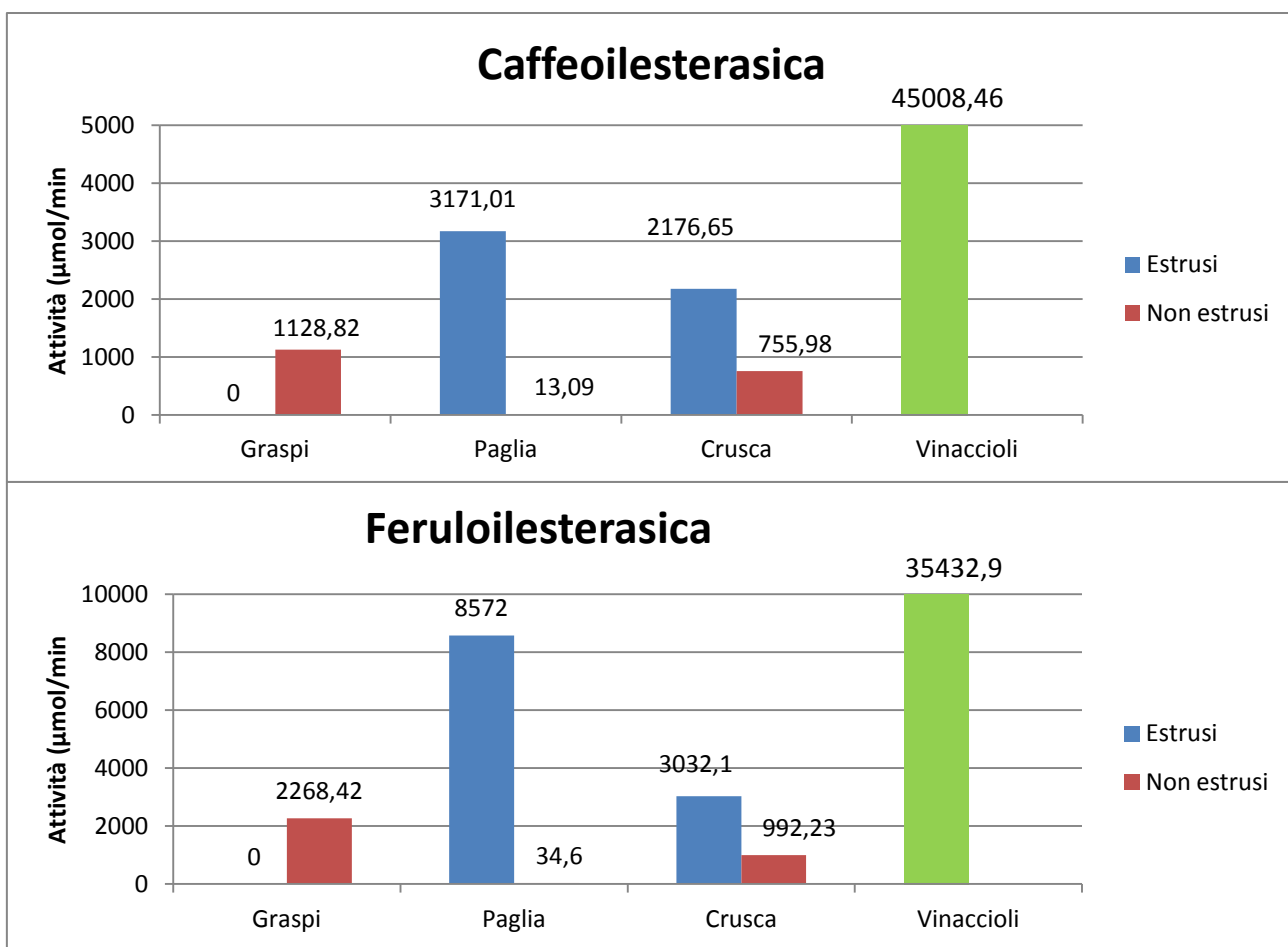


Figura 4.10: Confronto dei valori delle varie attività enzimatiche con e senza il procedimento di estrusione

L'effetto dell'estrusione è ben visibile mettendo a confronto i dati delle fermentazioni in stato solido dinamiche con quelle statiche riportate da Masutti et al. (2012). Si può notare un aumento generalizzato di tutte le attività, eccetto nel caso dei graspi nei quali si è però verificata una contaminazione da muffe esterne che hanno reso invalidi i dati.

E' evidente in particolare come vi siano enormi incrementi nelle attività cellulasica degli enzimi estratti dalla crusca e in quella laccasica, caffeiolesterasica e ferulolesterasica degli enzimi estratti dalla paglia.

In entrambi i casi si può osservare come i valori aumentino di una quantità compresa fra le 100 e le 1000 volte.

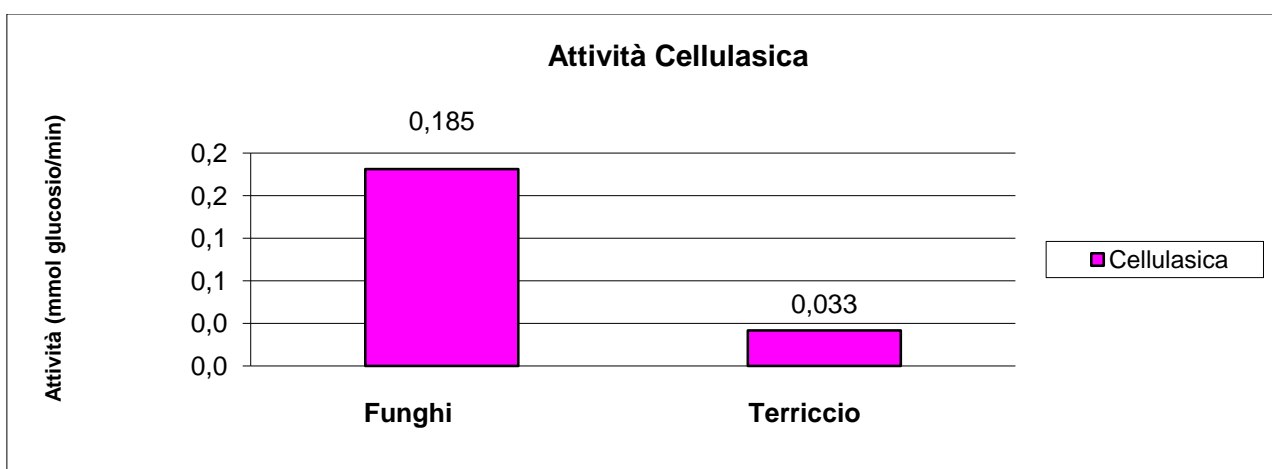
Per quanto riguarda i dati inerenti ai vinaccioli, questi non potevano disporre di un confronto in quanto non sono disponibili dati precedenti a questo lavoro di tesi. Si può comunque osservare come le attività calcolate (specialmente laccasica, caffeasica e ferulolesterasica) siano eccellenti ed ampiamente superiori a quelle misurate per gli altri substrati di crescita.

