

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biochimiche e Biotecnologiche

Ciclo XXVI

**Settore Concorsuale di afferenza: 03/D1
Settore Scientifico - Disciplinare: CHIM/11**

**SISTEMI PER LA PRODUZIONE DI ENZIMI
INDUSTRIALI FINALIZZATI ALLA
VALORIZZAZIONE DI SCARTI AGROALIMENTARI**

Presentata da: Dayanne Christine Masutti

Coordinatore Dottorato

Santi Mario Spampinato

Relatore

Leonardo Setti

Esame finale anno 2014

SOMMARIO

1	INTRODUZIONE	5
1.1	Scarti Agroalimentari	6
1.1.1	Sottoprodotti derivanti dalla lavorazione agroalimentare	6
1.1.2	Sviluppi tecnologici applicati a fonti rinnovabili	7
1.2	Produzione di enzimi esocellulari da <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
1.2.1	Biodegradazione di matrici lignocellulosiche da funghi white rot	11
1.2.2	Caratteristiche di classi enzimatiche prodotte da <i>Pleurotus ostreatus</i>	12
1.3	Fermentazione in stato solido (SSF)	15
1.3.1	Sistemi di fermentazione a confronto: SmF e SSF	17
1.4	Composizione degli scarti vegetali provenienti dalla lavorazione viticola e dei cereali 19	
1.4.1	I cereali	19
1.4.2	Il settore viticolo	24
1.4.2.1	Polifenoli da vinacce di uva rossa	27
1.5	Trattamento delle biomasse.....	29
1.5.1	Disponibilità della sostanza organica.....	29
1.5.2	Metodi di pretrattamento	31
1.5.3	Pretrattamento di tipo chimico.....	33
1.5.4	Pretrattamento di tipo meccanico e termo-meccanico	33
1.5.5	Pretrattamento di tipo biologico ed enzimatico	37
1.6	Tecniche di concentrazione enzimatica	38
1.6.1	Liofilizzazione	38
1.6.2	Spray dryer.....	39
2	SCOPO	41
3	PARTE SPERIMENTALE.....	45
3.1	Influenza della matrice vegetale sulla produzione di enzimi in SSF in presenza di <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	46
3.1.1	Sistema a biocella	46
3.1.2	Biocelle con paglia di grano	49
3.1.3	Biocelle con lolla di riso	53
3.1.4	Biocelle con graspi d'uva	57
3.1.5	Biocelle con crusca di grano.....	61
3.1.6	Rese e potenziali massimi di produzione in SSF con sistema a biocella.....	64
3.2	Analisi della produzione enzimatica in modello di SSF con colonna a letto impaccato	76
3.3	Ottimizzazione dei parametri operativi e strutturati del SSF.....	86

3.3.1	Pretrattamenti termo-meccanici delle matrici vegetali	86
3.3.1.1	Post-trattamento termo-meccanico ed enzimatico	88
3.3.1.2	Biotrasformazione delle matrici durante la fermentazione in stato solido	90
3.3.2	Determinazione delle attività enzimatiche prodotte nel SSF dinamico	92
3.3.3	Effetto sinergico dei substrati nella produzione enzimatica	99
3.3.3.1	Analisi e confronto delle attività enzimatiche dei mix di substrati	100
3.3.4	Confronto tra fermentazioni in stato solido statiche o dinamiche tramite stadio di estrusione	106
3.4	Valorizzazione dei sottoprodotti della lavorazione di funghi Champignon: gambetto e terriccio di crescita esausto.....	109
3.5	Processi d'idrolisi enzimatica sui sottoprodotti agroalimentare utilizzando gli enzimi prodotti dalle fermentazioni in stato solido dinamiche e statiche	112
3.6	Raffinazione.....	119
3.6.1	Effetti della liofilizzazione sull'estratto enzimatico	120
3.6.1.1	Processi d'idrolisi enzimatica su sottoprodotti agroalimentari utilizzando gli enzimi prodotti dalle SSF dinamiche tal quale e liofilizzato	122
3.6.2	Effetti della polverizzazione tramite spray dryer sull'estratto enzimatico	123
4	CONCLUSIONI.....	125
5	MATERIALI E METODI.....	129
5.1	Preparazione del terreno di coltura agarizzato con estratto di malto.....	129
5.2	Fermentazione in stato solido statica	129
5.2.1	Fermentazione in stato solido statica in biocella	129
5.2.2	Fermentazione in stato solido statica in colonna a letto impaccato.....	130
5.3	Fermentazione in stato solido dinamica.....	131
5.3.1	Pretrattamenti termo-meccanici delle matrici vegetali	131
5.3.2	Fermentazione in stato solido dinamica in biocella con processo di estrusione	131
5.4	Saggi di determinazione enzimatica	133
5.4.1	Determinazione dell'attività laccasica.....	134
5.4.2	Determinazione dell'attività perossidasi.....	135
5.4.3	Preparazione del bianco di controllo per la determinazione delle attività cellulasi, xilanasica e pectinasi.....	135
5.4.4	Determinazione dell'attività cellulasi	136
5.4.5	Determinazione dell'attività xilanasica	139
5.4.6	Determinazione dell'attività pectinasi.....	140
5.4.7	Determinazione dell'attività arilesterasi	142
5.5	Liofilizzazione dell'estratto enzimatico.....	143
5.6	Idrolisi enzimatica.....	143
5.7	Determinazione dei polifenoli totali.....	144

Sommario

5.8	Valutazione delle eventuali attività enzimatiche sugli scarti della produzione di Champignon	146
5.9	Strumenti di laboratorio.....	146
6	BIBLIOGRAFIA	149

1 INTRODUZIONE

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 enzimi in alcune fasi o nel processo complessivo. Recenti sviluppi in campo biotecnologico stanno infatti, fornendo nuove applicazioni considerando le caratteristiche di alcuni microrganismi tra cui batteri, lieviti e funghi che mostrano la capacità di produrre diverse classi enzimatiche¹.

Il *Pleurotus ostreatus*, un fungo edule basidiomicete, sta riscontrando un crescente interesse biotecnologico legato alla capacità di degradare residui lignocellulosici; inoltre la sua produzione di metaboliti secondari e di proteine risulta interessante per alcune applicazioni farmaceutiche e di proteine per uso industriale rispettivamente². Il fungo produce un'ampia tipologia di enzimi esocellulari capaci di degradare un complesso di substrati lignocellulosici in sostanze solubili che possono essere usate come nutrienti.

Sulla superficie terrestre, circa 200 miliardi di tonnellate di materia organica viene annualmente prodotta attraverso il processo fotosintetico³. Tuttavia una rilevante quantità di questa produzione non è destinata all'uso commestibile per la popolazione umana e quella animale e, in numerosi casi, diventa fonte di problematiche a livello ambientale. La società attuale, in cui è presente una continua domanda per un adeguato apporto nutrizionale, è caratterizzata da costi crescenti contro una disponibilità spesso decrescente di materiali grezzi sostenuti da un particolare riguardo per l'inquinamento ambientale⁴. Di conseguenza si assiste ad un continuo interesse per il recupero, riciclo e valorizzazione dei rifiuti. Questa tendenza riguarda soprattutto le industrie del settore agroalimentare e le industrie di trasformazione secondaria, ponendo seri e continui problemi d'impatto dei sottoprodotti sulle matrici ambientali⁵.

Cercando di risolvere anche questa problematica, nasce l'idea di sfruttare questi scarti agroalimentari, che rappresentano un'importante risorsa di nutrienti per funghi come *Pleurotus ostreatus*, per la produzione enzimatica tramite la fermentazione in stato solido (SSF).

1.1 Scarti Agroalimentari

1.1.1 Sottoprodotti derivanti dalla lavorazione agroalimentare

Gli scarti, i residui e i rifiuti delle industrie agroalimentari di diversa provenienza costituiscono una porzione significativa della produttività globale del settore. Questi includono 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^{6,7}.

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 tonnellate⁸.

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 per la produzione della carta in vari comparti⁹. Negli altri due comparti 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.

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.

	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

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

L'accumulo in grande quantità di questo tipo di biomassa, ogni anno risulta non solo nel deterioramento dell'ambiente ma anche nella perdita di materiale potenzialmente utile per la trasformazione e lo sviluppo di numerosi prodotti di alto valore aggiunto. Inoltre la collocazione e lo smaltimento di tali scarti comporta costi elevati considerando tra questi, la perdita economica relativa al comparto di composti utili estraibili tramite processi chimici, enzimatici e microbiologici.

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 e farmaceutico.

1.1.2 Sviluppi tecnologici applicati a fonti rinnovabili

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 carbone¹⁰.

Gli scarti grezzi agroalimentari, rispetto alle risorse fossili, fino a pochi anni fa sono stati caratterizzati da costi molto bassi dovuti al continuo aumento della produzione agricola, una tendenza tuttavia destinata a cambiare drasticamente negli ultimi anni, data la competizione tra biomasse per uso alimentare e per uso chimico ed energetico, diventando così una questione di dibattito mondiale. Questa tendenza può essere agevolata poiché sostenuta da importanti sviluppi nell'ingegneria genetica delle piante, soprattutto delle colture industriali¹¹ e la produzione di bioenergia e sostanze chimiche a partire da residui agroindustriali¹². Le colture industriali come canna da zucchero, barbabietola, mais, grano e altri cereali vengono attualmente processati nelle raffinerie 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^{13,14}, questi ultimi capaci di convertire le sostanze vegetali in un'ampia

varietà di prodotti chimici tra cui biocarburanti, come bioetanolo e solventi organici, come butanolo¹⁵.

Allo stesso modo semi oleosi come la soia, semi di colza e di olio di palma vengono trasformati in oli e ulteriormente convertiti in ingredienti alimentari, prodotti di oleochimica e recentemente sempre più in biodiesel¹⁶. Mentre questi processi tecnologici di conversione risultano oggi piuttosto avanzati, i sottoprodotti agroalimentari e i reflui agroindustriali, come crusca, paglia di grano, acque di vegetazione, scarti di mais, barbabietola e del legno, tutti ricchi nella loro struttura di materiale lignocellulosico, sono attualmente scarsamente valorizzati o lasciati decomporre nel terreno¹⁷.

Negli ultimi anni la Comunità Europea sta puntando fortemente allo sviluppo di concetti legati alla bioraffinazione, cioè a processi che partendo dalle biomasse, quali risorse rinnovabili, possono produrre sia vettori energetici, come i biocombustibili, sia materie prime per la chimica industriale del dopo petrolio.

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 economicamente¹⁸.

Data la complessità e la diversità delle matrici di partenza, generalmente trattamenti singoli per lo smaltimento degli scarti agroalimentari risultano difficili o scarsamente sostenibili. Un diverso approccio, basato su trattamenti sequenziali che consentano la valorizzazione delle diverse componenti della matrice vegetale, sebbene con maggiori complessità legate ai costi e le procedure, può permettere di massimizzare il recupero di valore aggiunto dei sottoprodotti, ottimizzando al contempo le procedure di smaltimento. In Figura 1.1 è riportato uno schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio di scarti agroindustriali:

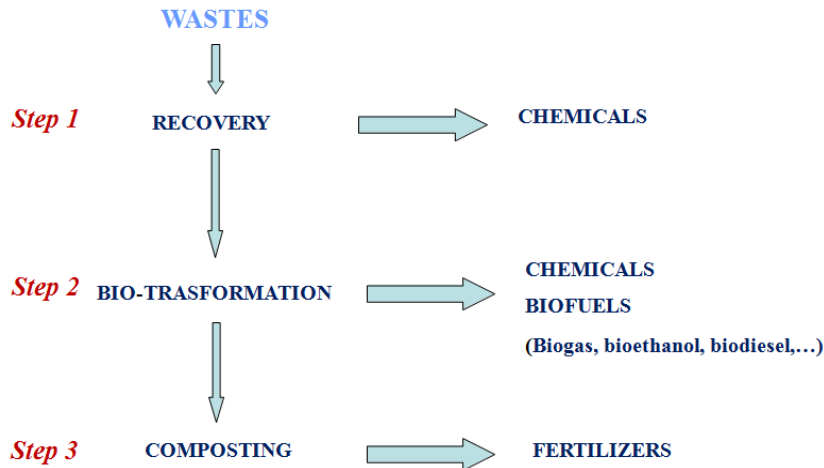


Figura 1.1: Schema della valorizzazione multistadio degli scarti agroindustriali

I sottoprodotti di origine vegetale sono ricchi di fito-composti, i quali hanno recentemente trovato un grande interesse nel settore alimentare, nutraceutico, cosmeceutico e farmaceutico¹⁹. Purtroppo, questi composti sono di difficile accesso dovuto alla complessa matrice vegetale (Figura 1.2). Gli enzimi essendo catalizzatori biologici, sono in grado di degradare questa complessa struttura vegetale e di ridurre le lunghe catene polimeriche che la compongono, liberando le sostanze d'interesse a loro legate. Questa è una valida alternativa al uso di sostanze chimiche per l'estrazione di fito-composti che solitamente è caratterizzato da un elevato impatto ambientale.

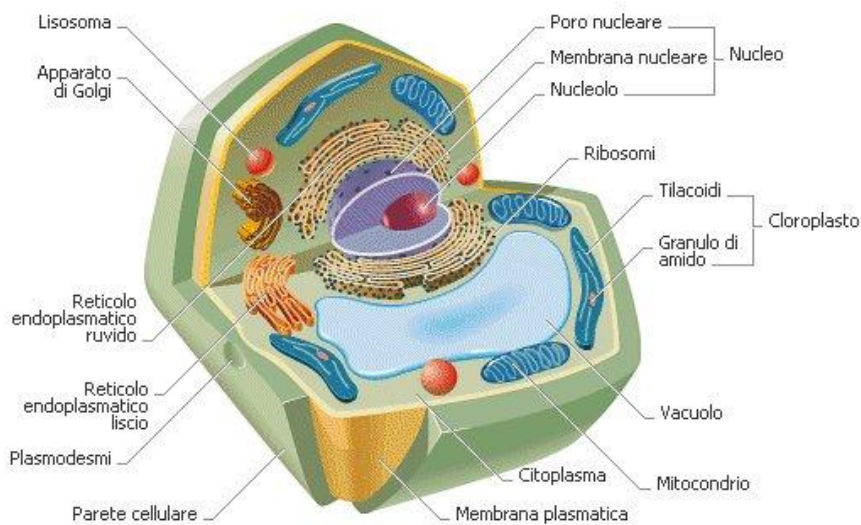


Figura 1.2: Struttura della cellula vegetale vista in sezione

1.2 Produzione di enzimi esocellulari da *Pleurotus ostreatus*

Il genere *Pleurotus spp* (Figura 1.3 A) è dotato di ife settate, le spore sono sorrette da particolari organi, i 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 (Figura 1.3 B e C). Il micelio aerobio si riproduce facilmente 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 di temperatura. In fase sperimentale questi parametri vengono controllati per mantenere il fungo allo stato di micelio, fase in cui vengono prodotti gli enzimi esocellulari.

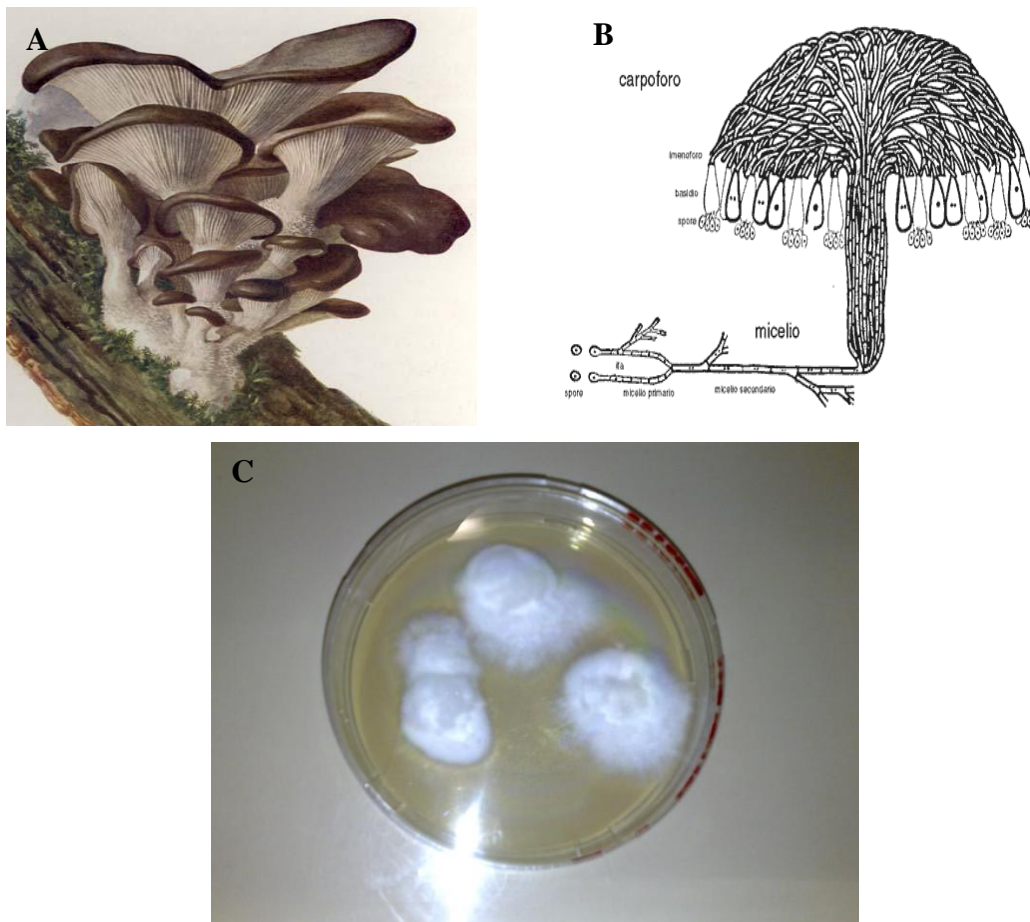


Figura 1.3: (A) *Pleurotus ostreatus*, (B) Struttura dei basidiomiceti e (C) *Pleurotus ostreatus* cresciuto in piastra

Nella parete cellulare, la lignina è associata alla cellulosa e l'emicellulosa agendo da barriera e 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 in grado 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 tramite l’inoculazione su scarti agroalimentari e la riduzione in termini di costi, poiché questi scarti agroalimentari e industriali possono essere usati come substrati di crescita.

1.2.1 Biodegradazione di matrici lignocellulosiche da funghi white rot

I funghi basidiomiceti del tipo “white-rot” sono tra i microrganismi maggiormente attivi nella degradazione della lignina²⁰. Questa classe di microrganismi presenta alcune 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 rappresentata da altri microrganismi;
- adattano 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 formano la 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 per ottenere un prodotto utile attraverso un complesso di enzimi idrolitici. Lo scopo della degradazione della lignina da parte dei funghi “white-rot” è di consentire un accesso migliore alle componenti di cellulosa ed emicellulosa che costituiscono la fonte di nutrienti per il microrganismo.

1.2.2 Caratteristiche di classi enzimatiche prodotte da *Pleurotus ostreatus*

Il fungo è un attivo degradatore di lignina e saprofito, ovvero capace di crescere e vivere a spese di materiale lignocellulosico proveniente da alcune porzioni vegetali di scarti agroalimentari. La difficile biodegradabilità della lignina rispetto alla maggior parte delle altre 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 dovendo 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 invece nel caso di cellulosa ed emicellulose) i costituenti macromolecolari del materiale lignocellulosico. Le piccole molecole solubili secrete, vengono poi assorbite dalle stesse ife e utilizzate come nutrienti. La demolizione della lignina è come già accennato piuttosto complicata, e vari enzimi e meccanismi chimici devono cooperare per la completa degradazione e solubilizzazione di questa sostanza.

Il sistema enzimatico usato dai microrganismi per decomporre composti organici è di tipo ossidativo²¹. Gli enzimi esocellulari caratteristici del *Pleurotus ostreatus* sono polifenolossidasi, considerati soprattutto in riferimento alla degradazione della lignina. Questi enzimi sono responsabili dell'attacco primario a composti lignocellulosici, preparando migliori condizioni (monomeri fenolici e cellulosa resa disponibile) per la crescita del microrganismo.

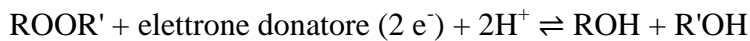
Laccasi

È un cuproenzima contenente ioni rame (di solito quattro) necessari alla sua attività capace di catalizzare 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, i quali possono subire ulteriori processi di ossidoriduzioni non enzimatiche o accoppiare con altre strutture fenoliche. La capacità della laccasi di ossidare le ammine aromatiche è potenzialmente molto interessante per il trattamento delle acque reflue di colorifici, industrie della carta e processi di

decolorazione dei tessuti, e prodotti chimici da molecole costituenti la lignina. Infatti, moltissimi coloranti sintetici derivano da ammine aromatiche diazotate, oltre che da composti fenolici, anch'essi spesso substrati delle laccasi²².

Perossidasi

Si definisce perossidasi una grande famiglia di enzimi che catalizzano una reazione nella forma:



Secondo la classificazione EC, costituiscono una sotto-sottoclasse delle ossido-reduttasi. In particolare in *P. ostreatus* è caratteristica la produzione di Lignina Perossidasi (LiP). Si tratta di una perossidasi contenente un gruppo ferro-eme, specializzato nell'ossidazione (a spese del perossido d'idrogeno) della lignina. L'enzima rompe i legami C-C della catena laterale della lignina e catalizza altre reazioni di ossidazione durante la degradazione della lignina. A differenza delle laccasi questi enzimi possono attaccare le strutture non fenoliche della lignina, le quali dopo idrolisi generano strutture fenoliche ossidabili dalle laccasi. Funghi "white-rot" in particolare *Pleurotus spp*, mostrano una interessante capacità di produzione di ligninasi che vengono secreti dalle ife del micelio.

Insieme al sistema enzimatico per la degradazione della componente di lignina, *P. ostreatus* possiede un ulteriore complesso enzimatico capace di idrolizzare i composti polisaccaridici della matrice vegetale al fine di rendere disponibili porzioni strutture molecolari utili al nutrimento del microrganismo²³.

Cellulasi

Sono un complesso enzimatico 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 la porzione centrale della catena polisaccaridica;
- 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, produzione di fine chemicals e combustibili²³.

Xilanasi

Lo xilano si trova nella parete secondaria delle cellule vegetali e forma una sorta di interfase tra la lignina e altri polisaccaridi; costituisce il composto polisaccaridico non celluloso più importante dell'emicellulosa. La catena principale è composta da residui di xilosio uniti da legami glicosidici β -1,4 con catene laterali di varia natura. Le xilanasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi di legami glicosidici tra 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 carta²⁴.

Pectinasi²⁵

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:

- 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 pectiniasi (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. Degradano sia le pectine esterificate che quelle non esterificate.

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 nella matrice vegetale può raggiungere fino al 2,5% (p/p) della parete vegetale. Dunque risulta crescente l'interesse verso enzimi coinvolti nella loro degradazione. Gli acidi cinnamici sono rilasciati dai polisaccaridi vegetali tramite cinnamoilesterasi, soprattutto feruloil e p-cumaroil esterasi. Alla categoria delle arilesterasi appartengono enzimi capaci di idrolizzare i legami estere 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 applicazioni potenziali di questi enzimi includono la degradazione completa di materiale vegetale, isolamento di acidi fenolici come produzione di sostanze "fine chemicals" da scarti agroalimentari e valutazione e miglioramento delle proprietà sensoriali del vino^{26,27}.

1.3 Fermentazione in stato solido (SSF)

La fermentazione a stato solido (Figura 1.4) è definita come la fermentazione coinvolge solidi in assenza (o quasi assenza) di acqua libera; tuttavia il substrato deve possedere umidità sufficiente a sostenere la crescita e il metabolismo di microrganismi coinvolti nella fermentazione^{28,29}.

La SSF stimola la crescita dei microrganismi in natura su solidi umidi ed è stato il modello che corrisponde all'inizio della tecnica di fermentazione in tempi antichi³⁰. Questo processo offre numerose opportunità nella lavorazione di residui agro-industriali, in parte perché hanno meno esigenze, producono meno acque reflue e quindi riducono il problema dello smaltimento dei rifiuti.

La produzione di mangime arricchito di proteine per il bestiame, è stata l'attività principale che ha comportato l'utilizzo di residui agro-industriali, offrendo così un processo che conferisce un valore aggiunto a questi residui ad basso costo. In realtà, questo è stato uno dei settori che ha generato l'interesse dei ricercatori a livello mondiale sulla SSF. Da allora, sono stati in continuo aumento lo studio e l'utilizzo di questo processo, portando ad un gran numero di brevetti e pubblicazioni sugli aspetti fondamentali della SSF, lo sviluppo di bioreattori (fermentatori), modellazione e produzione di mangimi, vari metaboliti primari e secondari, e bioprocessi^{31,32}.

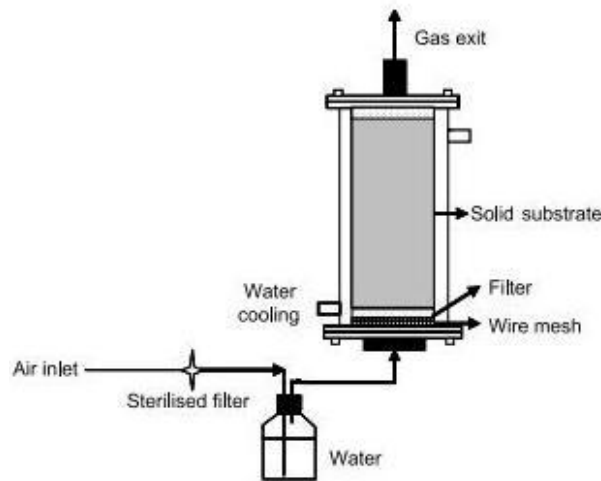


Figura 1.4: Modello di fermentatore in stato solido(SSF)

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. Questo è fondamentale per stabilire un contenuto di acqua ottimizzato e controllare l' a_w del substrato fermentante, poiché l'elevata o modesta disponibilità di acqua influenza negativamente l'attività microbica. Inoltre il contenuto di acqua ha una profonda influenza sulle proprietà fisiche e chimiche 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". Questo supporto include la fase solida e il vuoto interparticellare³³. Il sistema SSF è maggiormente utilizzabile con funghi filamentosi, capaci 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. In numerosi 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 di Petri, colonne in vetro, pirex e bottiglie in vetro. Su scala industriale, il progetto di un reattore adatto a superare l'influenza della temperatura, del trasferimento della massa e dell'estrazione di metaboliti, oltre alla messa a punto di un metodo di aereazione e agitazione del complesso rappresenta attualmente un oggetto di approfondimento dei sistemi di progettazione dei sistemi di fermentatore in stato solido³⁴.

Ci sono diversi aspetti importanti, che devono essere considerati in generale per lo sviluppo di ogni processo in SSF. Questi includono la selezione di opportuni microrganismi e substrati, l'ottimizzazione dei parametri di processo, di isolamento e purificazione del prodotto. Basandosi sull'attività dell'acqua, solo funghi e lieviti sono stati definiti come microrganismi adatti per la SSF. Si pensava che a causa del fabbisogno d'acqua elevato, le colture batteriche potrebbero non essere adatte per questa tipologia di fermentazione, tuttavia, i test hanno dimostrato che le colture batteriche possono essere ben gestite e manipolate per i processi di SSF^{28, 35, 36, 37}. Le rese dei prodotti sono solitamente più elevate in SSF rispetto a SmF. Tuttavia, finora non c'è alcuna scala stabilita o metodo per confrontare le rese di prodotto in SSF e SmF in termini veri. Probabilmente questo effetto è dovuto al fatto che in SSF le colture microbiche sono più vicine al loro habitat naturale e quindi, probabilmente la loro attività è aumentata.

1.3.1 Sistemi di fermentazione a confronto: SmF e SSF

Una parte di produzione enzimatica a livello industriale avviene attraverso l'uso di fermentatori in stato sommerso (SmF). Tuttavia negli ultimi decenni 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 che possono essere utilizzati in applicazioni industriali, all'interno di un sistema controllato per la produzione del metabolita richiesto. Inoltre presenta una serie di vantaggi rispetto al SmF tradizionalmente usato (Figura 1.5).

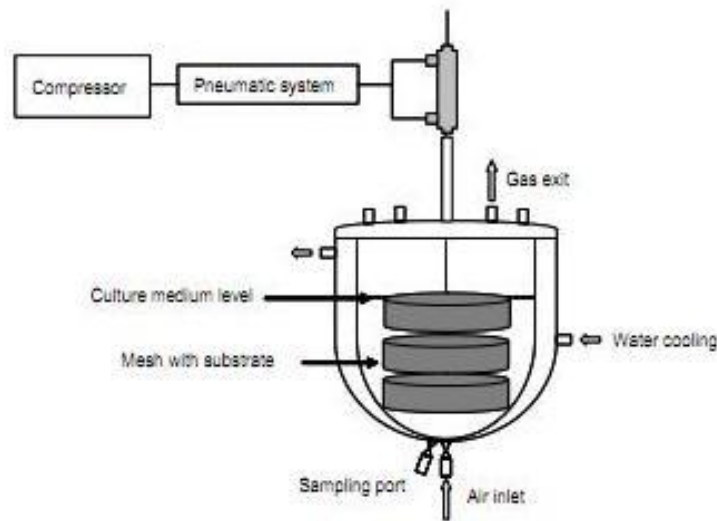


Figura 1.5: Schema di fermentatore sommerso (SmF)

Un confronto diretto tra i due sistemi di fermentazione non è semplice da elaborare considerate le sostanziali differenze di base. Studi sulla produzione enzimatica da parte di funghi filamentosi in SSF hanno mostrato che questo rispetto sistema SmF, fornisce maggiori volumi in termini di produttività, risulta meno sottoposto a problematiche legate all'inibizione da substrato, garantisce un valore di pH maggiormente stabile, inoltre la produzione enzimatica può avvenire a temperature più elevate. Anche il tempo previsto per il processo fermentativo risulta più breve e la degradazione degli enzimi prodotti da parte di proteinasi non desiderate è minimizzata³⁸. Inoltre, il modello SSF ha il vantaggio di essere un processo statico, senza consumo di energia meccanica. Nonostante evidenti miglioramenti rispetto al sistema SmF, numerose ricerche hanno come obiettivo il potenziamento di alcuni aspetti del SSF. Questo è principalmente dovuto ad una serie di problemi riscontrati 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 sono riprodotti su scala industriale, i risultati si presentano piuttosto deludenti, confermando le difficoltà di uno scaling up del modello SSF. Questo può essere attribuito alle condizioni di crescita dei microrganismi, radicalmente differenti, rispetto al sistema su scala

industriale. In scala di laboratorio, condizioni quali la temperatura, l' a_w e il pH possono essere controllate con maggiore facilità e mantenute a livelli di optimum costante. Alcune simulazioni con un impianto SSF pilota, hanno fatto emergere problematiche legate alle basse temperature, al ridotto trasferimento della massa (caratteristica del supporto poroso solido) e alla scarsa agitazione del complesso per 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 naturali³⁹. Inoltre la morfologia dei funghi filamentosi permette 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 in questo modo 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 capaci 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.

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

1.4.1 I cereali

I cereali rappresentano la più diffusa ed economica fonte di apporto energetico, e data la presenza in quantità notevoli 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 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 per l'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, composti non assimilabili dal sistema

digerente dell'uomo. La necessità di eliminare le parti ligno-membranose della cariosside ha dato luogo allo sviluppo di attività industriali in parallelo alla produzione agricola, e che quindi possono essere considerate industrie agricole complementari.

- **Il frumento** o grano è un cereale di elevata importanza tra le risorse alimentari della popolazione mondiale con crescita ubiquitaria, tranne che nelle fasce tropicali. I frutti sono cariossidi e la pianta produce infiorescenze in spighe composte (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).



Figura 1.6: Struttura delle infiorescenze strutturate in spighe del frumento

La struttura anatomica della cariosside di frumento (Figura 1.7) è sostanzialmente simile a quella degli altri cereali: 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%).

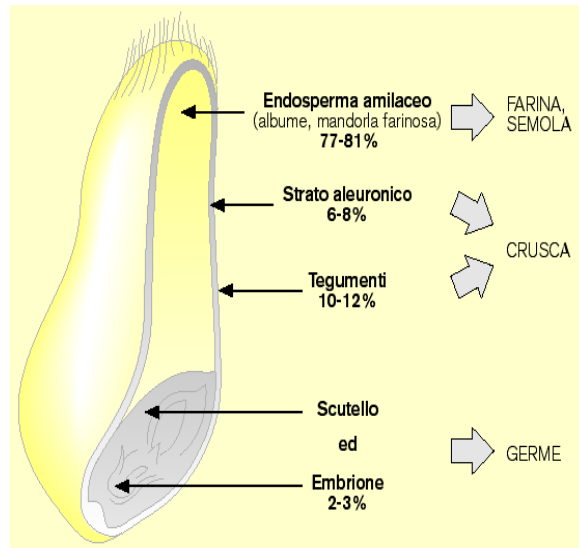


Figura 1.7: Struttura della cariosside in sezione

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 da cui è possibile elaborare delle linee di sviluppo parallele. 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 (Tabella 1.2). 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 paglia⁴⁰

	Composizione (g/kg)
Umidità	76
Sostanza secca (s.s.)	924
Costituenti della sostanza secca (g/kg s.s.)	
Lignina	81,5
Cellulosa	498
Emicellulosa	269
Ceneri	69
Estratto etero	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% (Tabella 1.3). Viene utilizzata innanzitutto nell'alimentazione animale e come fonte di fibra per la nutrizione umana.

Tabella 1.3: Composizione chimica della crusca⁴¹

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

Un altro gruppo di composti molto importanti presenti nella crusca sono i polifenoli. Questi vengono localizzati in prevalenza sulle pareti cellulari degli strati esterni. Una minima parte è rappresentata da lignina⁴², mentre più frequenti sono i fenoli semplici. Alcuni di questi, come i dimeri dell'acido ferulico, influenzano le caratteristiche meccaniche delle pareti e, di conseguenza, anche il comportamento durante la macinazione.

L'acido ferulico (Figura 1.8) è un fenolo della classe degli acidi idrossicinnamici ed è il principale costituente della frazione fenolica delle crusche. E' presente in elevate quantità nelle crusche di frumento e di mais dove può rappresentare sino al 4 % del peso secco della matrice vegetale⁴³.

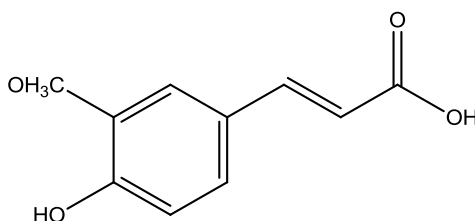


Figura 1.8:Acido ferulico

Tabella 1.4: Composizione della crusca in termini di carboidrati, lignina e acidi cinnamici

Monosaccaridi	glucosio	41-44 % (20% cellulosa, 80% amido)
	xilosio	13-17 %
	arabinosio	3-4 %
	galattosio	2-3 %
Lignina		3-4 %
Acidi cinnamici	acido ferulico	0,4-0,5 %
	acido <i>p</i> -cumarico	0,014 %

In Tabella 1.4 viene riportata la composizione della crusca di grano in termini di carboidrati, lignina e acidi cinnamici. Diversi studi hanno recentemente dimostrato gli effetti positivi sulla salute umana dell'acido ferulico, così come di molti altri biofenoli. Oltre ad un elevato potere antiossidante legato alle caratteristiche di scavenging di questa molecola nei confronti dei radicali liberi, evidenziata anche in sistemi biologici⁴⁴, l'acido ferulico ha mostrato attività inibitorie nei confronti di diverse specie microbiche⁴⁵ tra cui diversi ceppi di *Listeria monocytogenes*, un batterio patogeno capace di crescere su derrate alimentari ed un'ottima capacità di filtro nei confronti dell'irraggiamento UV⁴⁶

sulla cute. Ampiamente studiati sono gli effetti antinfiammatori⁴⁷, di protezione del sistema cardiocircolatorio^{48,49} e di difesa delle cellule neuronali⁵⁰.

-**Il riso** è un cereale originario dall'Asia; le varie specie di questa pianta erbacea sono caratterizzate dalla formazione della pannocchia all'apice del fusto, costituita da spighe uniflore. Il frutto è la cariosside più o meno rotondeggiante, o stretta e allungata, in cui l'endosperma è di colore fondamentale bianco (Figura 1.9). Il riso commerciale è formato dalle cariossidi in piena maturazione, che si separano dalla pianta mietuta con operazioni di trebbiatura. Uno dei sottoprodotti utilizzati in questo lavoro di tesi è la *lolla*, ovvero il cascame derivante dalla sbramatura del riso grezzo dopo la trebbiatura. Ha una consistenza molto resistente, con uno scarso contenuto di nutrienti (circa 4,5%) mentre la cellulosa rappresenta il 45% della massa. Viene impiegata come combustibile in impianti di cogenerazione, spesso all'interno delle stesse riserie, richiedendo però sistemi accuratamente progettati. Il suo utilizzo riguarda anche il settore dell'edilizia poiché la lolla di riso è ricca di ossido di silicio in alte quantità, una componente fondamentale del calcestruzzo.

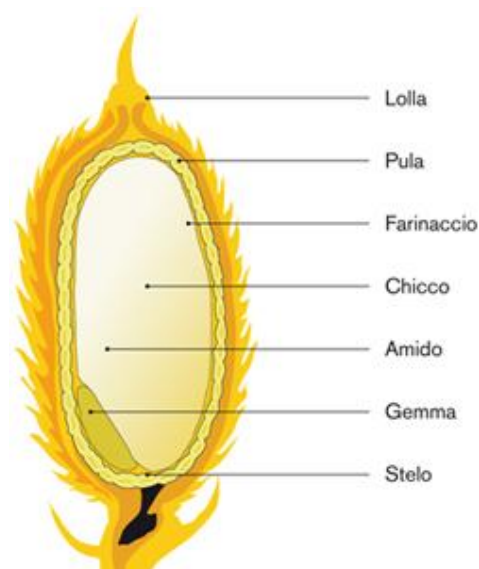


Figura 1.9: Rappresentazione delle componenti di cariosside di riso

1.4.2 Il settore viticolo

La filiera viti-vinicola rappresenta uno dei più importanti settori di produzione agroindustriale. L'uva è il frutto della vite, più precisamente un raggruppamento

di frutti detto grappolo. Questo è composto da un graso ossia lo scheletro che sostiene numerosi acini di piccola dimensione e di colore chiaro o scuro. L'acino (Figura 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 perché contiene la maggior parte delle sostanze che costituiscono la parte liquida dell'acino cioè 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 cui 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 forma di carburante alternativa all'uso di combustibili fossili. All'interno di questa trasformazione anche i grasi dell'uva possono costituire un'importante fonte da cui ricavare questa forma di energia.

Nel seguente lavoro di tesi si sfrutteranno, come scarti provenienti dal settore vitivinicolo, i grasi, ossia le porzioni del grappolo privo di acini. Si tratta di una struttura ramificata e legnosa, composta per la maggior parte di acqua (75-80%), zuccheri ma soprattutto abbondano composti tannici e legnosi⁵¹.

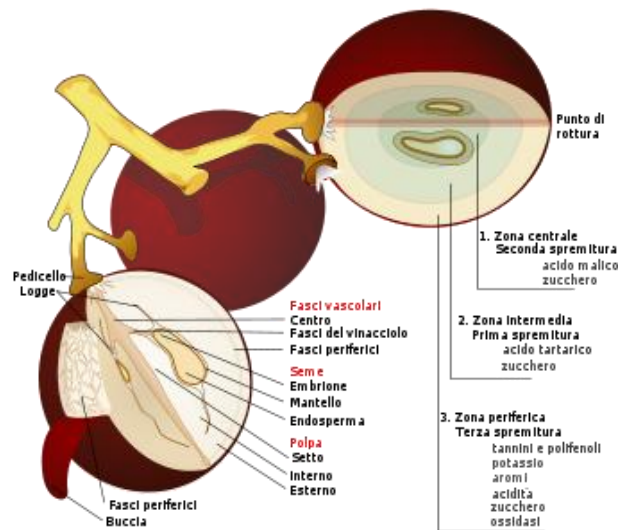


Figura 1.10: Schema in sezione dei componenti dell'acino d'uva

- **Grasi 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% (Tabella 1.5), zuccheri ma soprattutto con abbondanti quantità di composti tannici e legnosi⁵².