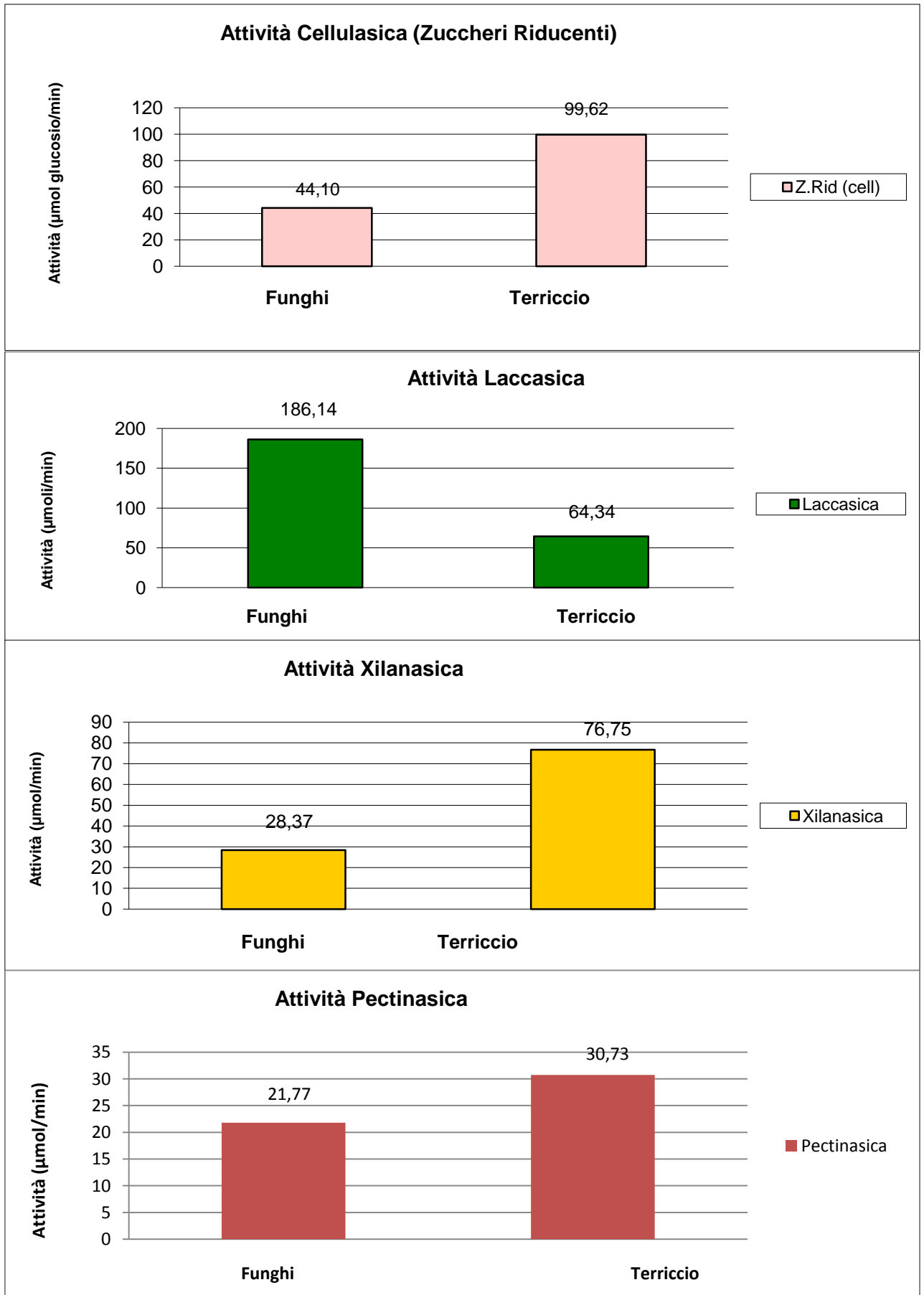
4.2 Analisi di attività enzimatiche in scarti di lavorazione di funghi *Champignons* e relativo terriccio di crescita esausto derivante da “lettiere industriali”

La produzione di funghi industriali è un tipico esempio di fermentazione in stato solido finalizzata alla produzione di funghi superiori le cui specie più vendute sono *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus*, (meglio conosciuto con il nome di Champignon). Le aziende produttrici di funghi edibili per l'alimentazione umana mettono in commercio solo una parte del fungo stesso corrispondente al cappello e al corpo. Durante le operazioni di raffinazione dell'alimento in preparazione ad un suo utilizzo industriale, la parte inferiore (o gambetto) del fungo viene asportata andando a costituire scarti potenzialmente ancora commestibili di fungo fresco. Un altro elemento di interesse è dato dalla “lettiera di crescita del fungo” costituita da letame con aggiunte di pollina, paglia e residui vegetali. La lettiera a valle della fermentazione in stato solido si presenta come un terriccio compostato. È evidente che questi sottoprodotti rappresentano dei materiali di scarto che richiedono significativi costi di smaltimento a carico dell'azienda.

Essendo i funghi superiori dei buoni produttori di enzimi esocellulari, come abbiamo visto nelle prove *in vitro* con *Pleurotus ostreatus*, si può immaginare che anche questi scarti possano contenere discrete quantità di enzimi accumulati nella matrice durante la fase fermentativa in stato solido statica.

Abbiamo quindi eseguito un'indagine preliminare per valutare la presenza di attività enzimatiche in scarti di lavorazione di funghi Champignons sia sui gambetti, definiti come “funghi”, che sul letto esausto di crescita, definito come “terriccio”.