Tabella 1.5: Composizione chimica dei graspi d'uva⁵³

	Composizione (g/kg)
Umidità	690
Sostanza secca (s.s.)	310
Costituenti della sostanza secca (g/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. La composizione dei vinaccioli viene riportata in Tabella 1.6.

Tabella 1.6: Composizione chimica dei vinaccioli⁵³

	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	
Oli	150

1.4.2.1 Polifenoli da vinacce di uva rossa

La produzione globale di vino risulta essere di circa 267 milioni di ettolitri, in dettaglio quella dell'Unione Europea è di 155 milioni di ettolitri mentre quella italiana costituisce il 20% di quella mondiale e il 33% di quella Europea⁵⁴ (Tabella 1.7) i cui costi all'ingrosso variano di anno in anno (Tabella 1.8).

Tabella 1.7: Scarti dell'industria vitivinicola a livello nazionale per l'anno 2004⁵⁵

Tipologia	Fattore di produzione (Kg scarto / hL vino)	Quantità (tonn)
Vinacce	18	925.000
Raspi	4	205.700
Solidi e fecce	6	308.600
Reflui della vendemmia	116	6.000.000
Fanghi	1	51.000

Tabella 1.8: Prezzi in €/tonn dei sottoprodotti vitivinicoli per l'annata 2002-2003 nella regione Emilia-Romagna⁵⁶

Sottoprodotti	Minimo	Massimo
Vinaccioli	8,78	13,94
Vinacce	25,82	103,29
Fecce	30,99	309,87

Nell'uva, e quindi nei suoi scarti, sono presenti sostanze polifenoliche per lo più localizzate nelle frazioni solide dell'uva. Poiché la formazione dei polifenoli è

strettamente collegata alle condizioni climatiche, a seconda delle condizioni meteorologiche, il contenuto di biofenoli nell'uva può variare sensibilmente.

Le sostanze polifenoliche delle uve possono essere suddivise in due classi⁵⁷: derivati del flavone e derivati dell'acido gallico o acido protocatechico (Figura 1.11).

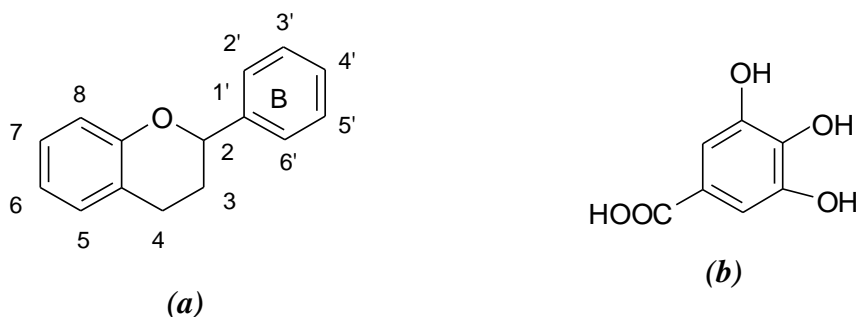


Figura 1.11: Nucleo di flavone (a), acido gallico (b)

I polifenoli gallici sono generalmente costituiti da molecole glucosidiche (es. glucosio) esterificate con acido gallico o con i suoi derivati, ad esempio acido meta-digallico, e sono composti facilmente idrolizzabili per via chimica o enzimatica. Questi glucosidi possono venire idrolizzati dagli acidi a caldo o da enzimi dando origine ad una o più molecole di glucide ed alla molecola polifenolica libera che viene denominata “aglicone” (Figura 1.12) .

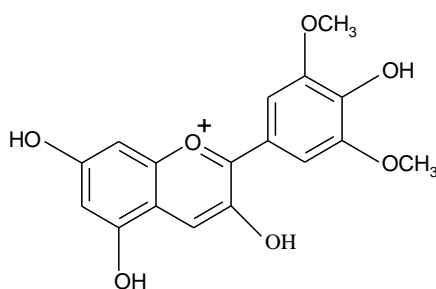


Figura 1.12: Aglicone della Malvina tipico antociano delle bucce d'uva

I polifenoli flavonoidici, invece, sono poli-idrossi derivati del flavone e si differenziano per il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici presenti sul nucleo B, i più comuni sono il kaempferolo, la quercetina e la miricetina⁵⁸.

Nelle uve sono presenti anche derivati polimerizzati del flavano, prodotti di struttura assai complessa che prendono il nome di pro-antocianidine che sono costituite da unità di (+)-catechina e di (-)-epicatechina legate fra loro.

Altri composti polifenoli localizzati prevalentemente nella buccia, sono gli antociani, i coloranti rossi dell'uva. Si dividono in due gruppi, caratterizzati dall'avere o meno una molecola di glucosio legata al gruppo ossidrilico dell'anello centrale: antocianine (con molecola di glucosio) e antocianidine (senza molecola di glucosio).

Un'utilizzazione di notevole interesse per le vinacce rosse è l'estrazione del pigmento antocianico attraverso processi di estrazione che utilizzando anidride solforosa, macerazione e successiva defecazione e concentrazione sotto vuoto a bassa temperatura.

I tannini, presenti soprattutto nei raspi, nelle bucce (quelli ad alto peso molecolare) e nei vinaccioli (quelli a basso peso molecolare), sono antiossidanti e sono raggruppati in due classi: idrolizzabili (polifenoli gallici, tannini che hanno carattere di estere e possono essere idrolizzati per via acida ed enzimatica) e condensati (costituiti da due o più unità flavaniche - catechina, epicatechina, epigallocatechina, gallo catechina - unite fra loro da legami C-C che non sono idrolizzabili). Nelle uve e nei vini sono presenti soprattutto i tannini condensati.

La maggior parte delle sostanze tanniche passano in soluzione nel mosto, nel corso della fermentazione in presenza delle vinacce (bucce ma soprattutto vinaccioli), per la maggior permeabilità delle cellule in ambiente asfittico e per azione solubilizzante dell'alcool favorita dall'aumento di temperatura che accompagna il fenomeno fermentativo. Di norma sono le uve più ricche in sostanze polifenoliche colorate quelle a maggior contenuto in tannini⁵⁹.

1.5 Trattamento delle biomasse

1.5.1 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 urbani⁶⁰.

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 (Figura 1.13).



Figura 1.13: Rappresentazione del ciclo del carbonio

Di grande importanza è la biomassa lignocellulosica residuale che viene bruciata allo scopo di produrre energia termica ed elettrica^{61,62}. La Tabella 1.9 riporta una stima della quantità di energia termica ed elettrica prodotta in Italia nel 2009 da biomasse.

Tabella 1.9: Energia prodotta dalle biomasse in Italia nel 2009 calcolata in kTep (kilo-Tonnellate di petrolio equivalente)⁶³

	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 RSU⁶⁴.

1.5.2 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 (Figura 1.14e Figura 1.15).

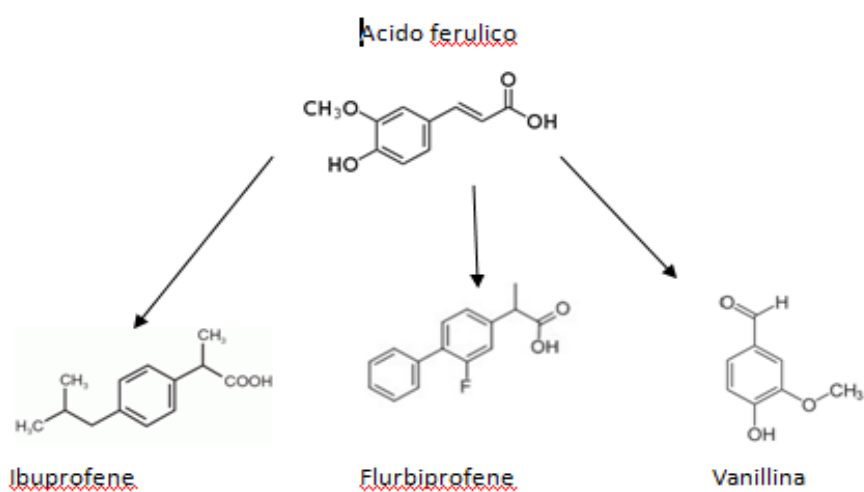


Figura 1.14: Possibili prodotti di sintesi che utilizzano acido ferulico (componente della lignina) come building block

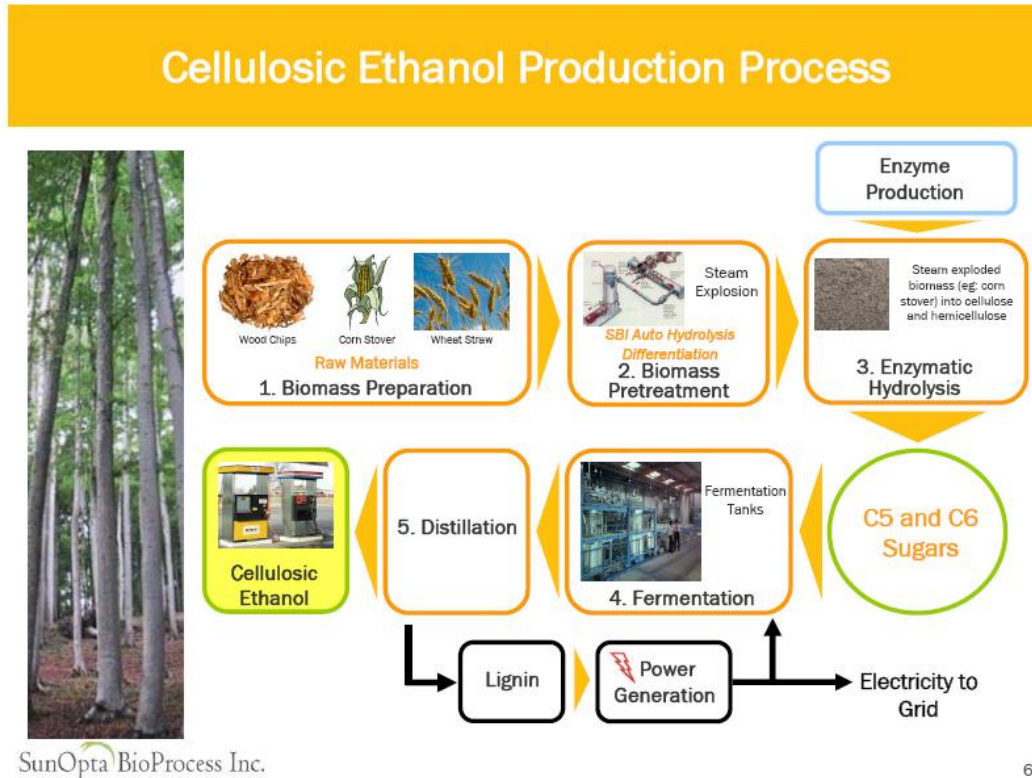


Figura 1.15: Esempio di un processo di recupero di nutrienti da biomasse di scarto

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 idrolisi⁶⁵.

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 combinati⁶⁶. 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.

1.5.3 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.

1.5.4 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 (Figura 1.16 e Figura 1.17).



Figura 1.16: Impianto di Steam Explosion

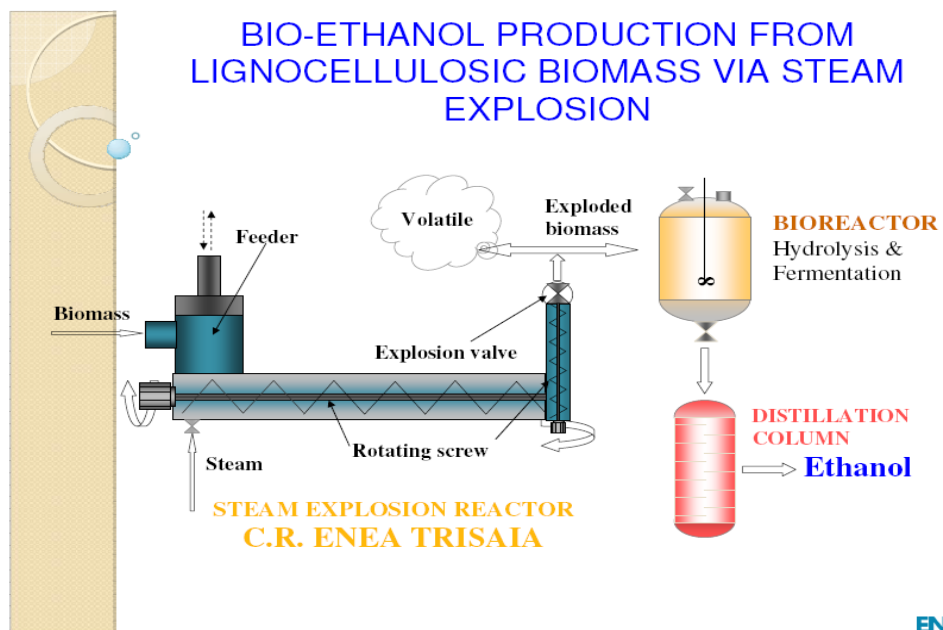


Figura 1.17: Schema di processo di Steam-Explosion

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 1.18).

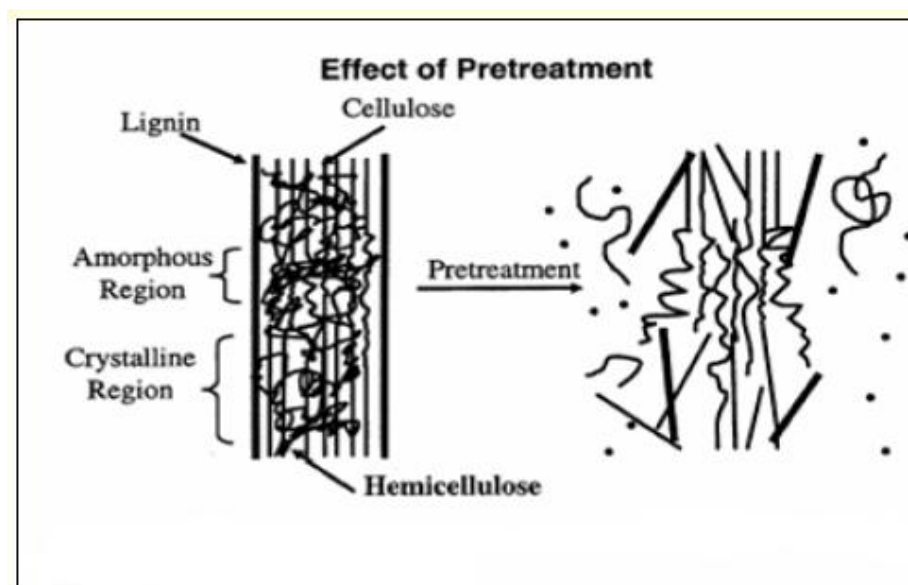


Figura 1.18: Effetto del pretrattamento di Steam-explosion sulla matrice vegetale

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.

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.

- **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.

1.5.5 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.

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.

1.6 Tecniche di concentrazione enzimatica

1.6.1 Liofilizzazione

La liofilizzazione o crioessiccamento è un processo tecnologico che permette l'eliminazione dell'acqua da una sostanza organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della sostanza stessa. Viene principalmente utilizzato su materiali biologici per la conservazione degli alimenti.

Il processo di liofilizzazione rende il prodotto finale liofilo, cioè particolarmente predisposto alla solubilizzazione, ma è soprattutto per le sue caratteristiche di non deterioramento della matrice che lo rendono un ottimo candidato per nostro studio sulla concentrazione e conservazione degli enzimi.

Il metodo comprende fundamentalmente due trasformazioni fisiche: la surgelazione e la sublimazione. Il principio del metodo prevede l'applicazione del calore all'alimento surgelato mantenuto sottovuoto; l'acqua contenuta nel prodotto e segregata sotto forma di ghiaccio, viene estratta direttamente come vapore per sublimazione, poiché si lavora con valori di pressione molto al di sotto di 6,10 mbar (o 4,58 mmHg) che corrisponde al punto triplo (Pt) dell'acqua (Figura 1.19), cioè alle condizioni che consentono la contemporanea presenza dell'acqua nelle tre fasi solido-liquido-vapore. Il vapore acqueo estratto deve essere catturato per congelamento su serpentine fredde dette condensatori (con un termine improprio che sembra riferirsi ad un passaggio da acqua-vapore ad acqua-liquido mentre in realtà è da vapore a solido). Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del prodotto, così che la matrice originale sia quasi perfettamente ripristinabile quando, al momento dell'utilizzo, si voglia procedere alla reidratazione⁶⁷.

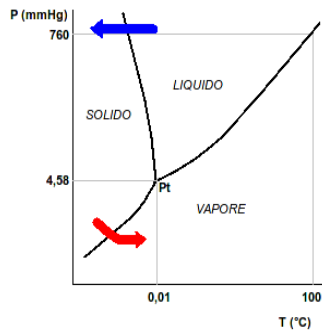


Figura 1.19: Diagramma di fase dell'acqua (P=pressione, T=temperatura). Sono evidenziati i assaggi relativi al congelamento (in blu) e alla sublimazione (in rosso). Le proporzioni sono volutamente alterate per rendere più agevole l'interpretazione.

Figura 1.20: Liofilizzatore da laboratorio

Lo strumento utilizzato in laboratorio (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**), essendo un macchinario creato per piccole quantità di matrice da trattare non prevede alcun sistema riscaldante, ma sfrutta il calore dell'ambiente in cui si trova per donare l'energia necessaria al campione a permettere la sublimazione dell'acqua.

I vantaggi di questa tecnica di conservazione che fanno sì che sia una buona candidata per il nostro scopo sono:

- Conservazione a temperatura ambiente
- Facilità di trasporto del prodotto
- Minime modifiche strutturali
- Rapida e completa reidratabilità
- Odore, sapore, colore vengono abbondantemente rispettati

L'unico svantaggio è il costo particolarmente elevato del processo. Questo deriva dalla quantità di energia necessaria al processo, più che doppia rispetto all'essiccazione⁶⁸.

1.6.2 Spray dryer

Lo spray dryer è il processo industriale (Figura 1.21) più diffuso per la formazione e l'essiccazione di particelle. È ideale per la produzione continua di solidi secchi in polvere, granulato o particelle agglomerate per formare materiale di alimentazione liquido. Il materiale di alimentazione può includere soluzioni,

emulsioni e sospensioni pompabili. Si tratta della tecnologia più indicata quando il prodotto finale deve soddisfare precisi standard qualitativi. In termini di distribuzione granulometrica, umidità residua, densità relativa e morfologia delle particelle.

Il processo inizia con l'atomizzazione di un materiale liquido in una nebulizzazione di gocce. Le gocce vengono quindi a contatto con aria calda in una camera di essiccazione. La nebulizzazione avviene tramite atomizzatori a turbina (girante) o a ugello di diversi tipi. L'evaporazione dell'umidità dalle gocce e la formazione delle particelle secche avviene in condizioni di temperatura e flusso d'aria controllate, mentre la polvere viene continuamente scaricata dalla camera di essiccazione e recuperata dai gas di scarico utilizzando un ciclone o un filtro a maniche. L'intero processo generalmente non richiede più di qualche secondo.

Ogni essiccatore è costituito da:

- una pompa di alimentazione
- un atomizzatore
- un riscaldatore dell'aria
- un dispersore dell'aria
- una camera di essiccazione
- sistemi per il recupero delle polveri
- sistemi per la pulizia dell'aria esausta
- sistemi di controllo di processo



Figura 1.21: Impianti di Spray drying

2 SCOPO

Le biomasse vegetali costituiscono una fonte rilevante di *secondary chemical building blocks* attualmente non pienamente sfruttata. Il recupero delle diverse 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, ecc), 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. 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 stereoselettività, nonché per il loro potenziale come efficienti catalizzatori alternativi per la chimica verde.