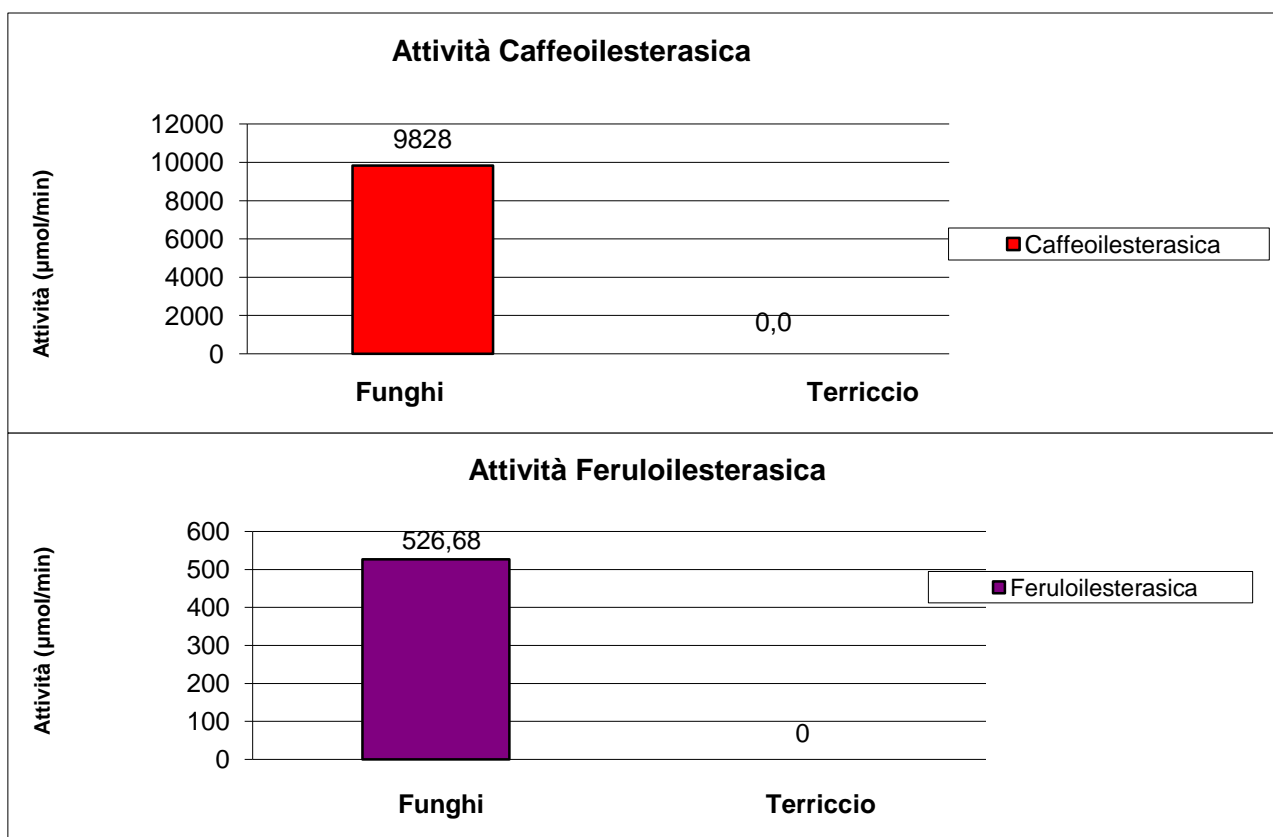


Figura 4.11: Valori di attività enzimatica di “funghi” e “terriccio”

Si può notare come per entrambe le matrici analizzate si siano calcolate delle buone attività di degradazione enzimatica di zuccheri complessi (cellulasi, xilanasi e pectinasi) maggiori nel caso del terriccio.

Per ciò che riguarda l'attività laccasica questa risulta invece maggiore nel caso dell'analisi dei funghi mentre le attività feruloilesterasica e caffeoilesterasica sono buone per i funghi ma pressoché nulle nel caso del terriccio.

4.3 Processi di idrolisi enzimatica su matrici di scarto agro-alimentare utilizzando gli enzimi prodotti dalle fermentazioni in stato solido dinamiche e statiche

Gli estratti ottenuti, sia dalle fermentazioni in stato solido dinamico con *Pleurotus Ostreatus* che da quelle statiche con funghi Champignons e relativo terriccio, sono stati successivamente utilizzati per valutarne la possibile capacità idrolitica delle medesime matrici di scarto utilizzate o no come substrato di crescita.

Sono quindi state effettuate delle prove di idrolisi enzimatica utilizzando 6 estratti enzimatici (4 ricavati dalle fermentazioni in stato solido dinamico con *Pleurotus Ostreatus* su graspi, vinaccioli, paglia e crusca e da fermentazione in stato solido statico con Champignons e