Il crescente interesse verso l'utilizzo di enzimi industriali, applicati a processi di valorizzazione chimica ed energetica delle biomasse, richiede lo sviluppo di nuovi sistemi per la produzione di specifiche attività enzimatiche a basso costo. Lo scopo di questo lavoro riguarda la produzione di enzimi lignocellulolitici mediante la crescita in fermentatore in stato solido di *Pleurotus ostreatus* su diversi substrati composti dai sottoprodotti di provenienza agroalimentare del settore cerealicolo e viti-vinicolo.

La matrice lignocellulosica, che caratterizza la struttura vegetale di sottoprodotti agroalimentari, rappresenta un substrato a basso costo adatto per la crescita di funghi "white-rot" tramite un sistema di fermentazione in stato solido (SSF). La SSF ha mostrato negli ultimi anni un crescente interesse per i potenziali vantaggi in termini energetici e di controllo dei parametri di crescita rispetto alla fermentazione in stato sommerso.

Il disegno del bioreattore in laboratorio rappresenta uno step limitante per il processo di fermentazione in stato solido. In questo lavoro si intendono sviluppare diverse tipologie di fermentatori a stato solido:

- Statico: *biocella*, in cui il substrato viene accumulato, inoculato con il fungo, rivoltato periodicamente e umidificato tramite aspersione di acqua in cui gli enzimi vengono recuperati attraverso il prelievo del percolato; *colonna a letto impaccato*, in cui il substrato e l'inoculo vengono impaccati insieme ad un supporto poroso e inerte, in una colonna da cui gli enzimi vengono recuperati tramite immissione periodica di acqua, circolazione del percolato all'interno del sistema mediante pompa peristaltica e successivo prelievo);
- Dinamico: *biocella*, in cui il substrato viene inoculato con il fungo, periodicamente viene effettuata l'estrusione della biomassa, il percolato viene recuperato, si umidifica la biomassa e questa ritorna all'interno della biocella per realizzare un nuovo ciclo fermentativo.

Il fungo *Pleurotus ostreatus* è stato scelto sia per la sua capacità di produrre enzimi esocellulari che per le sue caratteristiche di fungo commestibile, le quali garantiscono sicurezza all'operatore evitando rischi durante la manipolazione e nell'ottica dello scale-up dell'impianto, riducono così i costi di una futura gestione industriale.

Si intende studiare le diverse condizioni operative dei bioreattori per controllando la crescita del corpo fruttifero e con l'intento di evitare la fase sporigena. Il design del bioreattore in stato solido sarà, quindi, sviluppato in modo da garantire sia la crescita del micelio a danni del substrato lignocellulosico che il recupero delle attività enzimatiche esocellulari rilasciate nel percolato.

Le principali attività enzimatiche verranno analizzate nel percolato di fermentazione raccolto, tra cui quelle: carboidrasiche (cellulasica, xilanasica e pectina), fenolossidasiche (laccasica e perossidasiche) e arilesterasiche (feruloiesterasica e caffeoilsterasica).

In seguito alla valutazione dei singoli substrati, verranno studiati anche gli effetti delle miscele di substrati nell'induzione della produzione enzimatica nelle SSF.

Il fungo *Agaricus bisporus*, tipico fungo superiore ampiamente coltivato su scala industriale in quanto commestibile, produce anche un grande quantitativo di sottoprodotti costituiti dal gambo del fungo e delle lettiera di crescita che richiedono significativi costi di smaltimento a carico dell'azienda. Essendo i

funghi superiori dei buoni produttori di enzimi esocellulari, si può immaginare che anche questi scarti possano contenere discrete quantità di enzimi accumulati nella matrice durante la fase fermentativa in stato solido statica. Questi sottoprodotti verranno quindi valutati per determinare la presenza di attività enzimatiche possibilmente recuperabili.

Gli estratti enzimatici ottenuti dalle fermentazioni, verranno utilizzati per determinare la possibilità di degradare un substrato in un processo di idrolisi enzimatica, con l'obiettivo di valorizzare ulteriormente questi sottoprodotti utilizzandogli anche come matrice da cui estrarre diversi composti d'interesse.

Infine, verranno valutati in modo preliminare alcuni processi legati alla concentrazione e conservazione degli enzimi prodotti, tramite la liofilizzazione e lo spray dryer.

3 PARTE SPERIMENTALE

Il sistema di fermentazione in stato solido sta affermandosi come un importante processo 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, su materiale solido in assenza o quasi assenza di flusso libero di acqua. La natura dei materiali solidi usati in SSF può essere classificata in due categorie: inerte (materiali sintetici) e non inerte (materiali organici). Il substrato inerte funge da superficie di attacco per il fungo e da sistema di trattenimento delle porzioni solide, mentre la matrice vegetale costituisce la fonte di nutrienti e supporto di crescita, definita substrato di supporto. L'uso di sottoprodotti agroalimentari come substrato di supporto nei processi di SSF fornisce un percorso alternativo e di valore aggiunto per tali prodotti che altrimenti resterebbero non o sottosviluppati⁶⁹. I processi di SSF possiedono caratteristiche che rendono tale sistema particolarmente adatto per la produzione di enzimi esocellulari di funghi filamentosi, riproducendo le condizioni naturali per lo sviluppo e le attività del microrganismo⁷⁰.

Nello sviluppo del modello SSF, esistono una serie di importanti aspetti da tenere in considerazione per l'ottimizzazione del processo, tra cui un'adeguata selezione dei microrganismi e del substrato di crescita. 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 microrganismo⁷¹.

Un'altra serie di fattori che influenzano la sintesi di enzimi da parte dei microrganismi in un sistema SSF includono: eventuale pretrattamento del substrato per migliorare la biodisponibilità agevolandone il contatto con il microrganismo attraverso il miglioramento dello spazio interparticellare e della superficie disponibile, del contenuto e dell'attività dell'acqua così come il controllo dei parametri operativi quali il valore del pH, l'umidità relativa, la tipologia e la dimensione dell'inoculo e anche i parametri di processo come il controllo della temperatura di fermentazione, il periodo di crescita della coltura, il

mantenimento dell'uniformità nel sistema ambiente del bioreattore SSF e la composizione gassosa dell'atmosfera (tasso di consumo di ossigeno e produzione di CO₂). Tra questi, la dimensione del substrato, il livello di umidità e l'attività dell'acqua sono i punti più critici per la messa a punto del sistema⁷². Generalmente, la riduzione delle dimensioni del substrato forniscono una maggiore area superficiale per l'attacco microbico, rappresentando un notevole vantaggio per la crescita. Tuttavia, parti molto piccole di substrato potrebbero causare la formazione di aggregati solidi, riducendo la diffusione dell'ossigeno causando quindi una crescita microbica 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. Questo parametro necessita quindi di un compromesso nella selezione della dimensione delle particelle basato sulla specificità del processo.

La messa a punto dei parametri ottimali di processo è fondamentale per aumentare le rese di produzione nella fermentazione a stato solido.

3.1 Influenza della matrice vegetale sulla produzione di enzimi in SSF in presenza di *Pleurotus ostreatus*

3.1.1 Sistema a biocella

Su scala di laboratorio è stata utilizzata per la fermentazione in stato solido, una biocella costituita da una bottiglia pirex da 500 ml chiusa con un tappo in cotone per permettere l'ossigenazione del sistema interno (Figura 3.1). Come substrati di crescita per il fungo *Pleurotus ostreatus*, ottenuti da processi agroindustriali sono stati selezionati:

- Paglia di grano (50 g peso secco)
- Lolla di riso (50 g peso secco)
- Graspi d'uva rossa (50 g peso umido; 9,1g peso secco)
- Crusca di grano (50 g peso secco)



Figura 3.1: Fermentatore a stato solido in biocella

Alle matrici vegetali, precedentemente poste all'interno della pirex e sterilizzate in autoclave (120°C per 20 minuti), sono stati aggiunti 7,5 g di inoculo di *P.ostreatus* cresciuto su estratto di malto agarizzato come descritto nel paragrafo 5.2.1.

Per ogni matrice vegetale sono state avviate 3 biocelle aventi durata di fermentazione di 28 giorni, ad una temperatura di 20°C e con schermatura dalle fonti luminose. In ciascuna biocella il recupero del percolato avviene a 3 diverse frequenze di prelievo: ogni 7 giorni, ogni 14 giorni e ogni 28 giorni. 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.

Per ogni prelievo, sotto cappa sterile, viene tolto il tappo in cotone della biocella per l'aggiunta di un volume di acqua distillata sterile sufficiente al recupero dei prodotti di fermentazione sottoforma di percolato ed il substrato viene mescolato al liquido di recupero. Il rimescolamento meccanico provoca la rottura delle ife e l'ossigenazione della matrice. Il percolato viene recuperato tramite una pipetta sterile, centrifugato per eliminare le parti solide in sospensione e analizzato per determinare le attività enzimatiche prodotte.

Per la determinazione delle attività enzimatiche prodotte durante la fermentazione, sono stati utilizzati saggi colorimetrici di semplice e rapida esecuzione, al fine di evitare tecniche più laboriose che prevedono una separazione delle proteine, come l'elettroforesi su gel di poliacrilammide⁷³.

La determinazione dell'attività perossidasi ha presentato valori nulli per tutti i substrati utilizzati.

Per ciascuna matrice vegetale selezionata, il valore endogeno di attività enzimatica, ovvero, l'eventuale attività iniziale presente in ogni biomassa è stata valutata al fine di non interferire nelle rilevazioni dopo il processo fermentativo. Da questa indagine, è risultato che le biomasse non presentano alcuna attività dopo il processo termico (autoclave) che si realizza prima di ogni fermentazione. In questo modo, le attività enzimatiche rilevate dopo le fermentazioni, sono da attribuire soltanto all'azione del fungo *Pleurotus ostreatus*.

L'attività cellulastica è stata determinata sia con il metodo della carta funzionalizzata (cellulastica) sia con il saggio dell'ADNS per la quantificazione degli zuccheri riducenti rilasciati dall'idrolisi della cellulosa (zuccheri riducenti dell'attività cellulastica). Tutti i substrati presentano valori elevati in corrispondenza dell'attività cellulastica determinata con la quantificazione degli zuccheri riducenti con il metodo dell'ADNS rispetto al metodo della carta funzionalizzata in cui il valore rimane pressoché trascurabile in ogni prova. Questa maggiore attività è ragionevolmente legata al tipo di cellulasi prodotta, che sembra agire come esocellulasi piuttosto che come endocellulasi.

Alle frequenze di prelievo stabilite, sono stati raccolti dalle biocelle, volumi di percolato totale non uniformi poiché la quantità di acqua aggiunta per il mescolamento del contenuto della biocella e il successivo prelievo, variavano in base alle caratteristiche della matrice vegetale e alla modalità con cui il micelio si era adattato al substrato di crescita. Le attività enzimatiche dei substrati calcolate per ml, sono quindi state moltiplicate per il volume totale di percolato raccolto per determinare l'attività totale ottenuta dal processo di fermentazione alle diverse frequenze di prelievo, eliminando gli effetti legati al processo di recupero del percolato.

Per determinare il valore complessivo della produzione enzimatica di ciascun sistema a biocella, dopo aver calcolato le attività enzimatiche per il volume totale di percolato raccolto, i valori di ogni intervallo di frequenza sono stati sommati per ottenere il valore cumulativo delle attività prodotte complessivamente nel processo fermentativo alla 4° settimana

-prelievo settimanale : 1, $\Sigma 1+2$, $\Sigma 1+2+3$, $\Sigma 1+2+3+4$

-prelievo ogni 14 giorni : 2, $\Sigma 2+4$

-prelievo ogni 28 giorni : 4

3.1.2 Biocelle con paglia di grano

Nelle Figura 3.2, Figura 3.3, Figura 3.4, vengono riportati i valori delle attività enzimatiche di ciascuna delle 3 biocelle con diverse frequenze di prelievo con *P. ostreatus* cresciuto su paglia di grano, per il volume totale di percolato raccolto e la sommatoria totale delle relative frequenze di prelievo.

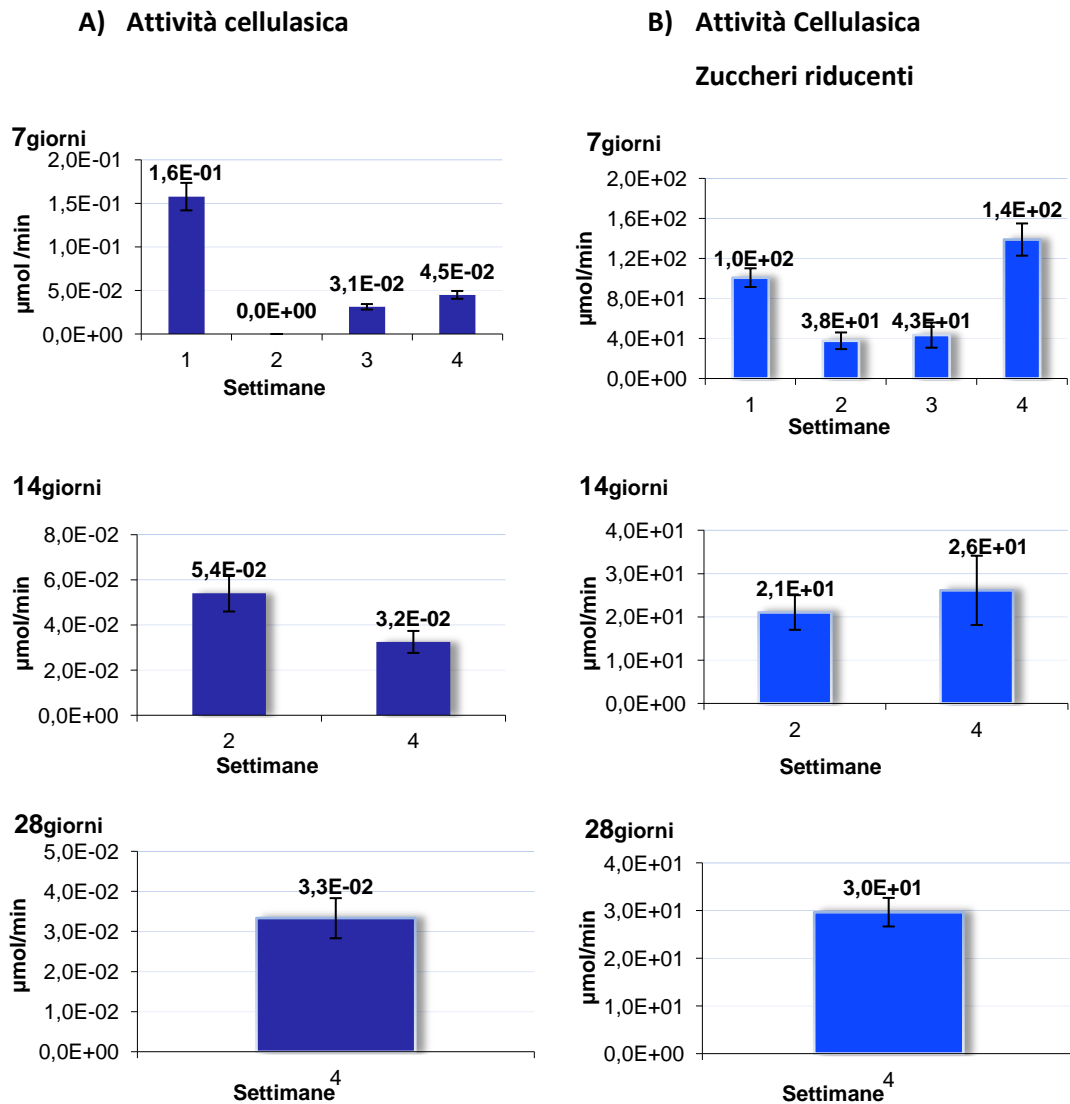


Figura 3.2: (A) Attività cellulasica e (B) Attività cellulasica (zuccheri riducenti) (μmol/min) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della paglia di grano

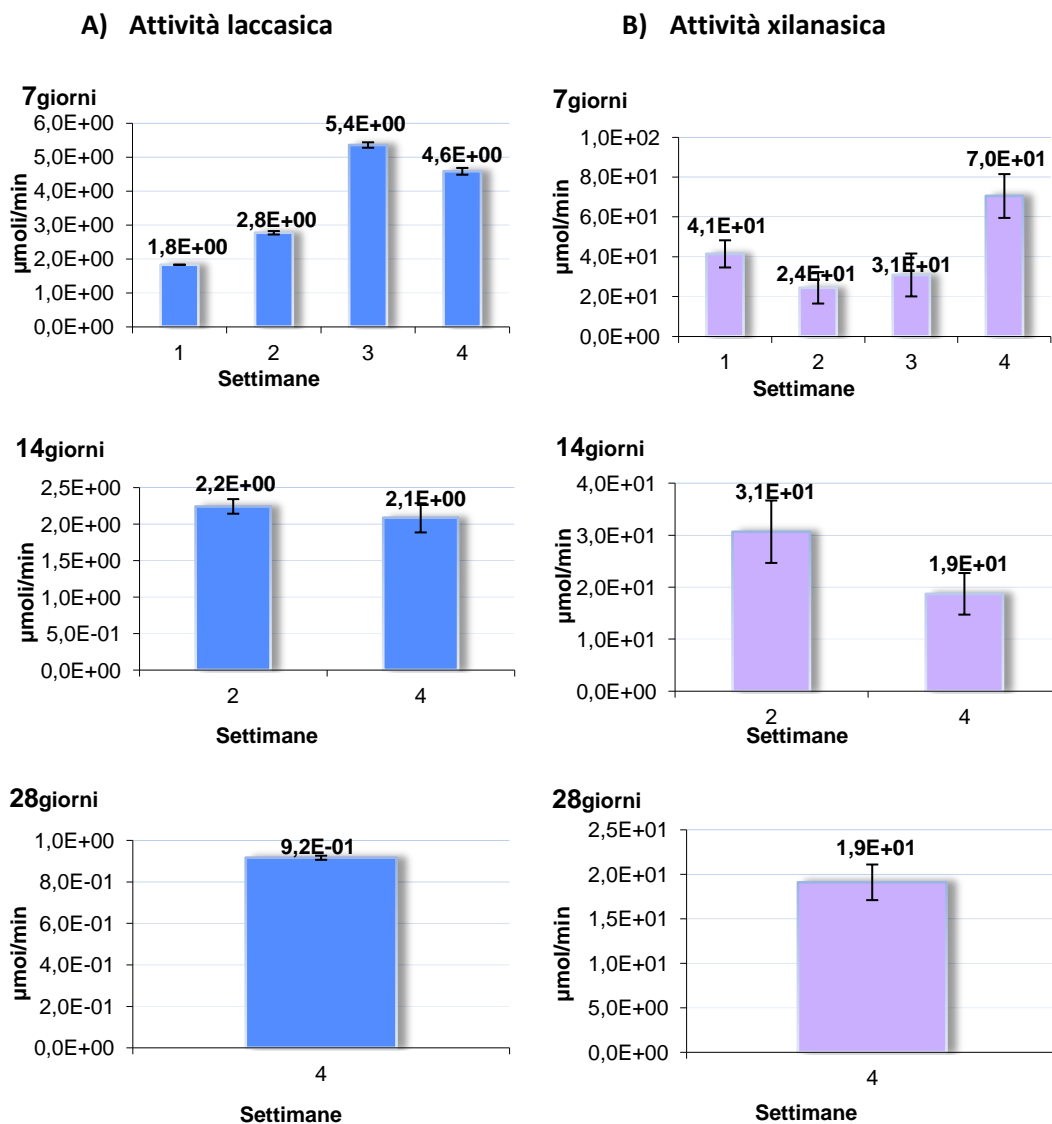


Figura 3.3: (A) Attività laccasica e (B) Attività xilanasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della paglia di grano

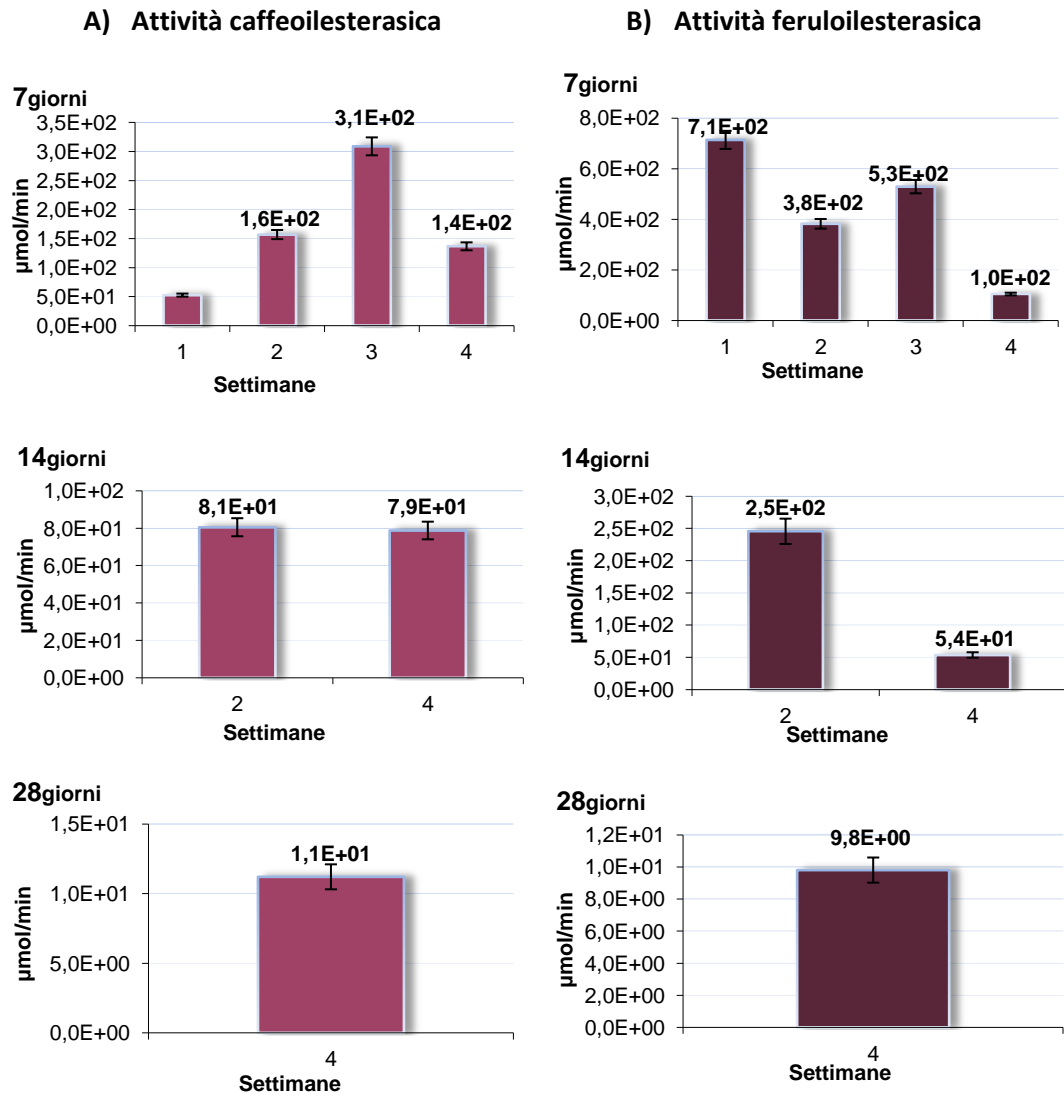


Figura 3.4: (A) Attività caffeoilesterasica e (B) Attività feruloilesterasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della paglia di grano

Tutte le attività enzimatiche presentano una certa variabilità in funzione dei prelievi settimanali, con valori trascurabili per le attività cellulasiche e laccasiche. L'attività cellulastica degli zuccheri riducenti e la xilanasica, come mostrato in Figura 3.2 (B) e Figura 3.3 (B), presentano un'elevata attività nella 1^a settimana di fermentazione seguito da una diminuzione che rimane costante nelle due settimane successive ed infine si osserva un notevole incremento nella produzione enzimatica alla 4^a settimana.

In Figura 3.5 vengono riportate le sommatorie delle attività enzimatiche prodotte ottenute nei 3 diversi intervalli di prelievi (ogni 7, 14 e 28 giorni di fermentazione). Confrontando le sommatorie, si evidenzia un progressivo decremento del valore in tutte le categorie enzimatiche in esame, ovvero, la produzione complessiva delle attività enzimatiche è più elevata nei bioreattori caratterizzati da prelievi più frequenti (ogni 7 giorni) mentre diminuisce riducendo la frequenza dei prelievi.

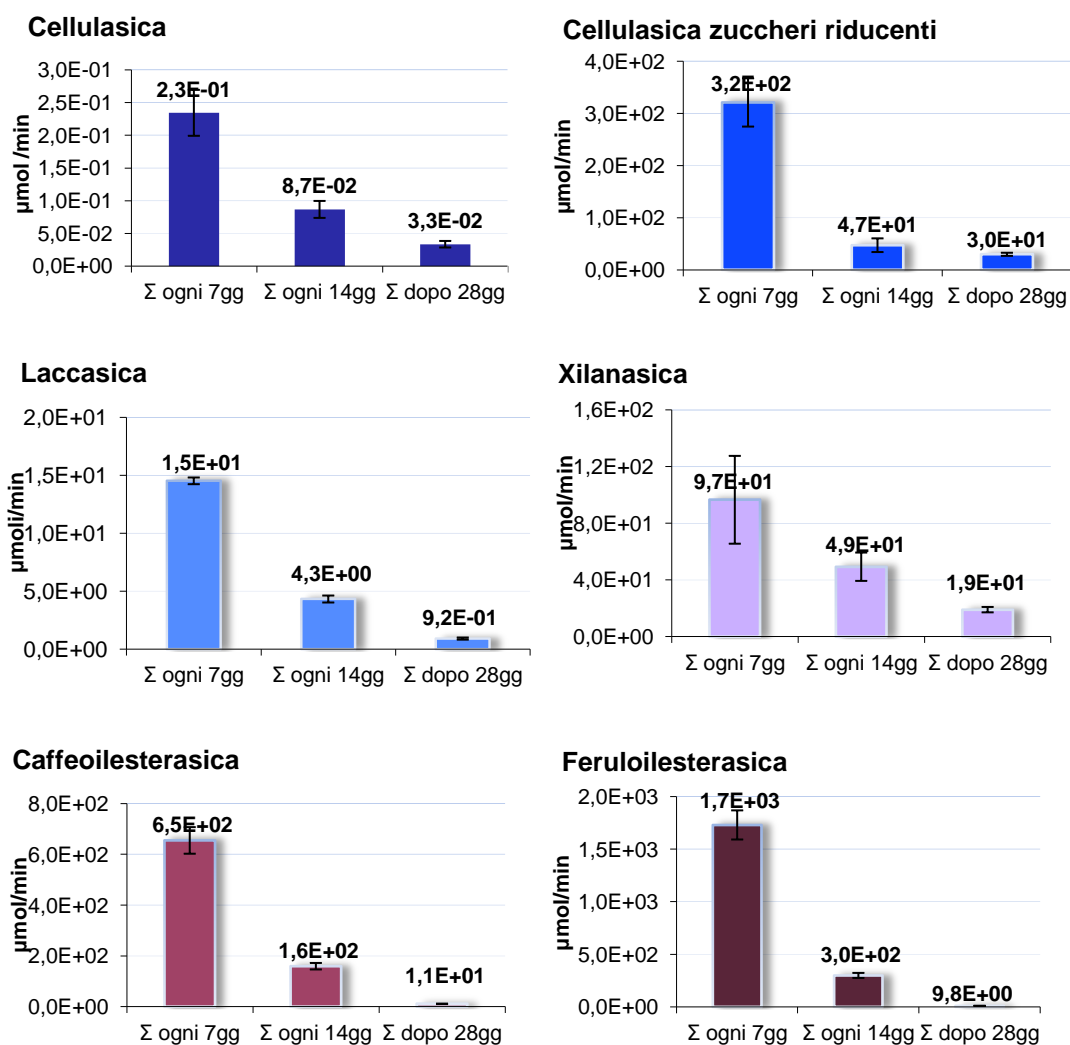


Figura 3.5: Sommatoria delle attività prodotte nella fermentazione della paglia di grano ($\mu\text{mol}/\text{min}$) con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della paglia di grano

3.1.3 Biocelle con lolla di riso

Nelle Figura 3.6, Figura 3.7 e Figura 3.8, vengono mostrate le attività ottenute dal sistema a biocella con lolla di riso, che presentano come riportato per la paglia di grano, andamenti variabili ad eccezione delle attività arilesterasiche (Figura 3.8) che mostrano un decremento progressivo nel procedere del processo fermentativo.

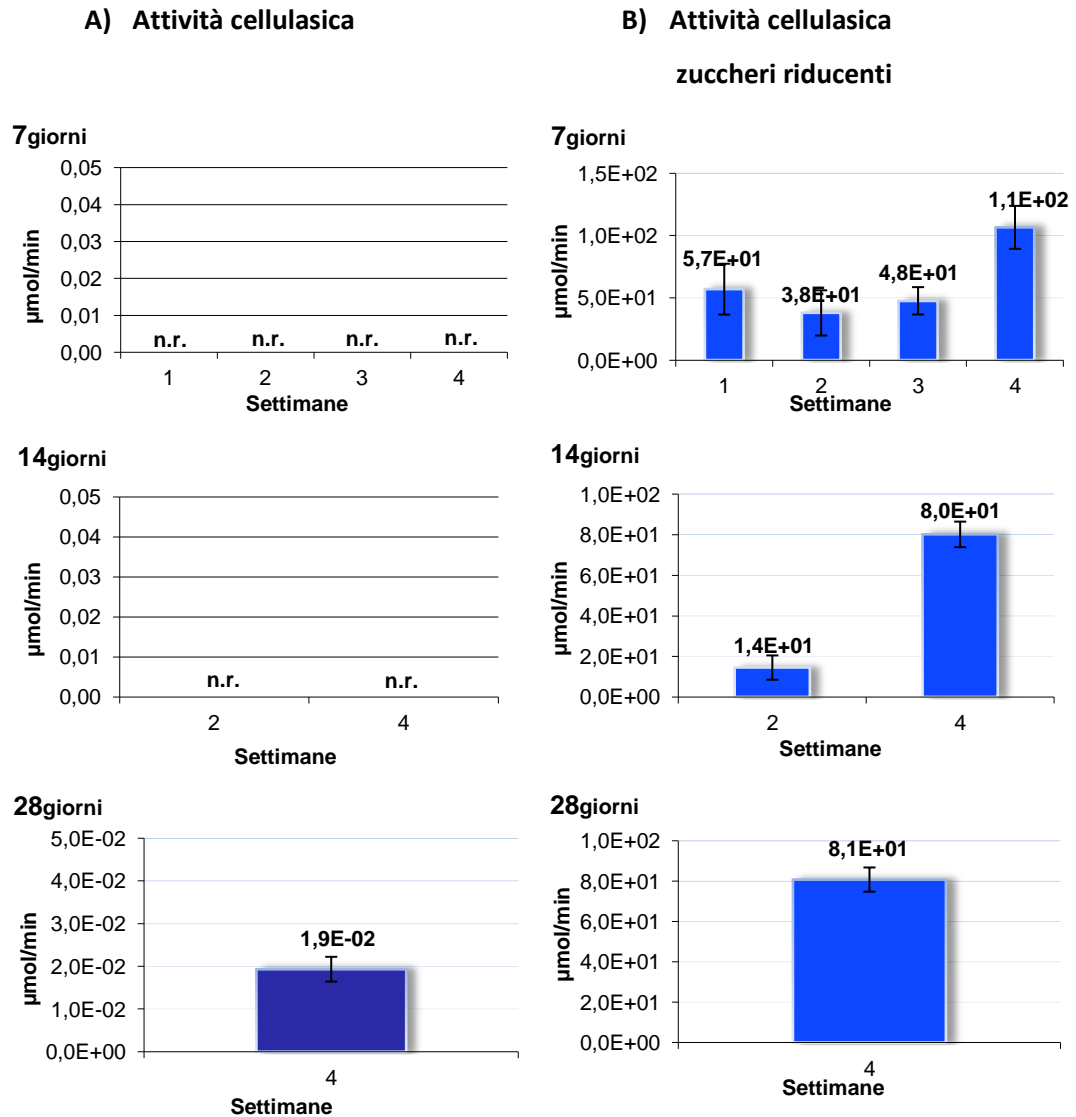


Figura 3.6: (A) Attività cellulase e (B) Zuccheri riducenti (attività cellulase) (µmol/min) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della lolla di riso

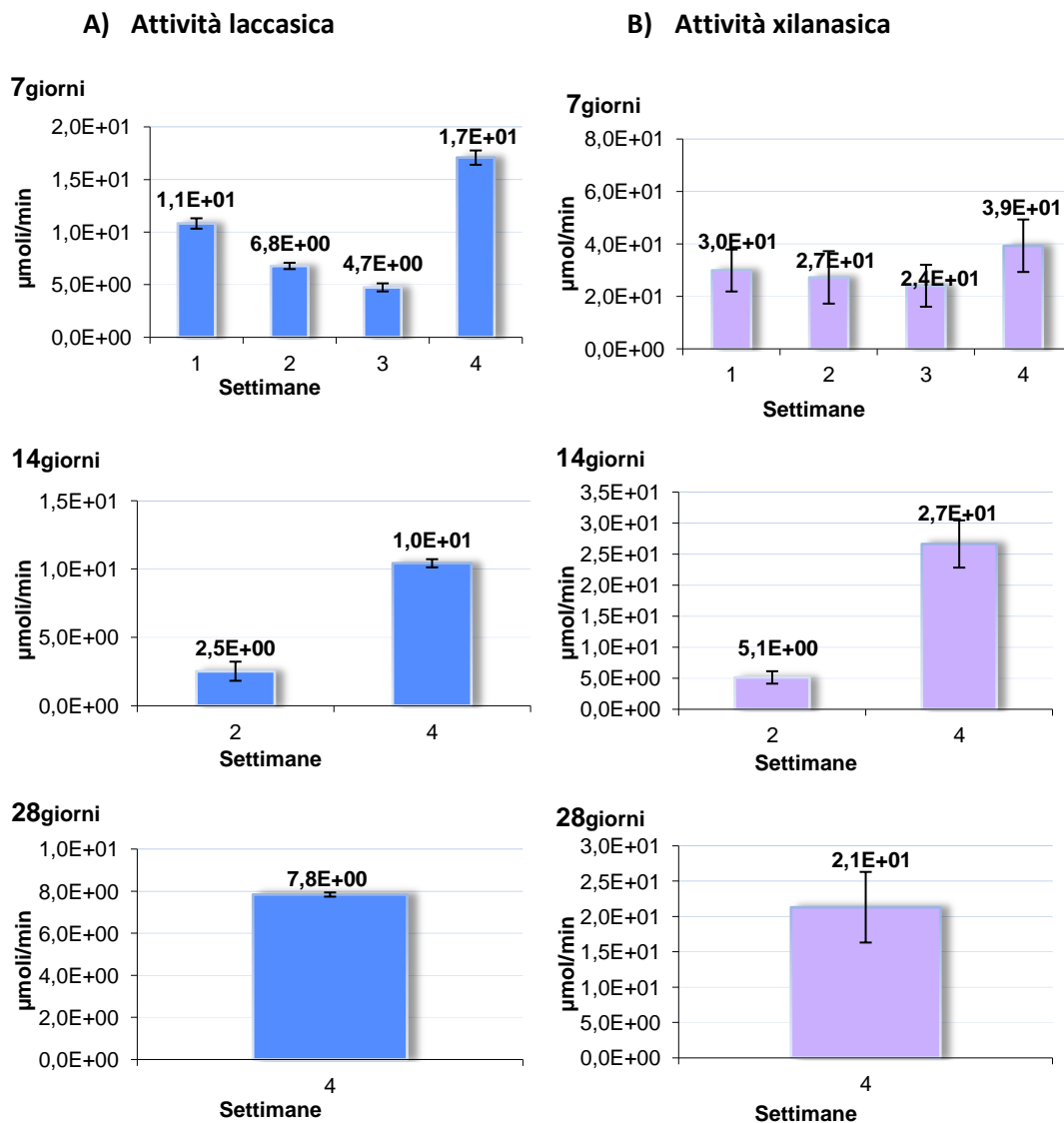


Figura 3.7: Attività laccasica e (B) Attività xilanasica (μmol/min) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della lolla di riso

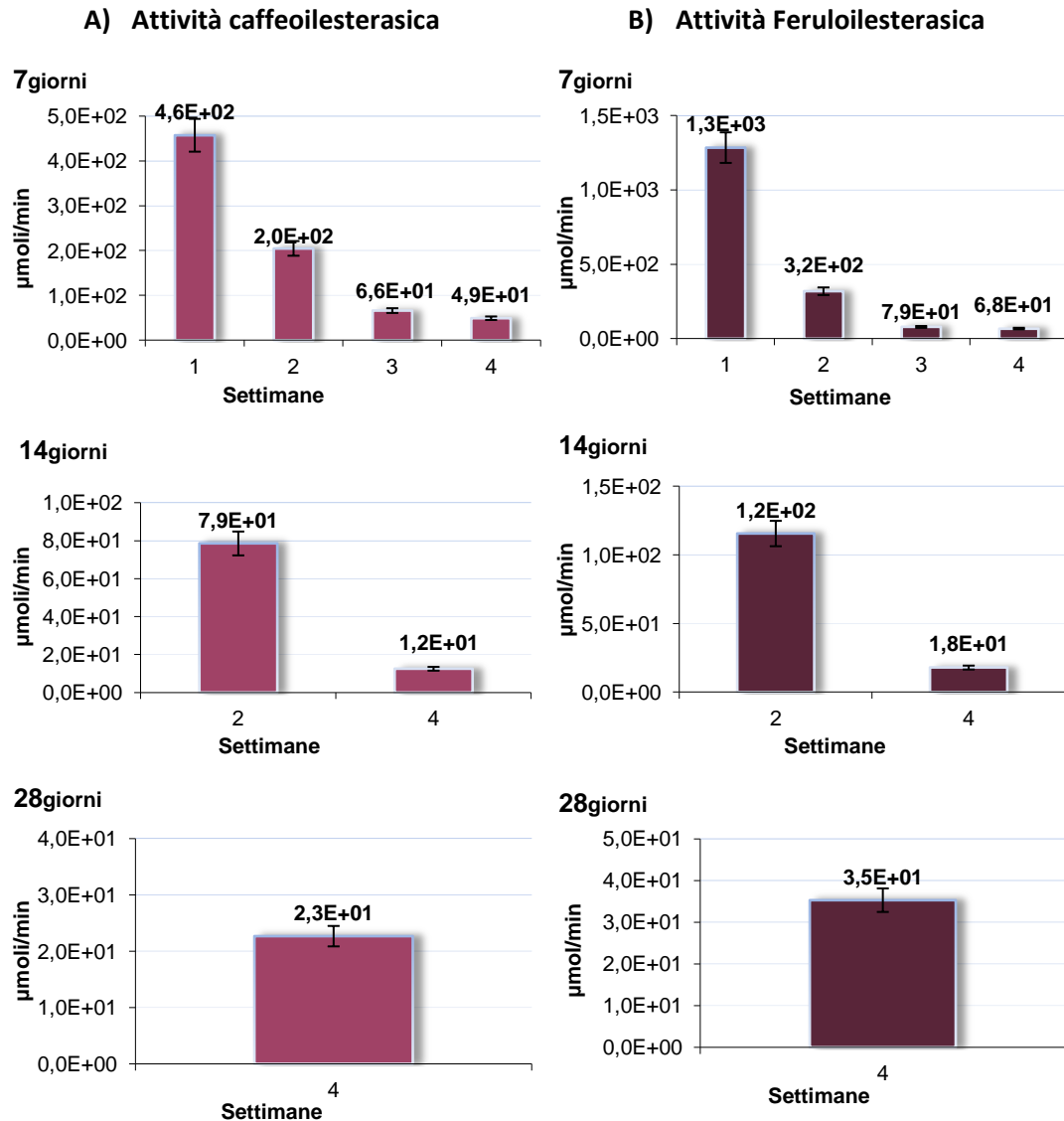


Figura 3.8: (A) Attività caffeoilesterasica e (B) Attività feruloilesterasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della lolla di riso

Nei valori delle attività cellulasiche zuccheri riducenti, laccasica e xilanasica analizzate settimanalmente (Figura 3.6 (B), Figura 3.7 (A) e Figura 3.7 (B) rispettivamente), si evidenzia un incremento della produzione enzimatica alla prima e ultima settimana di prelievo.