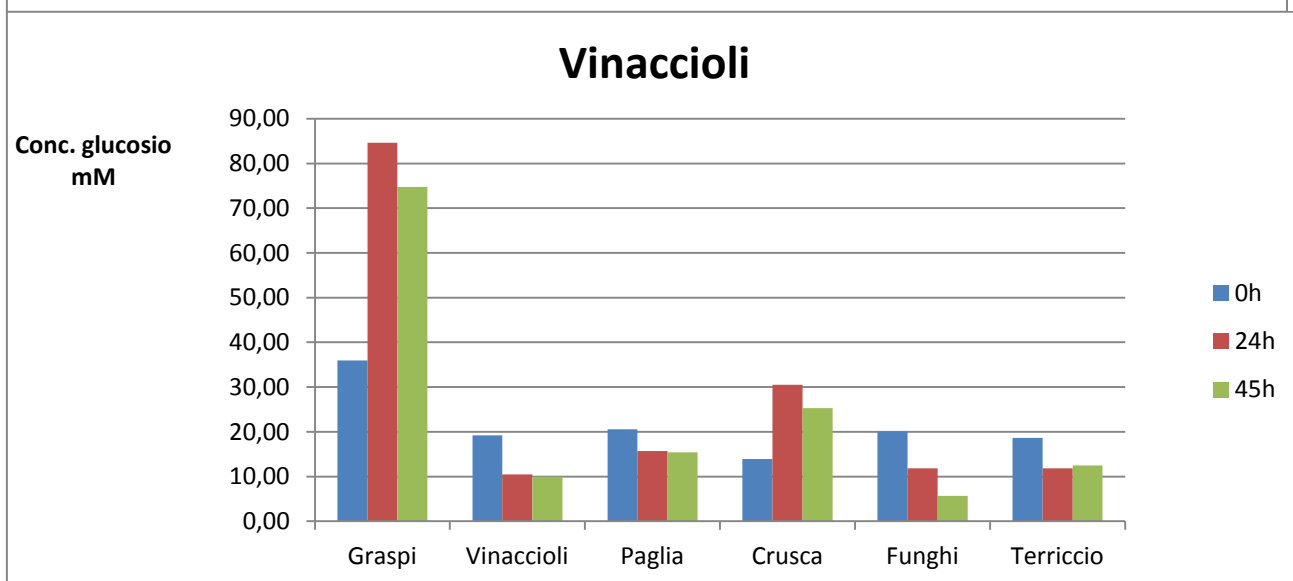
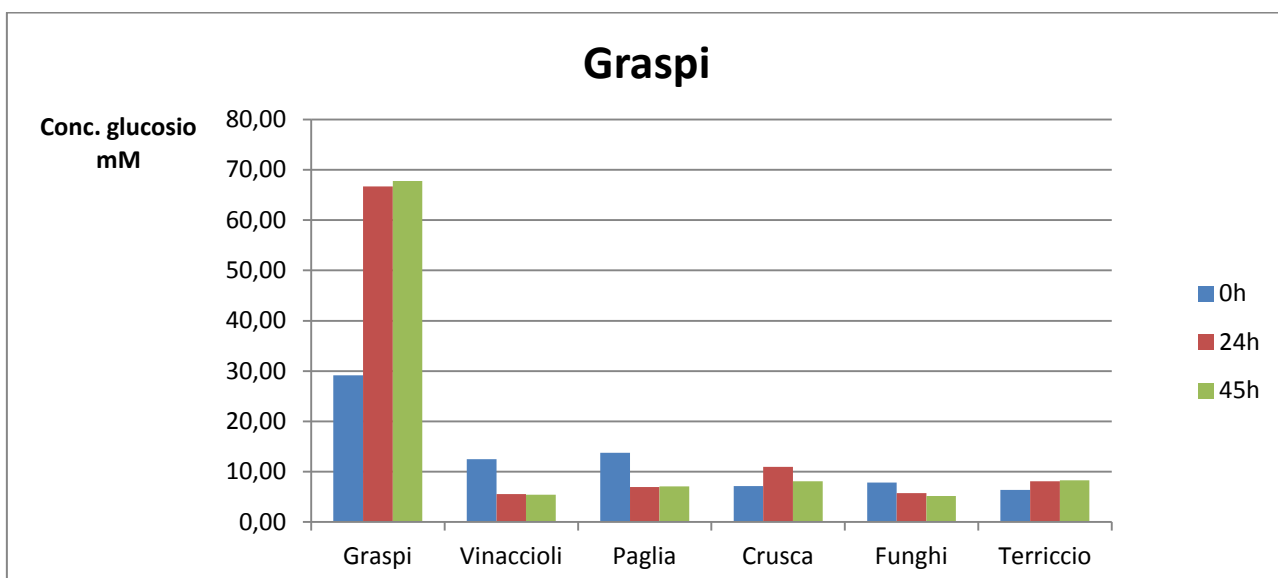
terriccio) su 4 substrati che abbiano subito un precedente trattamento termo-meccanico (graspi, vinaccioli, paglia e crusca) allo scopo di valutare la liberazione di sostanze tipiche dell'azione idrolitica quali zuccheri riducenti e sostanze polifenoliche.

Per ciò che riguarda le misurazioni precedenti all'aggiunta del percolato, sia per il calcolo degli zuccheri riducenti che per quello dei polifenoli, sono stati sommati i valori calcolati per l'enzima da solo e per il substrato trattato termo-meccanicamente riportandoli al volume aggiunto (Tabella 4.7).

Tabella 4.7: Concentrazione di zuccheri riducenti per i 4 substrati trattati con i 6 diversi percolati ai diversi tempi (0, 24 e 45 ore)

ZUCCHERI RIDUCENTI (METODO ADNS)					
SUBSTRATO	ENZIMA	CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO AL TEMPO:			AUMENTO PERCENTUALE
		0 h	24 h	45 h	
GRASPI	Graspi	29,15	66,69	67,76	132,4
	Vinaccioli	12,46	5,57	5,42	-55,3
	Paglia	13,76	6,95	7,07	-48,6
	Crusca	7,14	10,96	8,08	53,6
	Champignon	7,84	5,73	5,17	-26,9
	Terriccio	6,39	8,08	8,31	30,0
VINACCIOLI	Graspi	35,93	84,60	74,76	135,5
	Vinaccioli	19,23	10,47	9,96	-45,6
	Paglia	20,54	15,71	15,39	-23,5
	Crusca	13,91	30,50	25,28	119,3
	Champignon	20,10	11,82	5,69	-41,2
	Terriccio	18,65	11,82	12,45	-33,2
PAGLIA	Graspi	29,86	73,31	76,13	154,9
	Vinaccioli	13,17	8,00	7,91	-39,3
	Paglia	14,47	10,40	9,80	-28,2
	Crusca	7,85	23,96	21,21	205,3

	Champignon	14,44	22,25	6,31	54,1
	Terriccio	12,99	22,96	12,11	76,7
CRUSCA	Graspi	31,85	74,89	56,59	135,2
	Vinaccioli	15,15	19,82	20,17	33,1
	Paglia	16,46	24,50	24,55	49,2
	Crusca	9,83	72,37	58,15	636,2
	Champignon	18,17	44,54	32,11	145,1
	Terriccio	16,72	53,57	50,42	220,4