Non sono state rilevate attività cellulasiche (Figura 3.6 (A)) con il saggio della carta funzionalizzata, indice che non sono presenti endocellulasi ma bensì esocellulasi una volta che vengono rilevate le attività nel saggio degli zuccheri riducenti (Figura 3.6 (B)).

In Figura 3.9 vengono riportate le sommatorie delle attività enzimatiche prodotte dalla fermentazione della lolla di riso nei diversi intervalli di prelievi. Si osserva che anche in questo caso si ha un decremento del valore in tutte le categorie enzimatiche, tranne nel caso della cellulasica che non ha riportato significative attività enzimatiche.

Inoltre, si evidenzia anche una diminuzione notevole tra i valori ottenuti con i prelievi ogni 7 giorni e quelli con intervalli maggiori. Questo potrebbe essere un indice di una maggiore suscettibilità di questo substrato sulla durata della fermentazione e rimozione del percolato.

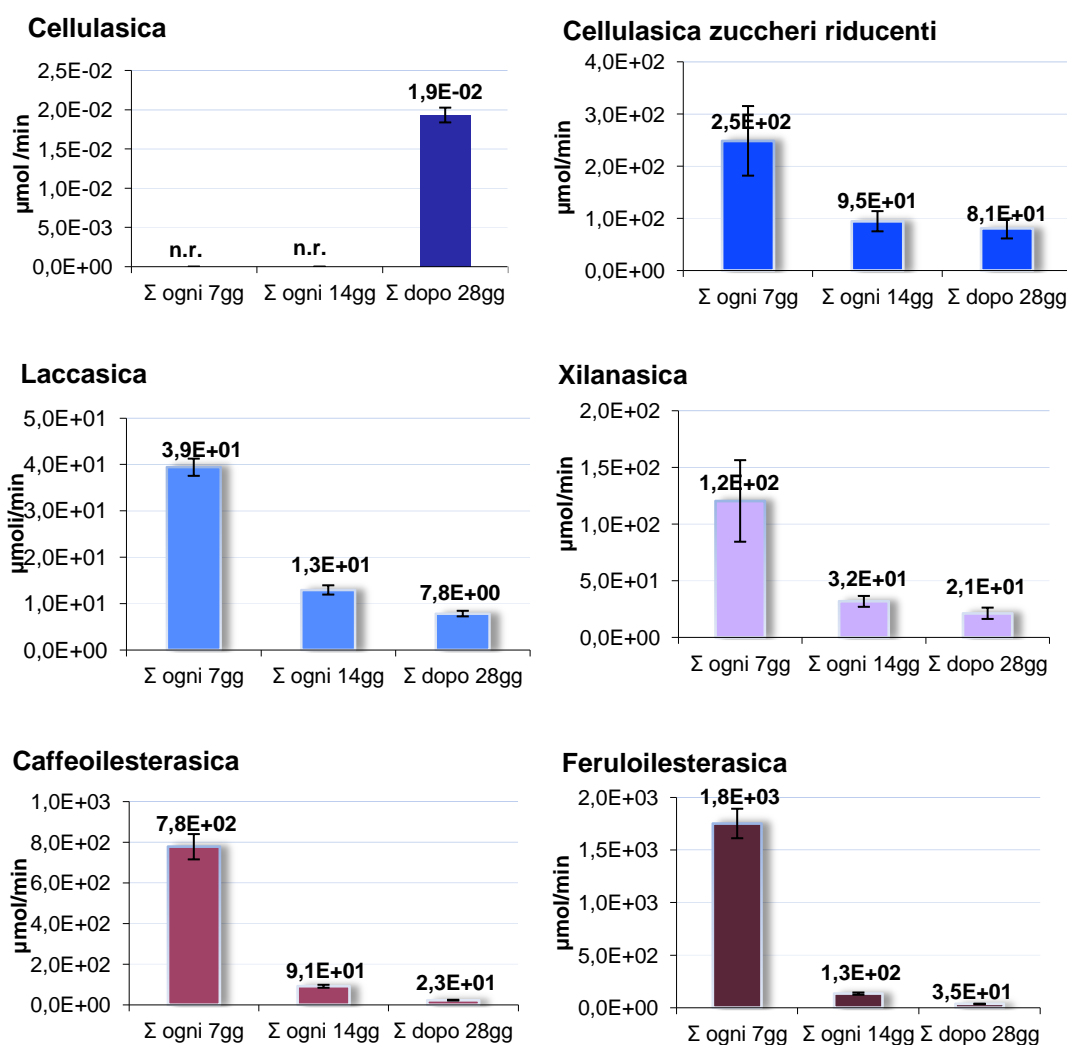


Figura 3.9: Sommatoria delle attività prodotte nella fermentazione della lolla di riso ($\mu\text{mol}/\text{min}$) con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della lolla di riso

Inoltre in Figura 3.9, si evidenzia anche una diminuzione notevole tra i valori ottenuti con i prelievi ogni 7 giorni e quelli con intervalli maggiori. Questo potrebbe essere un indice di una maggiore suscettibilità di questo substrato sulla durata della fermentazione e rimozione del percolato.

3.1.4 Biocelle con graspi d'uva

Da un confronto delle attività delle biocelle con graspi d'uva con diverse frequenze di prelievo si evidenziano valori notevolmente maggiori rispetto alle biocelle con paglia di grano e lolla di riso (Figura 1.13, Figura 1.14 e Figura 1.15).

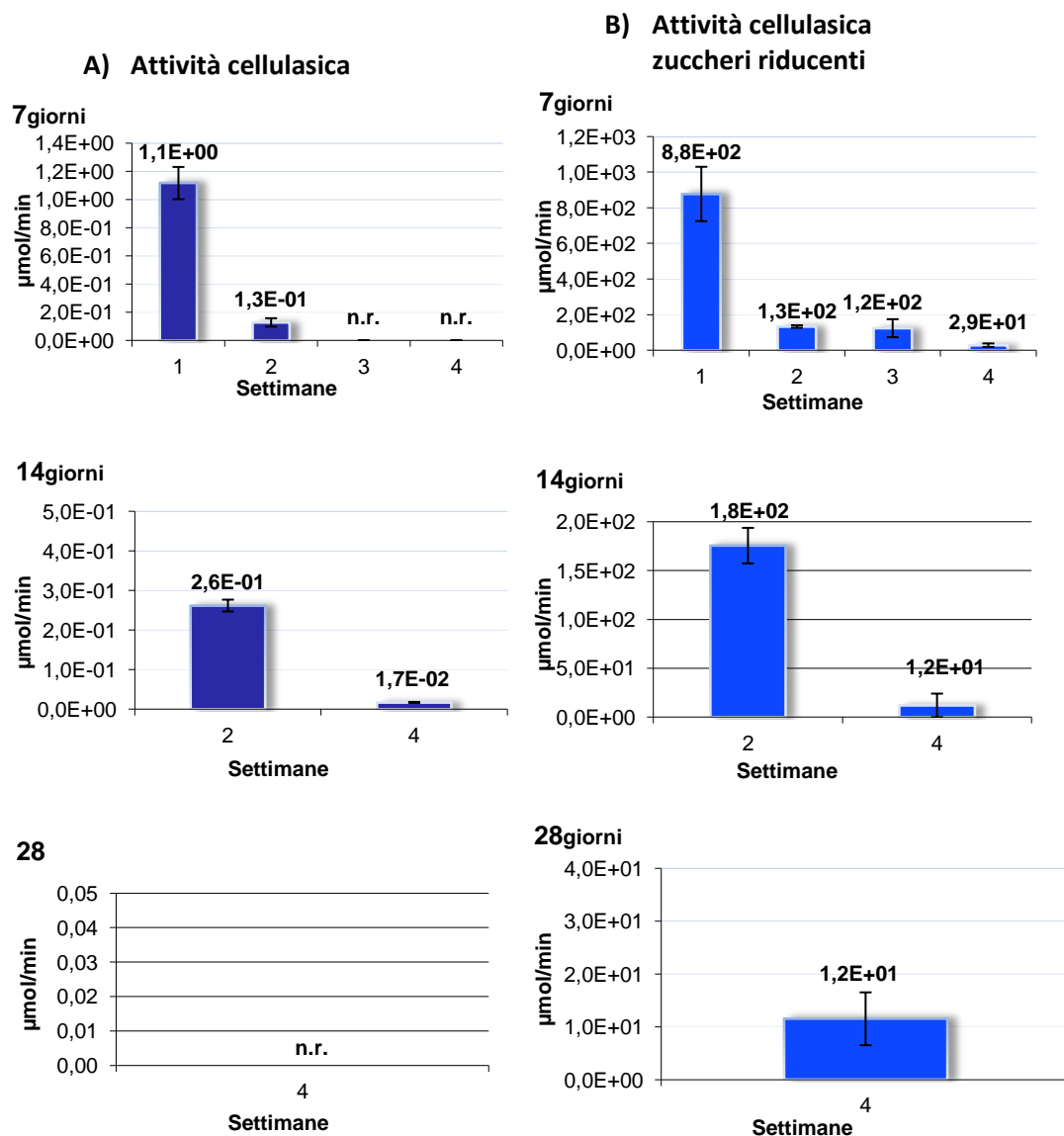


Figura 3.10: (A) Attività cellulasica e (B) Zuccheri riducenti (attività cellulasica) (µmol/min) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione dei graspi d'uva

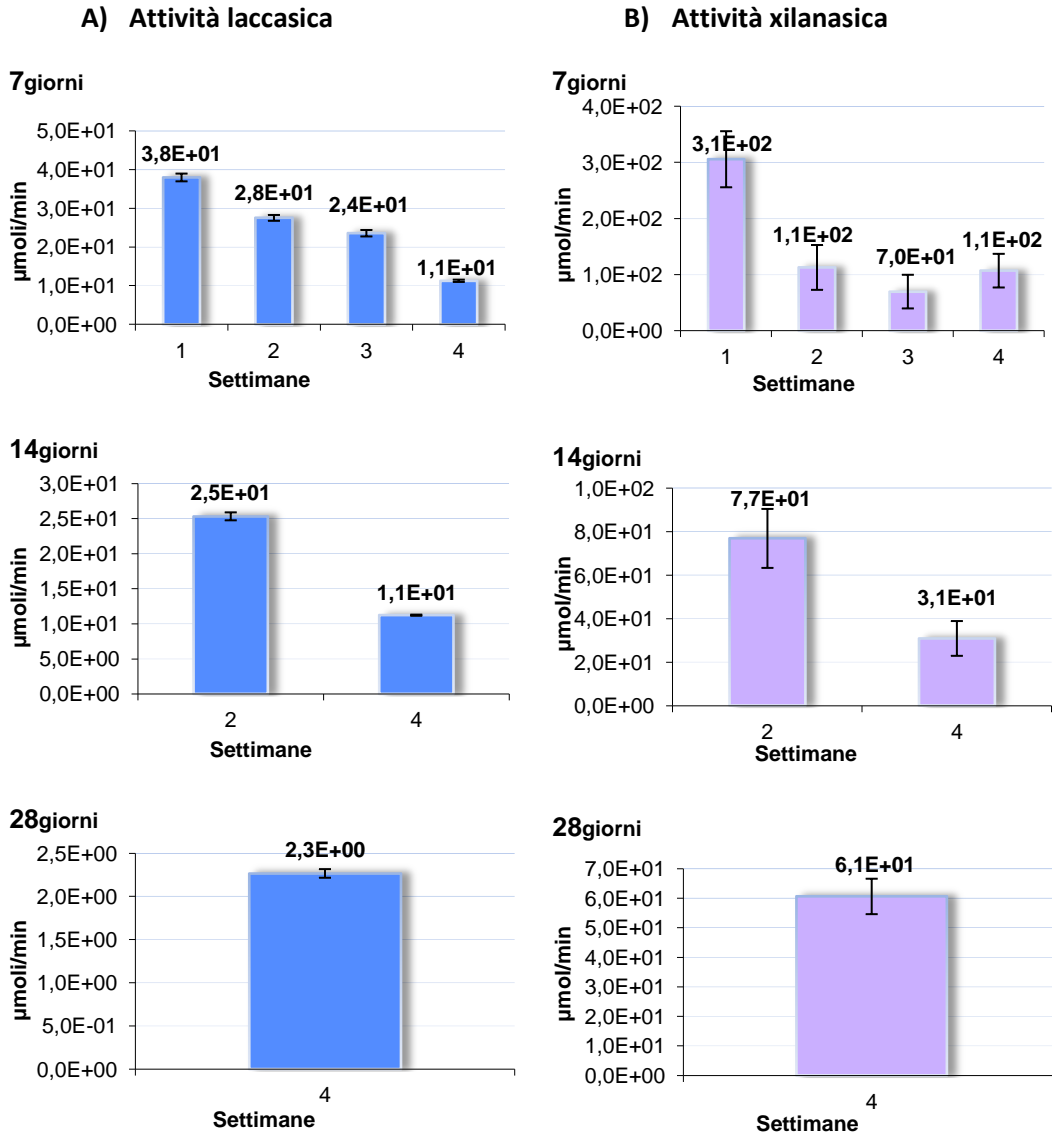


Figura 3.11: (A) Attività laccasica e (B) Attività xilanasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione dei grappi d'uva

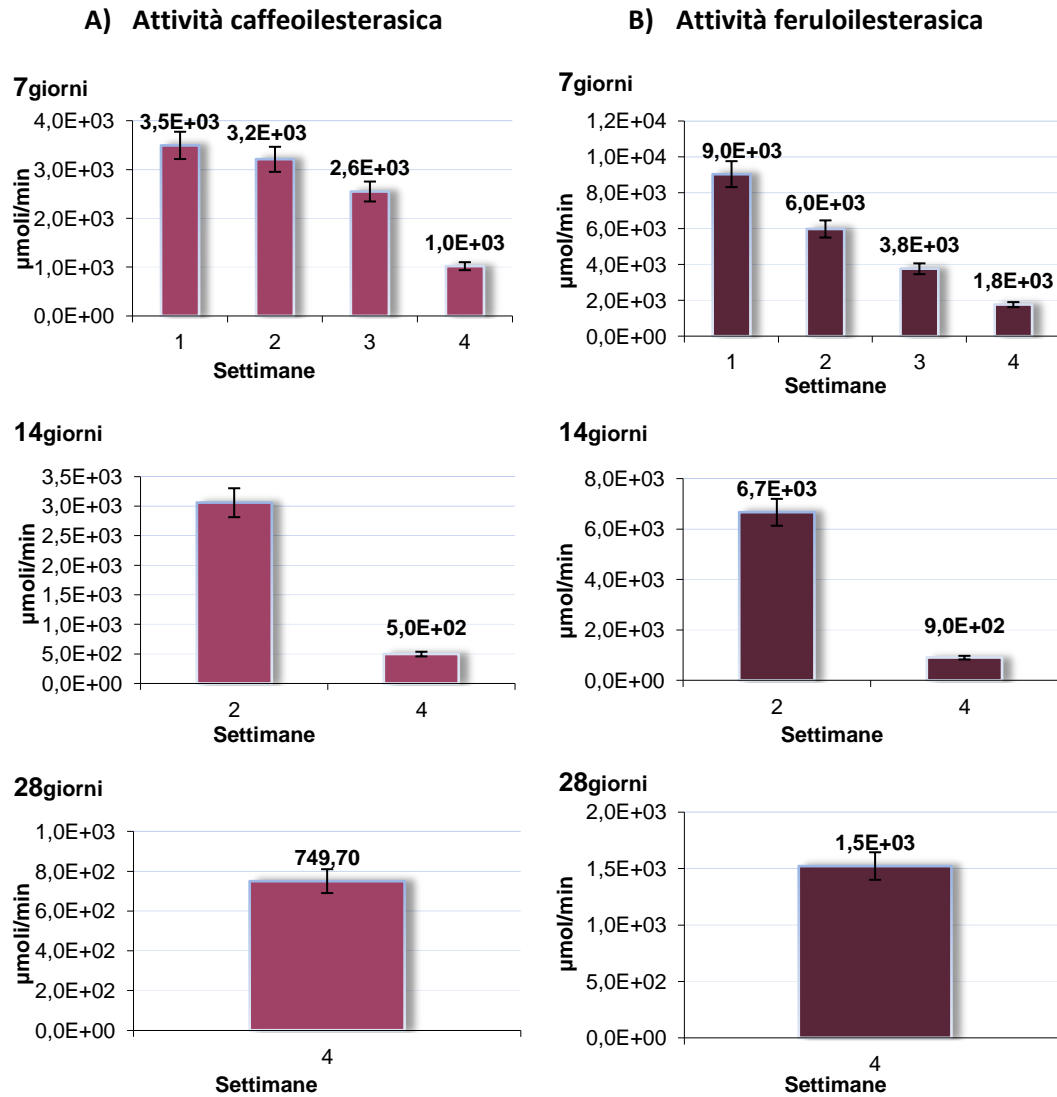


Figura 3.12: (A) Attività caffeoilesterasica e (B) Attività feruloilesterasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione dei grapsi d'uva

Si osserva un'attività limitatamente maggiore in corrispondenza dei valori della cellulastica valutata con il metodo della carta funzionalizzata (Figura 3.10 (B)) a differenza del metodo di quantificazione degli zuccheri riducenti con il saggio dell'ADNS (Figura 3.10 (A)) in cui sia ha un elevato valore alla prima settimana di prelievo e nei successivi, un netto decremento con un valore mantenuto costante anche alla 3° settimana di prelievo.

Ad eccezione della xilanasica, tutte le attività esaminate nella biocella con prelievo settimanale, mostrano un andamento decrescente all'aumentare del

numero settimane in cui il percolato è stato raccolto; inoltre tutti i valori risultano superiori rispetto alle biocelle in cui il percolato è stato raccolto solo alla 4^o settimana.

Ugualmente a quanto è stato riscontrato per la paglia di grano e la lolla di riso, anche con il substrato di grappi d'uva il fungo *Pleurotus ostreatus* rilascia una maggiore produzione enzimatica in concomitanza con i prelievi più frequenti, ovvero settimanalmente (Figura 3.13).