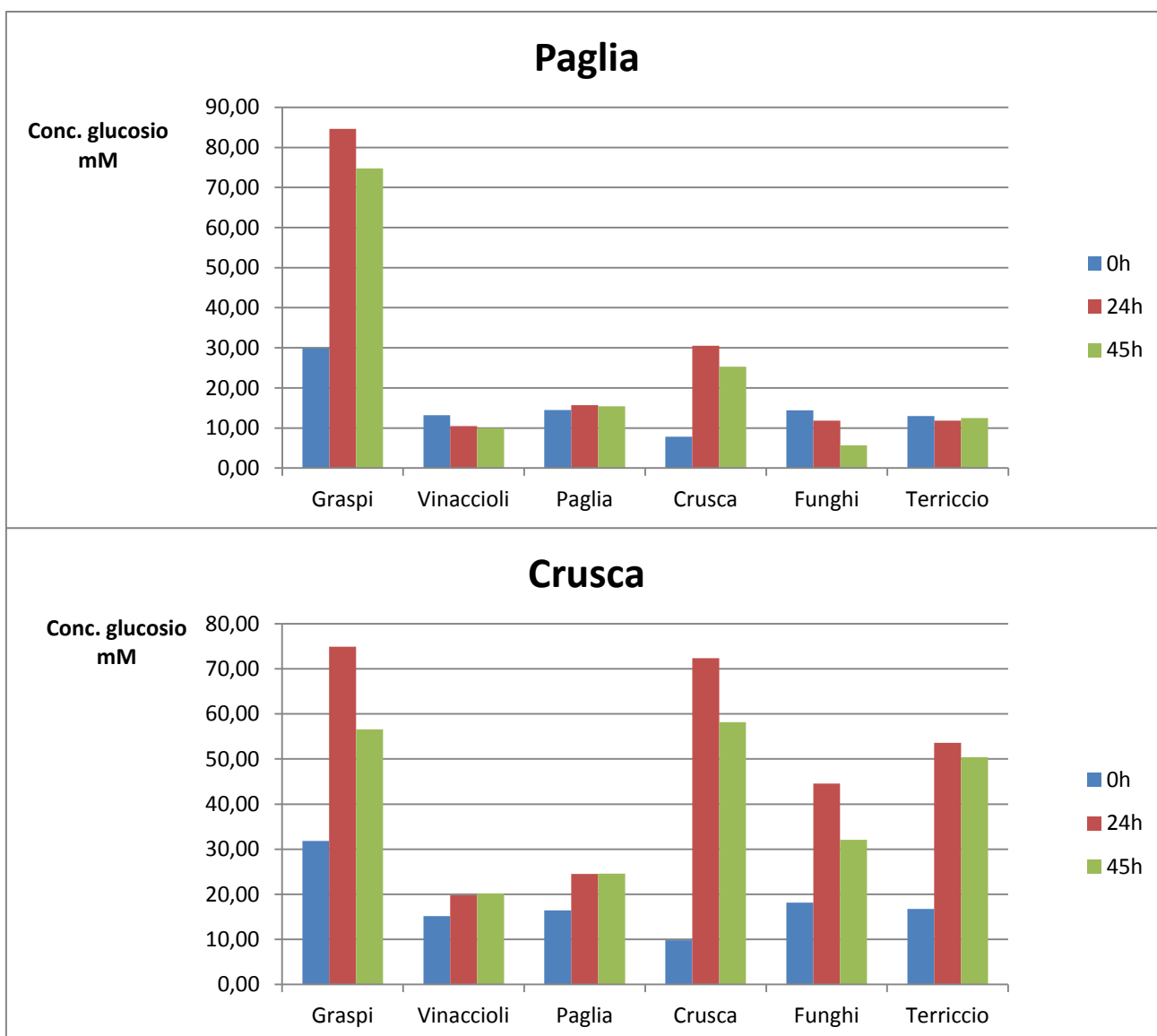


Figura 4.12: Concentrazione di zuccheri riducenti per i 4 substrati trattati con i 6 diversi percolati ai diversi tempi (0, 24 e 45 ore)

Si può notare come per tutti i substrati, la produzione di zuccheri riducenti sia massima con l'aggiunta del percolato ricavato dai graspi d'uva e in misura inferiore con l'aggiunta di quello ricavato dalla crusca il che conferma il valore delle attività riscontrate nelle precedenti prove di degradazione con *Pleurotus*. Occorre comunque notare come le matrici trattate con percolato proveniente dai graspi, partano da un quantitativo di zuccheri riducenti presenti maggiore. La cosa si può giustificare valutando la concentrazione di zuccheri riducenti presenti nello stesso percolato che è molto più alta di tutti gli altri.

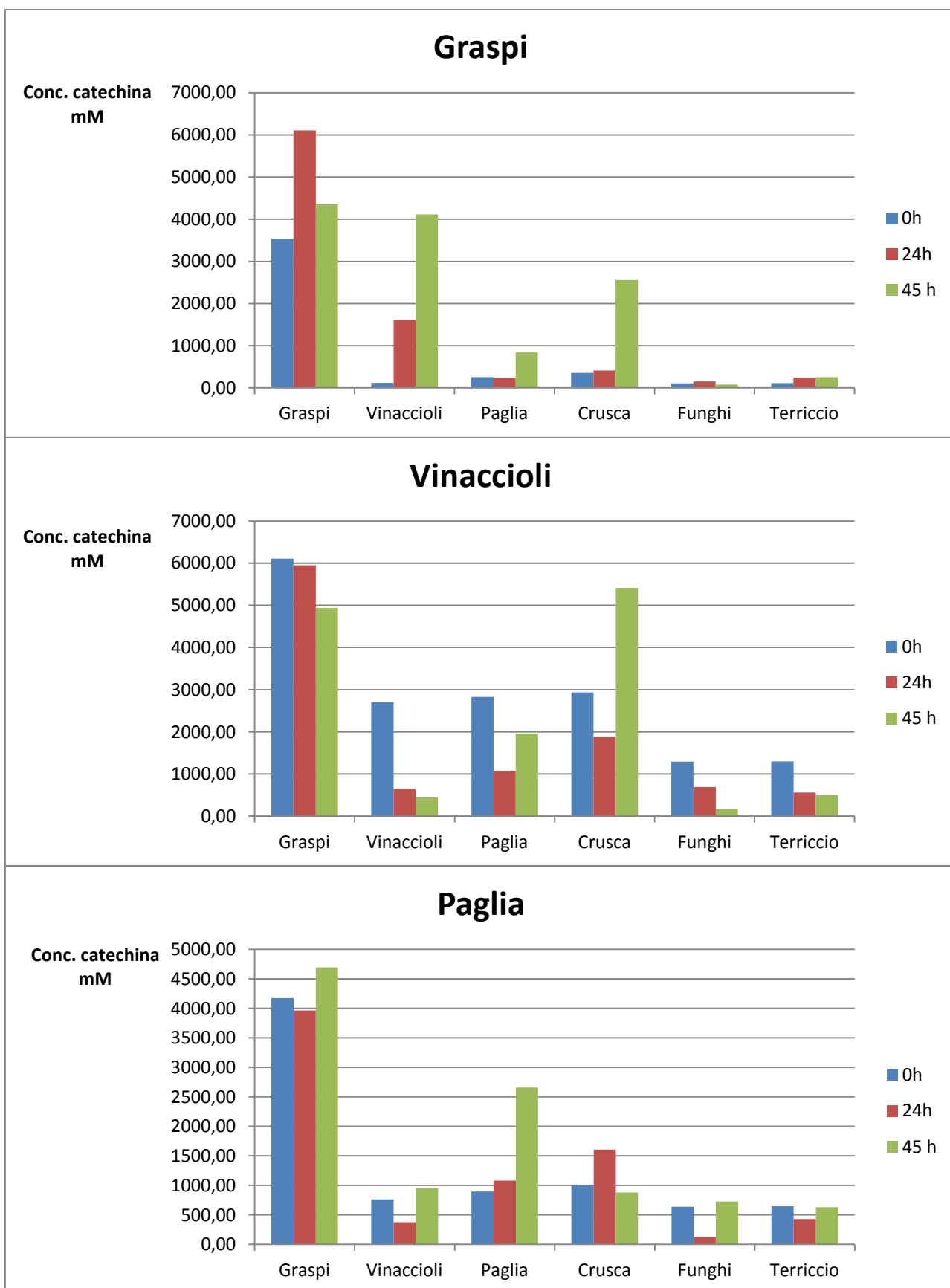
Per ciò che riguarda la crusca come matrice da idrolizzare, si può notare come sia l'unica in grado di essere degradata da tutti gli estratti enzimatici. Questo è probabilmente da ricondurre al fatto che la crusca abbia una struttura formata da catene di zuccheri complessi ma di facile degradazione. Nel caso specifico la produzione di zuccheri riducenti dell'estratto della crusca

sul substrato di crusca ha un valore di produzione percentuale e molare addirittura superiore a quello calcolato con l'estratto proveniente dai graspi.