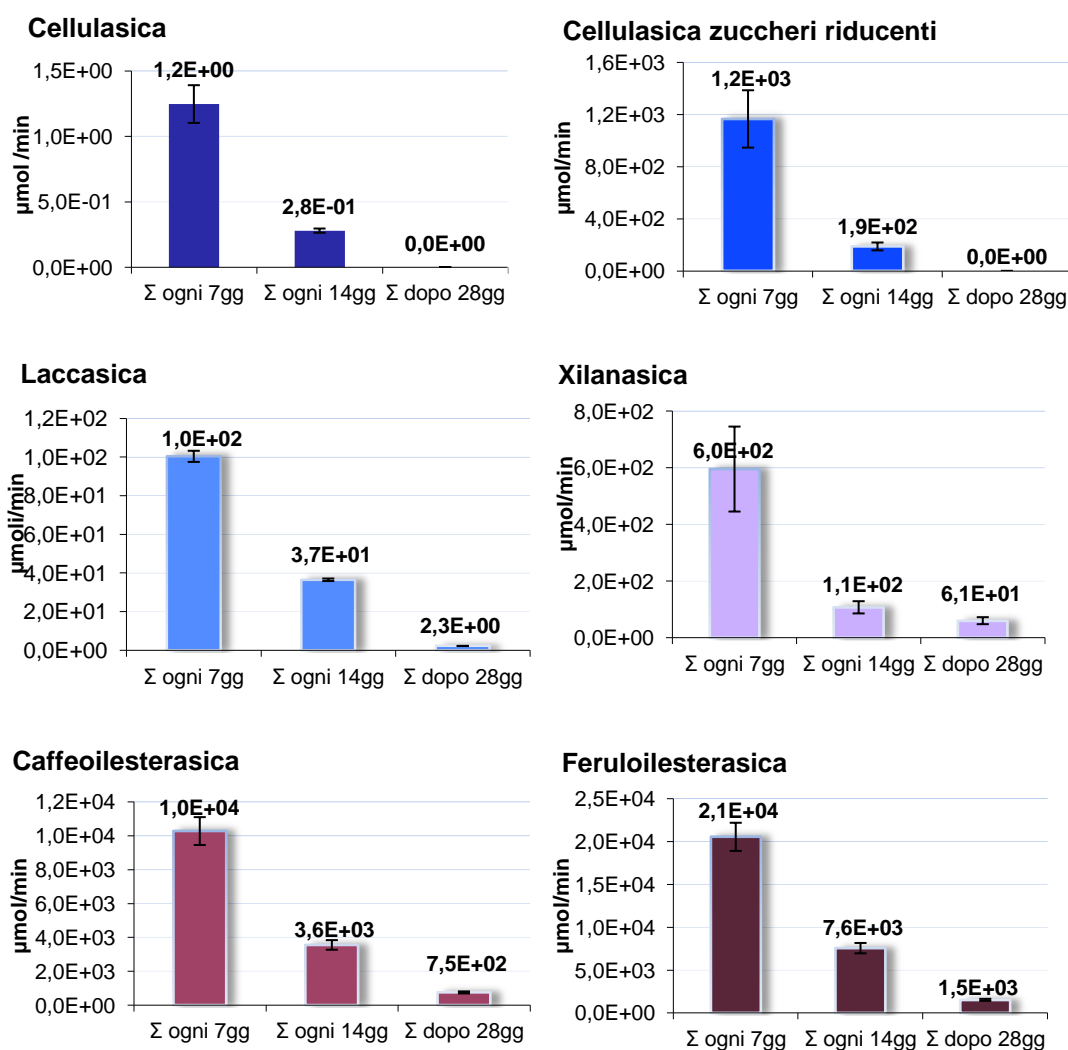


Figura 3.13: Sommatoria delle attività prodotte nella fermentazione dei grappi d'uva ($\mu\text{mol}/\text{min}$) con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione dei grappi d'uva

3.1.5 Biocelle con crusca di grano

Di particolare interesse appaiono i valori dei prodotti di fermentazione della biocella con crusca di grano, in termini di produzione enzimatica totale alla 4^o settimana alle 3 frequenze di prelievo.

Nella biocella con prelievo settimanale, l'attività laccasica, caffeoilsterasica e feruloilsterasica (Figura 3.15 (A), Figura 3.16 (A) e (B) rispettivamente) presentano un valore visibilmente maggiore rispetto agli altri prelievi evidenziando un andamento diverso in rispetto ai substrati fin'ora utilizzati.

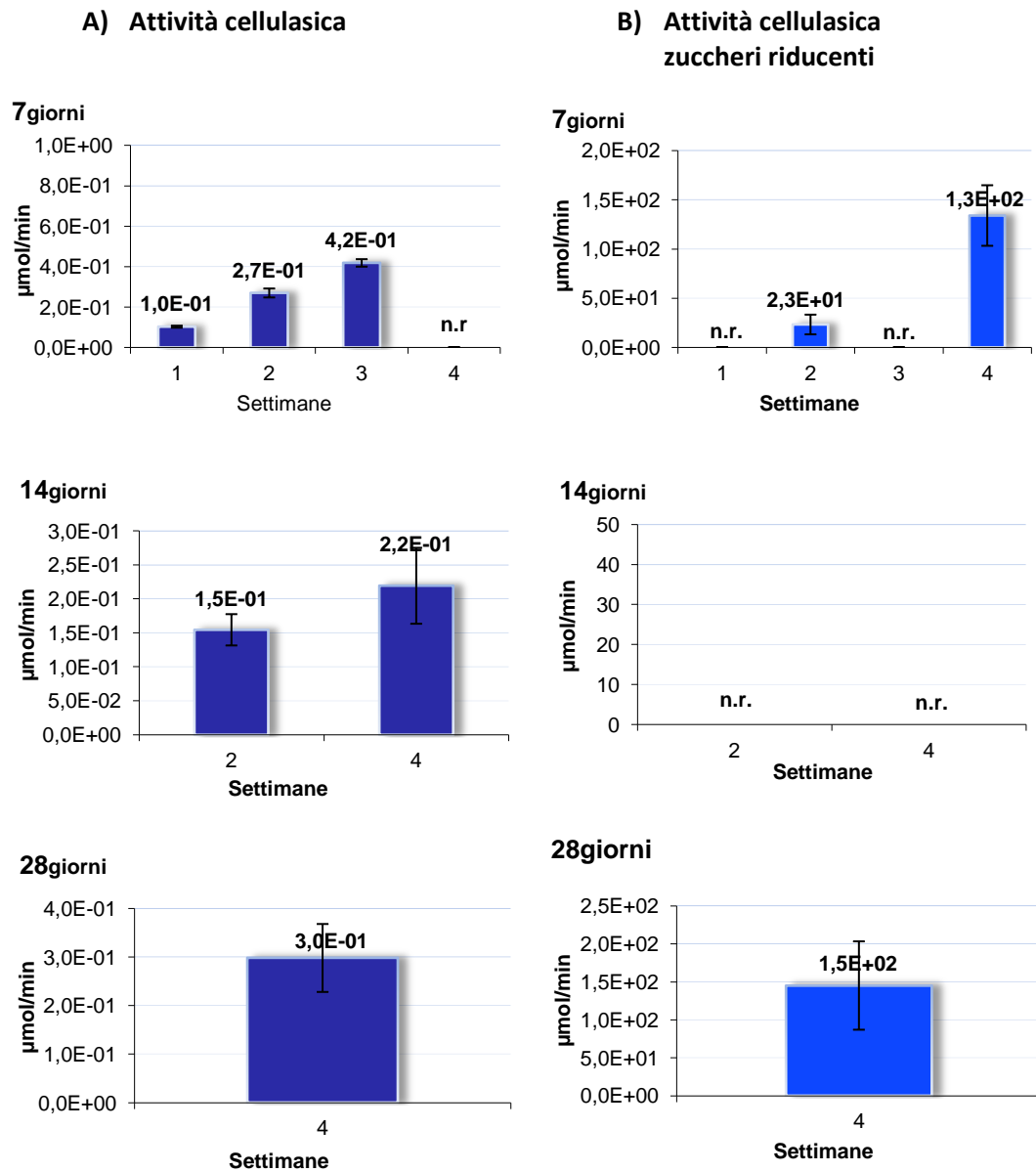


Figura 3.14: (A) Attività cellulasica e (B) Zuccheri riducenti (attività cellulasica) (μmol/min) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della crusca di grano

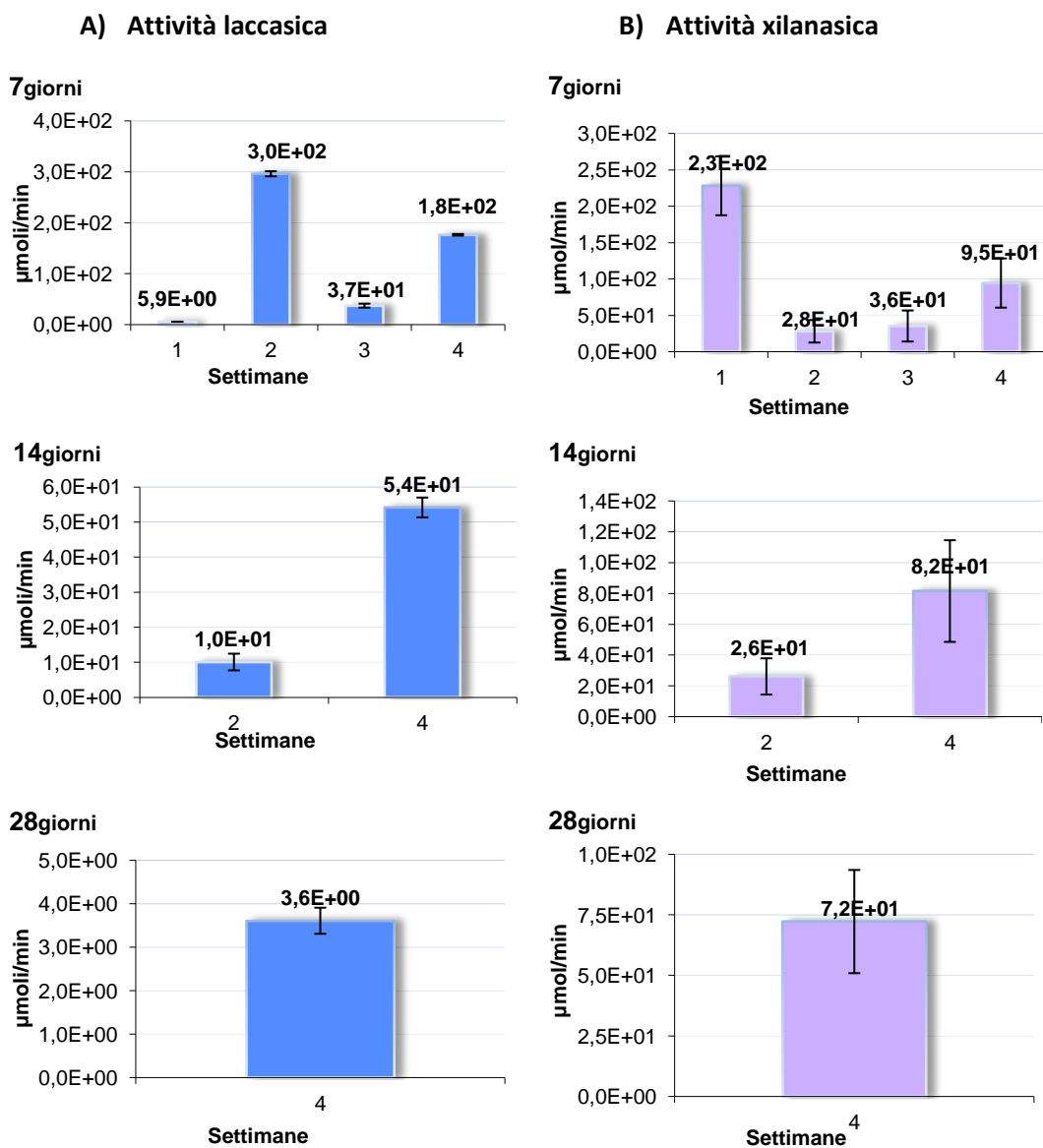


Figura 3.15: (A) Attività laccasica e (B) Attività xilanasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della crusca di grano

Non sono state rilevate attività perossidasiche nei diversi percolati prodotti. Questi risultati sono in linea con quanto riportato da F. Zimbardi et al. (2000) per le SSF in presenza del *Pleurotus ostreatus* e steli di cotone (substrato).

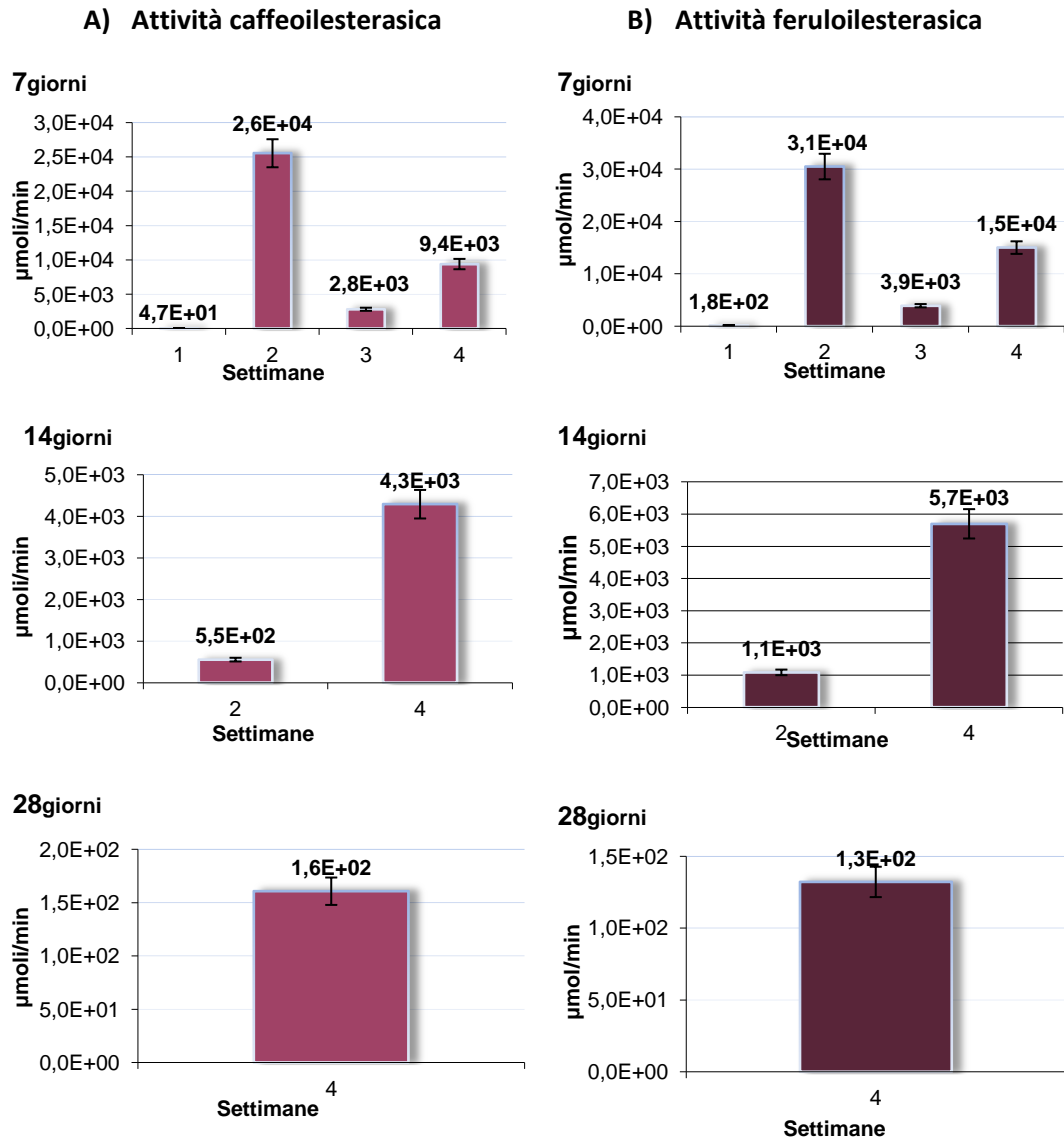


Figura 3.16: (A) Attività caffeoilsterasica e (B) Attività feruloilsterasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$) per volume totale di percolato raccolto con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della crusca di grano

In Figura 3.17 si osserva una maggior produzione di attività enzimatica all'aumentare della frequenza dei prelievi come riscontrato per tutti gli altri substrati esaminati. Questo fenomeno sembra dimostrare che la produzione enzimatica da fungo risulta maggiormente indotta quando gli enzimi vengono rimossi con maggiore frequenza. Tale risultato sembra ragionevolmente dimostrare che la produzione sia controllata da un modello all'equilibrio tra la produzione dell'enzima da parte della specie microbica e la concentrazione dell'enzima libero in soluzione.

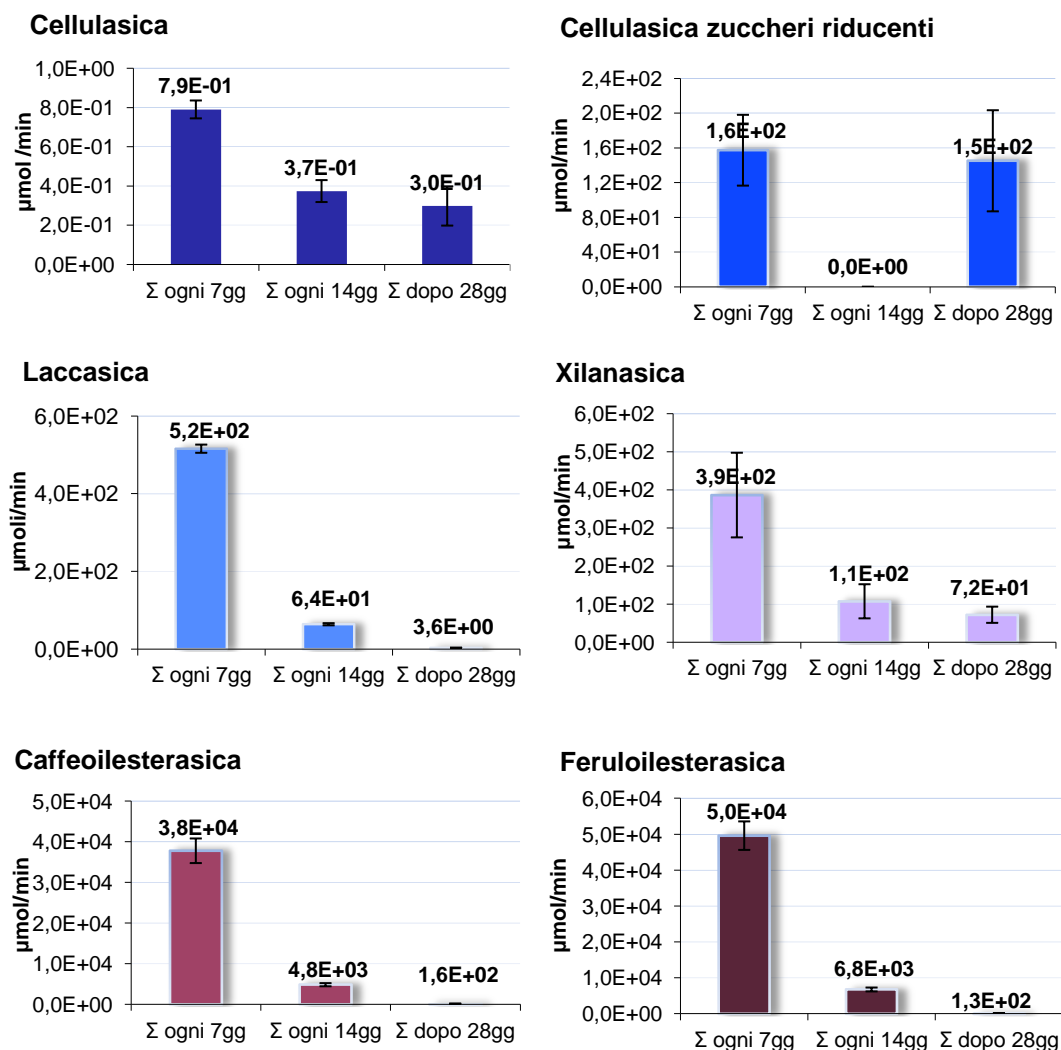


Figura 3.17: Sommatoria delle attività prodotte nella fermentazione della crusca di grano ($\mu\text{mol}/\text{min}$) con frequenza di prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni nella fermentazione della crusca di grano

3.1.6 Rese e potenziali massimi di produzione in SSF con sistema a biocella

I valori cumulativi ottenuti alla 4° settimana (sommatoria) per le 3 frequenze di prelievo ($\Sigma 1+2+3+4$; $\Sigma 2+4$; 4 settimana) sono stati rapportati al peso (g secchi) del substrato vegetale aggiunti all'interno di ciascuna biocella per ottenere il valore della resa finale effettiva in termini di attività enzimatica per ogni grammo di peso secco del substrato impiegato. La resa è stata espressa come $\Sigma 4$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)/g (valore cumulativo ottenuto alla 4° settimana su grammo di matrice vegetale) per gli intervalli di prelievo settimanale, ogni 14 giorni e ogni 28 giorni. In accordo con i dati precedentemente riportati, tutti i substrati

presentano una resa di attività enzimatica maggiore all'aumentare della frequenza di campionamento del percolato, ovvero, settimanalmente.