Infine si può notare come in quasi tutti i casi il picco di produzione si riscontri al termine del primo prelievo dopo 24 ore dall'inoculo del percolato. Questo può essere dovuto al fatto che col passare del tempo gli zuccheri liberati vengano consumati e/o degradati da agenti esterni alla nostra prova che non è stata fatta in un ambiente completamente asettico.

Tabella 4.8: Concentrazione di polifenoli per i 4 substrati trattati con i 6 diversi percolati ai diversi tempi (0,24, 45 ore)

POLIFENOLI (METODO FOLIN)					
SUBSTRATO	ENZIMA	CONCENTRAZIONE DI FENOLI TOTALI AL TEMPO:			AUMENTO PERCENTUALE
		0 h	24 h	45 h	
GRASPI	Graspi	3530,72	6104,37	4353,98	72,9
	Vinaccioli	120,42	1609,65	4116,49	3318,4
	Paglia	253,09	233,82	841,48	232,5
	Crusca	358,96	410,48	2555,21	611,8
	Champignon	106,39	156,13	78,43	46,8
	Terriccio	113,88	245,55	257,28	125,9
VINACCIOLI	Graspi	6106,67	5948,97	4935,98	-2,6
	Vinaccioli	2696,37	650,90	445,66	-75,9
	Paglia	2829,04	1074,57	1960,02	-30,7
	Crusca	2934,91	1886,72	5413,89	84,5
	Champignon	1290,70	690,48	167,86	-46,5
	Terriccio	1298,18	561,47	496,97	-56,7
PAGLIA	Graspi	4172,62	3961,10	4691,16	12,4
	Vinaccioli	762,31	376,76	951,43	24,8
	Paglia	894,98	1081,90	2657,83	197,0
	Crusca	1000,85	1605,26	881,06	60,4
	Champignon	637,29	130,47	726,40	14,0
	Terriccio	644,77	426,60	628,18	-2,6
CRUSCA	Graspi	3545,38	3157,74	3531,56	-0,4
	Vinaccioli	135,08	226,49	414,87	207,1
	Paglia	267,75	57,17	284,40	6,2
	Crusca	373,62	601,05	961,69	157,4
	Champignon	87,54	255,08	241,89	191,4
	Terriccio	95,03	162,72	246,29	159,2



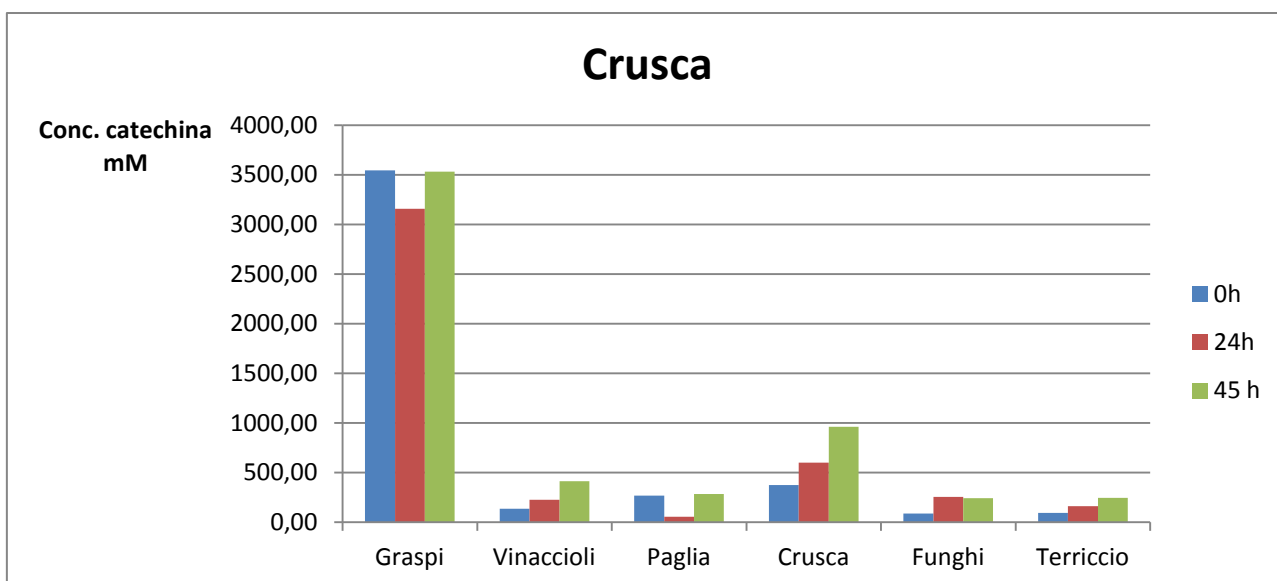


Figura 4.13: Concentrazione di polifenoli totali per i 4 substrati trattati con i 6 diversi percolati (0,24, 45 ore)

Analizzando i dati si può notare come le matrici di scarto enologico siano generalmente più propense a rilasciare quantitativi rilevanti di polifenoli. Per ciò che riguarda i graspi si può notare come gli estratti enzimatici più efficaci siano quelli ricavati da vinaccioli (il cui incremento percentuale è il più alto in assoluto raggiungendo il +3300%), graspi e crusca. Analizzando invece il substrato vinaccioli si può osservare come la concentrazione presente di base nella matrice sia già molto alta rispetto agli altri substrati. I vinaccioli evidentemente tendono a rilasciare componenti polifenoliche già solo con un trattamento termo-meccanico. Si è comunque visto come l'aggiunta dell'enzima proveniente dalla crusca favorisca un'ulteriore produzione di oltre l'84%.

Nei substrati di paglia e crusca si evidenzia una produzione abbastanza bassa di polifenoli anche se si può notare come il percolato enzimatico, estratto dalla stessa matrice sulla quale poi si è andato ad aggiungere (enzima estratto dalla paglia sulla paglia stessa e lo stesso per la crusca), abbia un effetto maggiore rispetto agli altri.

5 Conclusioni

I processi di fermentazione in stato solido hanno mostrato una buona capacità di produrre enzimi extracellulari in grado di poter essere utilizzati successivamente nello stadio idrolitico dei processi di bioraffinazione per la valorizzazione integrata degli scarti agro-alimentari. La produzione di enzimi extracellulari è strettamente legata alla biodisponibilità dei substrati di crescita delle biomasse fungine. I substrati di crescita infatti, influenzano significativamente l'induzione della biomassa fungina a produrre specifiche attività enzimatiche da cui si evince che le carboidrasi vengono prevalentemente prodotte su matrici come la crusca (naturalmente ricca di arabinoxilani) mentre quelle arilesterasiche su vinaccioli (naturalmente ricchi di lignina). La paglia mette, invece, in evidenza attività sia carboidrasiche che arilesterasiche probabilmente dovute a un miglior bilanciamento delle frazioni organiche.

I valori ottenuti sono stati messi in evidenza dal confronto con i dati delle fermentazioni in stato solido statiche (prive di un passaggio estrusivo della matrice), riportati da Masutti et al. (2012), da cui si è osservato un incremento considerevole della produzione delle attività enzimatiche nell'ordine di 100 - 1000 volte.

Tale incremento sembra confermare i limiti diffusivi di un fermentatore in stato solido statico per cui si può ragionevolmente sostenere che la fase di estrusione migliora significativamente la diffusione dell'ossigeno, l'area superficiale del substrato e la permeabilità dell'acqua quale solvente di estrazione.

Nel caso dei prodotti di scarto della produzione di *Champignons*, si è potuto osservare come l'utilizzo di questo tipo di matrici nell'ambito di un eventuale recupero di estratti enzimatici e di possibili componenti di interesse risulta essere verosimile, specialmente per il caso dei funghi anche se i valori delle attività enzimatiche ottenute con *Champignons* risultano significativamente inferiori a quelle ottenute con *Pleurotus*. Tale differenza potrebbe essere attribuita alla tipologia di biomassa fungina ma anche alla tipologia di fermentazione in stato solido statica o dinamica, rispettivamente. Tuttavia, considerando anche l'effetto di induzione del substrato di crescita, la bassa produttività enzimatica potrebbe essere dovuta alla composizione della lettiera industriale.

L'ultimo studio di questo lavoro di tesi è stato infine improntato sulla capacità idrolitica dei percolati raccolti (sia da fermentazioni in stato solido statico come nel caso degli *Champignons* che da fermentazioni in stato solido dinamico come quelle del *Pleurotus*) nella degradazione degli stessi substrati vegetali sui quali erano cresciuti i funghi. I valori ottenuti hanno dimostrato in diverse parti l'efficacia di utilizzo di questo genere di estratti enzimatici

nell'idrolisi ed estrazione di componenti di interesse. Nello studio sul rilascio degli zuccheri riducenti si osserva la concentrazione massima nelle prove in cui è stato aggiunto il percolato proveniente dai graspi d'uva seguito da quello prodotto dalla crusca. La crusca si presenta, inoltre, come un ottimo substrato da idrolizzare da parte di tutti gli estratti enzimatici grazie alla sua struttura ricca di catene di zuccheri complessi ma di facile degradazione.

I risultati ottenuti lasciano intravedere la possibilità di sviluppo di un processo integrato di valorizzazione degli scarti agro-alimentari da utilizzarsi per la produzione degli enzimi necessari al successivo processo di bioraffinazione.

6 Bibliografia

1. A. Borgognone, (2010-2011), “Valorizzazione di scarti agroalimentari tramite la produzione di enzimi lignocellulotici da *Pleurotus Ostreatus*”. *Tesi di Laurea in Biologia della salute*, Università di Bologna
2. Zhang YHP, (2008), “Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries”. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 367–375
3. G.Laufenberg, B.Kunz, M.Nystroem, (2003), “Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations”. *Bioresour Technol*, 87: 167–198
4. G.Grassi, A.V. Bridwater, (1990), “Biomass for energy and environmental, agriculture and industry in Europe – A strategy for the future”. Commission of the European Communities
5. The State of Food and Agriculture, (2005). FAO report
6. Dati ISTAT: www.istat.it
7. C.Di Blasi, V.Tanzi, M.Lanzetta, (1997), “A study on the production of agricultural residues in Italy”. *Biomass and Bioenergy*, 12: 321-331
8. Consorzio LEAP, (2007), “Disponibilità di biomasse da sottoprodotti e residui energetica”. Progetto E.C.A.T.E
9. Regione Emilia Romagna, (2004), “Relazione sullo stato dell’ambiente della regione Emilia Romagna Energia”
10. ENEA, (1998), “Fonti rinnovabili di energia - Obiettivi e strategie nazionali Stato dell’arte”. Conferenza Nazionale Energia e Ambiente, 29-33
11. E.Vandamme, A.Cerdobbel, W.Soetaer, (2006), “Biocatalysis on the rise: Part 2” . *Applications.Chem Today*, 24: 57–61
12. JB Van Beilen, (2008), “Transgenic plant factories for the production of biopolymers and platform chemicals”. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2: 215–228
13. D.Morris, (2006), “The next economy: From dead to living carbon”. *J Sci Food Agric*, 86: 1743–1746
14. SK Dahod, (1999), “Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes”. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 213-220
15. B.Kamm, M.Kamm, (2004), “Principles of biorefineries”. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 137–145
16. W.Soetaert, EJ Vandamme, (2005), “Biofuel production from agricultural crops - Biofuels for fuel cells: Renewable energy from biomass fermentation” . *Series*

- Integrated Environmental Technology*” (P.Lens, P.Westerman, M.Haberbauer, A.Moreno, eds.) IWA Publ., UK, 37-50
17. M.Canakci, H.Sanli, (2008), “Biodiesel production from various feed stocks and their effects on the fuel properties”. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 431–441
 18. G.Sarath, RB.Mitchel, S.Satler, D.Funnell, JF Pedersen, RA Graybosch, KP Vogel, (2008), “Opportunities and roadblocks in utilizing oranges and small grains for liquid fuels”. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 343–354
 19. P.Nigam, A.Pandey, (2009), “Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation”. Springer Editor
 20. D.Di Gioia, L.Sciubba, L.Setti, F.Luziatelli, M.Ruzzi, D.Zanichelli, F.Fava, (2007), “Production of biovanillin from wheat bran”. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 598-505
 21. Alexander Bauera, Peter Böschb. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142, 50-55. 2009
 22. <http://digilander.libero.it/tuttosullanutrizione/Composizione%20alimenti/Crusca%20di%20frumento.htm>
 23. J.D. Mauseth, (2006), “La parete: un graticcio intermolecolare”. *Botanica*, Parte Generale II edizione
 24. M. Brachitta (2012), “Pretrattamenti termo-meccanici ed enzimatici su scarti dell’industria enologica per la produzione di biogas”. *Tesi di Dottorato in Biologia cellulare, molecolare e industriale*, Università di Bologna”
 25. Direttiva Europea 2009/28/CE
 26. G. Riva, (1997), “Residui agricoli e agro-industriali utilizzabili a fini energetici: valutazione del potenziale nazionale e verifica in due provincie del nord e centro Italia”. 1° Convegno Nazionale -Valorizzazione energetica e industriale delle biomasse lignocellulosiche
 27. V. La Rocca, (2002-2003), “Recupero della frazione di emicellulosa, cellulosa e lignina da biomassa pretrattata mediante steam explosion”. *Tesi di Laurea in Ingegneria*, Università degli studi di Roma “La Sapienza”
 28. <http://www.chim.unisi.it/basosi/didattica/ENERGIA-BIOMASSE.pdf>
 29. <http://www.terna.it/LinkClick.aspx?fileticket=axZsbhFJBW8%3d&tabid=418&mid=2501>
 30. F. Zimbardi, E. Viola, E. Ricci, (2000), “Miglioramento dell’utilizzo delle biomasse mediante trattamento di Steam Explosion”. *L’ambiente*, Ranieri Editore, 6: 8-12
 31. B.R. Allen, J Cousin, G.E. Pierce, (1980), “Pretreatment methods for the degradation of lignin”. Final Report

32. A. Pandey, P. Selvakumar, CR Soccol, P. Nigam, (1999), “Solid state fermentation for the production of industrial enzymes”. *Current Science*,77(1): 149-162
33. A. Hatakka, (1994), “Lignin-modifying enzymes from select white-rot fungi: production and role in lignin degradation”. *FEMS Microbiol Rev*,13: 125-35
34. H. Morais, C. Ramos, E. Forgacs, A. Jakab, T. Cserhati, (2004), “Enzyme production of *Pleurotus ostreatus* evaluated by Three-Way principal component analysis”. *Eng. Life Sci*, 2: 165-170
35. G. Olivieri, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Giardina ,G. Cennamo, G. Sannia, (2006), “Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*”. *Biochem Eng J*, 31: 180-70
36. S. R. Couto, J. L. Toca-Herrera, (2007), “Laccase production at reactor scale by filamentous fungi”. *Science Direct; Biotechnology Advances*, 25: 558-569
37. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4
38. http://www.rivistedigitali.com/Industria_della_carta/2009/4/.../scaricaPdf
39. <http://www.brenda-enzymes.info/>
40. Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena, Reena Gupta, “Microbial pectinolytic enzymes: A review”, *Process Biochemistry* 40, 2931-2944 (2005)
41. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
42. V. Mastihuba, L. Kremnick, M. Mastihubov, J.L. Willet, G. L. Coté, (2002), “A spectrophotometric assay for feruloyl esterases”. *Analytical Biochemistry*, 309: 96–10
43. J.J Classen. C.R. Engler, C.M. Kenerley, A.D. Whittaker, (2000), “A logistic model of subsurface fungal growth with application to bioremediation”. *J. Environ. Sci Health*, 35 (4): 465-488
44. A. Pandey, P. Selvakumar, C.R Soccol, P. Nigam, (1999), “Solid state fermentation for the production of industrial enzymes”. *Curr. Sci* 77 (1): 149-162
45. D.A. Mitchell, A. Pandey, P.Sangsurasak, N.Krieger, (2000), “Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation”. *Process Biochem.*, 35 (1-2): 167-178
46. A. Pandey, (2003), “Solid-state fermentation”. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84
47. T. Robinson, P. Nigam, (2003), “Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation”. *Biochem Eng J*, 13: 197-203
48. R. Rani Singhania, A. Kumar Patel, C. R. Soccol, A. Pandey, (2009), “Recent adevances in solid-state fermentation”. *Biochemical Engineering Journal* 44. pp 13-18

49. J. L. Toca-Herrera, J. F. Osma, S. R. Couto, (2007), "Potential of solid-state fermentation for laccase production - Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology". A. Méndez-Vilas Editors, 391-401
50. M.A. Murado, M.P. González, L. Pastrana, (1998), "Production of microfungus metabolites on inert solid supports". S.G. Pandalai Editors, *Research Signpost*, India, 1: 405-432
51. L. Setti, S. Giuliani, G. Spinozzi, P.G. Pifferi, (1999), "Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hidrazone and methoxyphenols". *Enzyme and microbial technology*, 25: 258-289
52. R.P. Poincelot, P.R. Day, (1972), "Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi". *Applied and Environmental Microbiology*, 23: 875-879
53. G. Spinozzi (1994-1995), "Rimozione di fenoli da sistema modello per via fermentativa", *Tesi di laurea in Chimica industriale*, Università di Bologna
54. M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, (1992), "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", *Journal of Biotechnology*, 23: 257-270
55. Giuliani, (1996-1997), "Studio della produzione di laccasi da *Pleurotus ostreatus* in sistemi modello di acque di vegetazione", *Tesi di laurea in Chimica industriale*, Università di Bologna
56. David Morini, (2003-2004), "Trattamenti enzimatici per la valorizzazione integrata di scarti enologici", *Tesi di laurea in Chimica industriale*, Università di Bologna
57. Dario Zanichelli, 2008, "Processi di biorefining per l'estrazione di secondary chimica building blocks da sottoprodotti dell'agroindustria", *Tesi di dottorato in Biocatalisi applicata e microbiologia industriale*, Università di Bologna
58. Di Stefano, Cravero, Gentilini, (1998), *Vignevisini*, 1/ 2, 47-52
59. Folin O & Ciocalteu, V (1927). On tyrosine and triptophan determination in protein. *Journal of biological chemistry*, 73, 627-650
60. : Sherwin Carlquist. *Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood*. Berlin, Springer, 1988
61. Craig B. Faulds, "Ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*: their application in the biotransformation of agricultural residues", PhD Thesis, University of East Anglia, 1997