La paglia di grano presenta la resa più bassa per tutte le attività enzimatiche rispetto agli altri substrati analizzati (Figura 3.18). Il valore della resa cumulativa del prelievo settimanale risulta maggiore per tutte le categorie enzimatiche elencate rispetto alle biocelle in cui il percolato è stato raccolto ogni 14 e 28 giorni. Inoltre come già evidenziato precedentemente, le attività cellulasiche e laccasiche presentano valori di resa inferiori all'unità in corrispondenza delle 3 rese a confronto con diverse frequenze di prelievo.

Paglia di grano

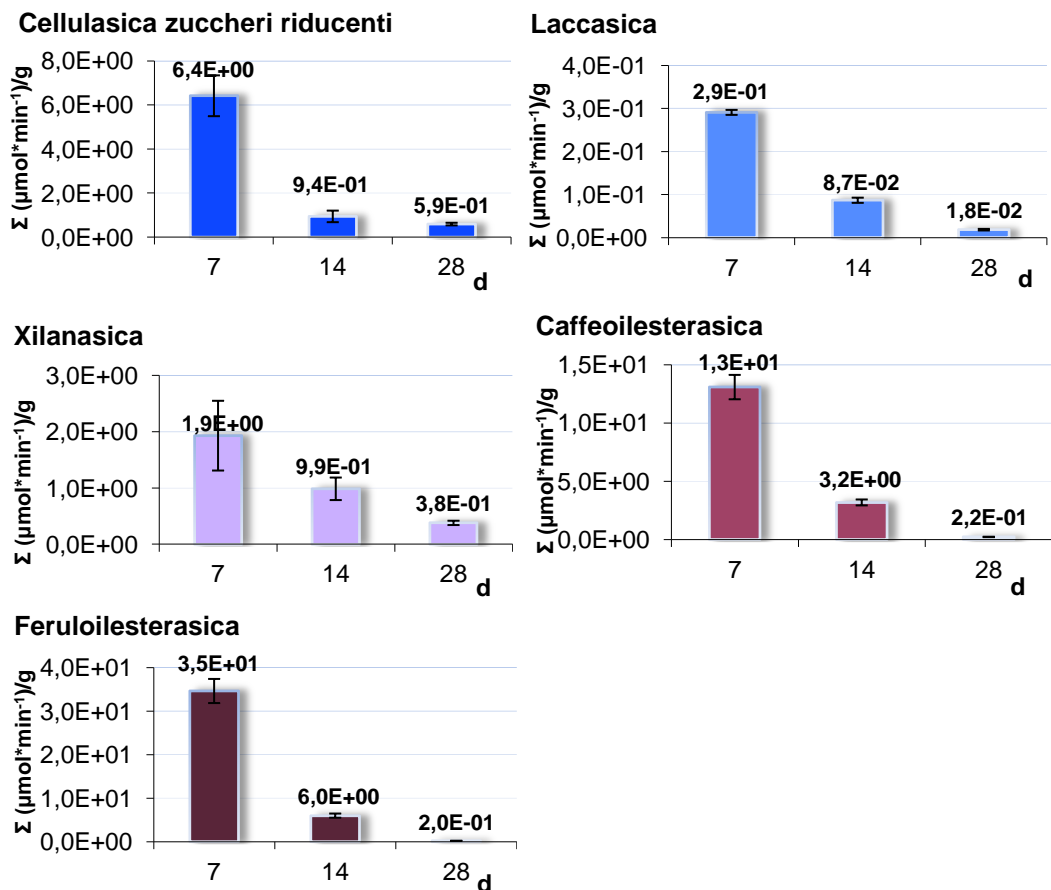


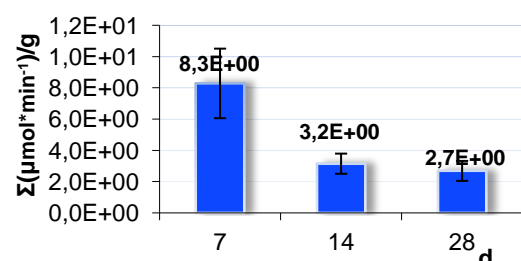
Figura 3.18: Confronto dei valori della resa totale Σ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)/g delle diverse attività enzimatiche, alla 4^a settimana della biocella con prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni; *paglia di grano* (50 g peso secco)

Per la biocella con substrato lolla di riso (Figura 3.19), le rese cumulative ottenute alla 4^a settimana, per gli zuccheri riducenti dell'attività cellulasiche e xilanasica presentano un decremento progressivo nelle 3 frequenze di prelievo (circa 70% tra

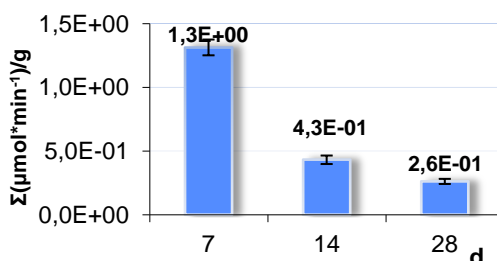
l'intervallo con frequenza settimanale e quello ogni 28 giorni) a differenza delle attività caffeoilesterasica e feruloilesterasica in cui l'attività cumulativa del prelievo settimanale risulta molto maggiore rispetto a quelle con minore frequenza di prelievo (circa 95% di decremento nel confronto tra la frequenza settimanale e ogni 14 giorni). Questo potrebbe indicare una tendenza non omogenea per i valori di resa di attività enzimatica in relazione alla frequenza di prelievo, in cui le attività arilesterasiche assumono valori molto inferiori rispetto alle altre categorie enzimatiche al diminuire della frequenza di prelievo.

Lolla di riso

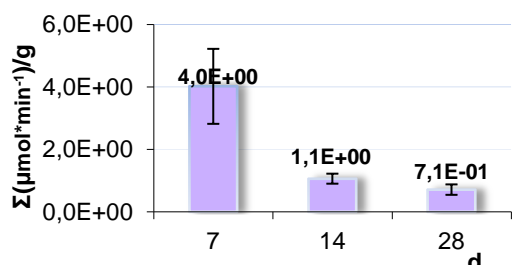
Cellulasica zuccheri riducenti



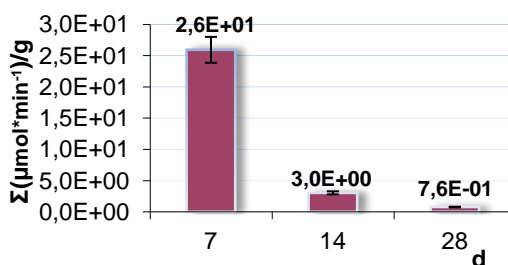
Laccasica



Xilanasica



Caffeoilesterasica



Feruloilesterasica

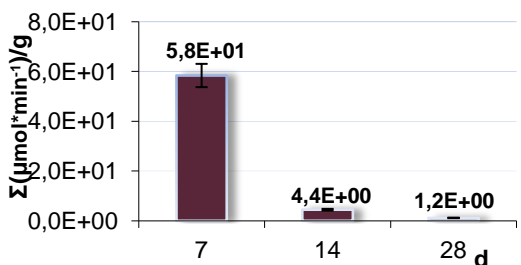


Figura 3.19: Confronto dei valori della resa totale Σ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{g}$) delle diverse attività enzimatiche, alla 4° settimana della biocella con prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni; *lolla di riso* (50 g peso secco)

La biocella con grapsi d'uva mostra valori di attività superiori per tutte le categorie enzimatiche rispetto alle matrici vegetali analizzate in precedenza. Per le attività caffeoilsterasica e feruloilsterasica, le rese di attività con prelievo ogni 28 giorni presentano un valore decisamente superiore all'unità ma in accordo con il trend generale, questo risulta inferiore di circa 90% rispetto agli intervalli con frequenza di prelievo settimanale. Anche l'attività laccasica assume un valore cumulativo interessante rispetto agli altri substrati in cui è stata evidenziata una resa inferiore all'unità. Il confronto tra le rese prodotte dalla fermentazione dei grapsi d'uva viene riportato nella Figura 3.20.

Grapsi d'uva

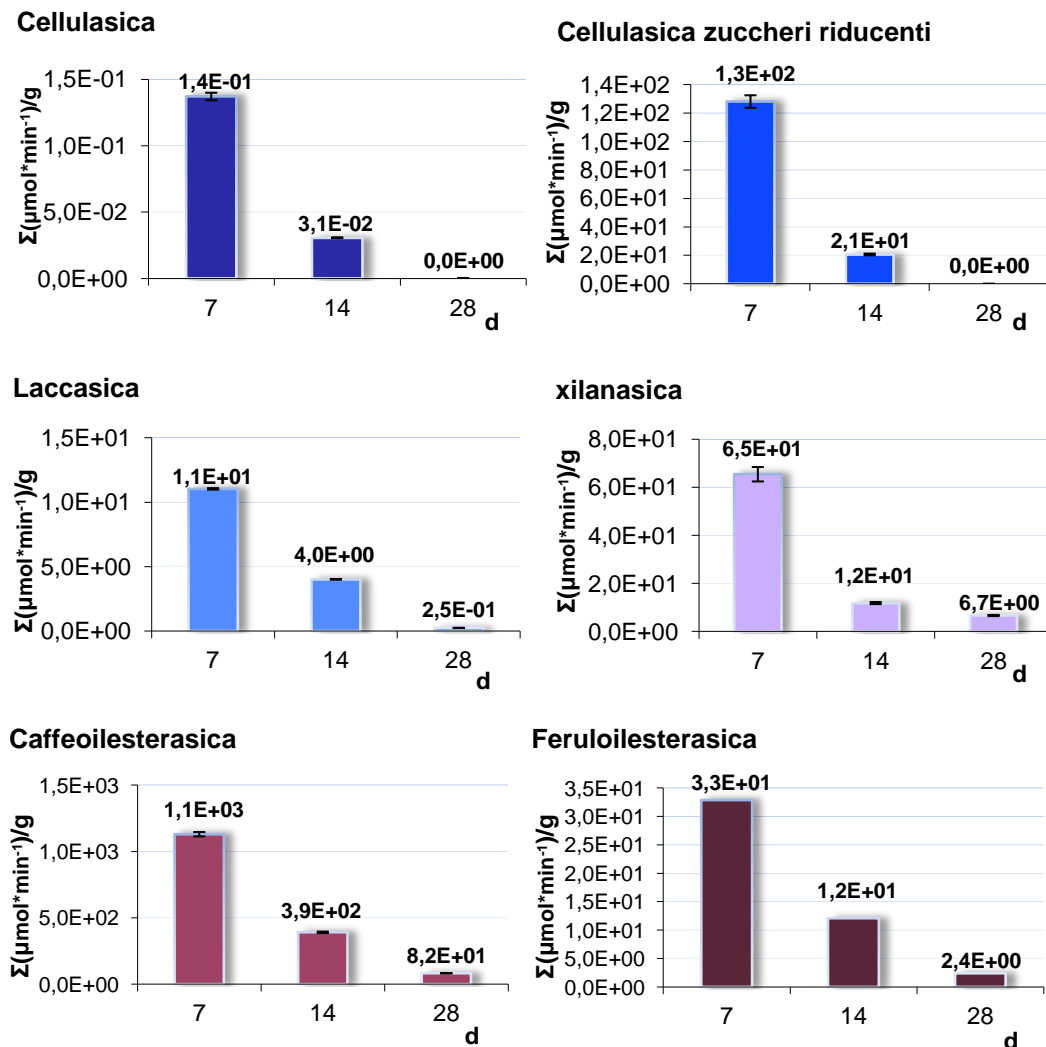


Figura 3.20: Confronto dei valori della resa totale Σ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)/g delle diverse attività enzimatiche, alla 4^a settimana della biocella con prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni; *grapsi d'uva* (9,1 g peso secco)

Crusca di grano

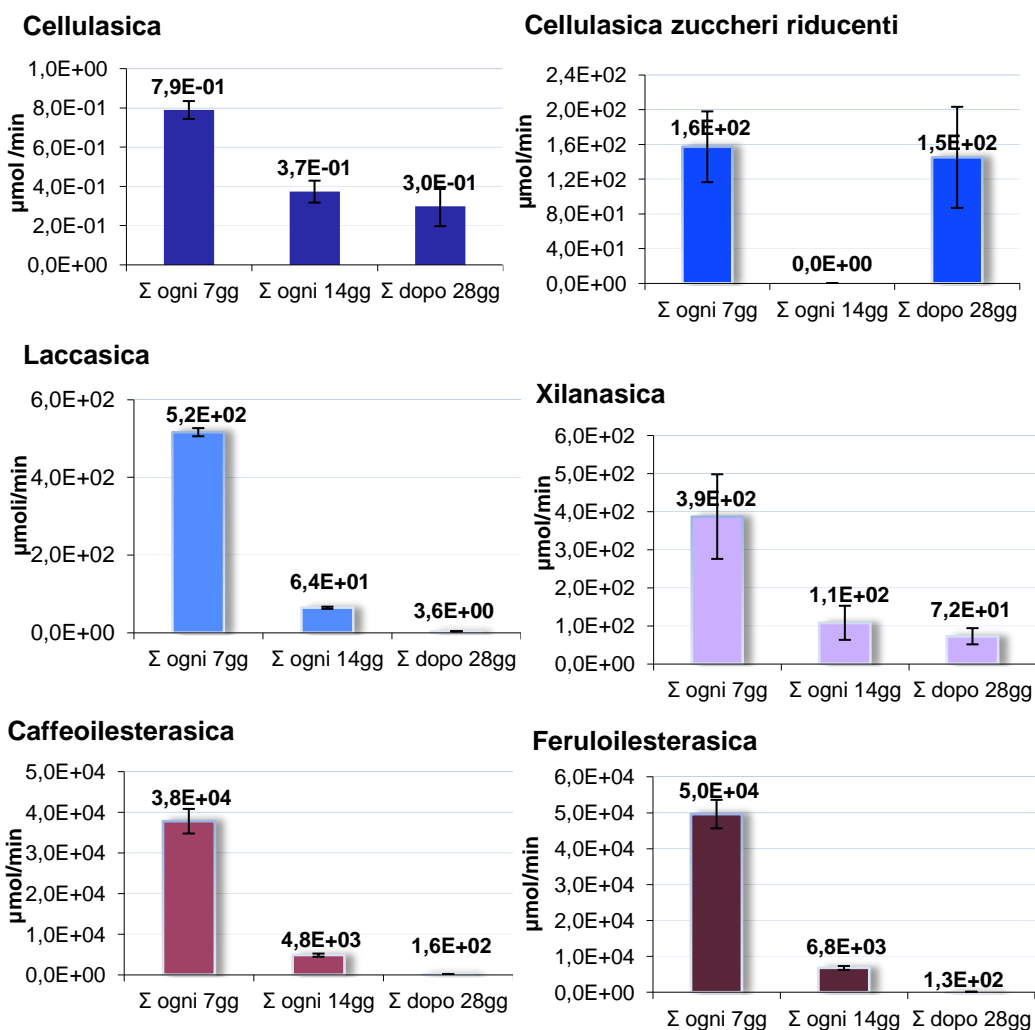


Figura 3.21: Confronto dei valori della resa totale Σ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)/g delle diverse attività enzimatiche, alla 4° settimana della biocella con prelievo ogni 7, 14 e 28 giorni; *crusca di grano* (50 g peso secco)

Le rese ottenute dalla fermentazione della crusca di grano (Figura 3.21), i valori della resa dell'attività cellulasica (ottenuta con il metodo degli zuccheri riducenti) mostrano un andamento non uniforme rispetto alle precedenti analisi. Questo andamento non è facilmente interpretabile sulla base delle attuali conoscenze; tuttavia, si potrebbe pensare a un'interferenza degli zuccheri riducenti presenti a livello endogeno nella matrice vegetale, che interagiscono in modo non costante e rilevabile, con i processi di fermentazione all'interno della biocella. La produzione di attività cellulasica e xilanasica è legata strettamente alla presenza di

zuccheri liberi in soluzione la cui concentrazione costituisce fonte di inibizione competitiva degli enzimi stessi. L'elevata attività laccasica è probabilmente legata al fatto che la crusca contiene una percentuale significativa di lignina che costituisce un substrato in grado di indurre l'espressione di tale attività da parte dei funghi "white-rot" come il *Pleurotus sp*⁷⁴.

Le rese delle attività arilesterasiche presentano un andamento analogo al substrato lolla di riso in cui la differenza sul valore cumulativo della resa con prelievo settimanale e quelle ogni 14 e 28 giorni segue un decremento superiore al 90%.

Con i valori delle rese di attività enzimatica ottenute come la sommatoria cumulativa delle attività alle tre diverse frequenze di prelievo considerate in rapporto a ciascun grammo di peso secco di substrato impiegato per la fermentazione all'interno delle biocelle, è stato possibile studiare l'andamento della produzione al diminuire dell'intervallo di prelievo. I risultati concordano con l'ipotesi di una maggiore resa produttiva con l'aumentare della frequenza di prelievo. L'andamento con cui la resa incrementa è descrivibile attraverso una relazione di tipo esponenziale:

$$a = a_0 * e^{-KI}$$

in cui a_0 è la resa di attività enzimatica quando la frequenza del prelievo è massima cioè quando la biocella è sottoposta ad un prelievo in continuo mentre I è l'intervallo del prelievo e K è una costante sperimentale.

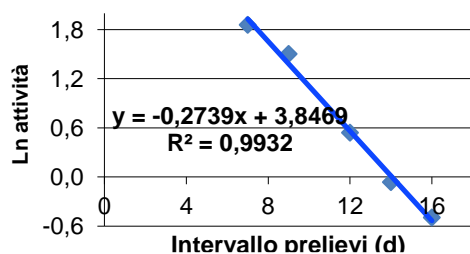
La relazione è stata semplificata ricorrendo alla corrispondente formula logaritmica:

$$\ln A = KI + \ln a_0$$

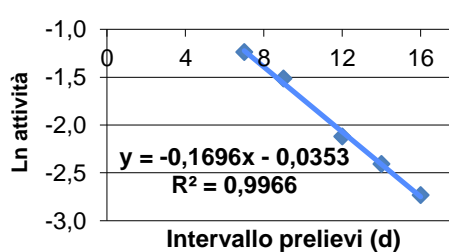
Per verificare quale sarebbe il potenziale di produzione massimo con un intervallo prossimo a zero, ossia in continuo, il logaritmo delle rese di attività enzimatica è stato messo in funzione degli intervalli di prelievo (Figura 3.22, Figura 3.23, Figura 3.24 e Figura 3.25).

Paglia di grano

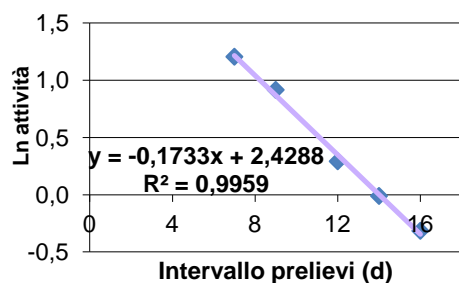
Cellulasica zuccheri riducenti



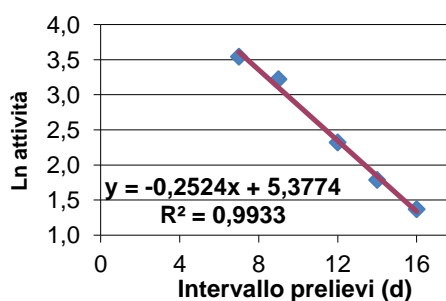
Laccasica



Xilanasica



Caffeoilsterasica



Feruloilsterasica

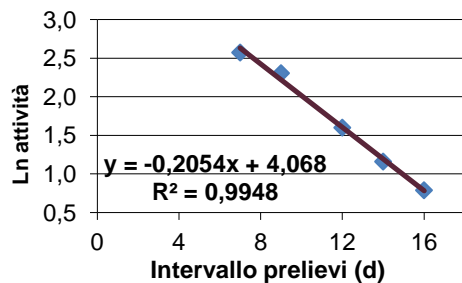


Figura 3.22: Funzione logaritmica delle attività in funzione dell'intervallo dei prelievi con rappresentazione dell'equazione della retta di interpolazione in *paglia di grano*

Lolla di riso

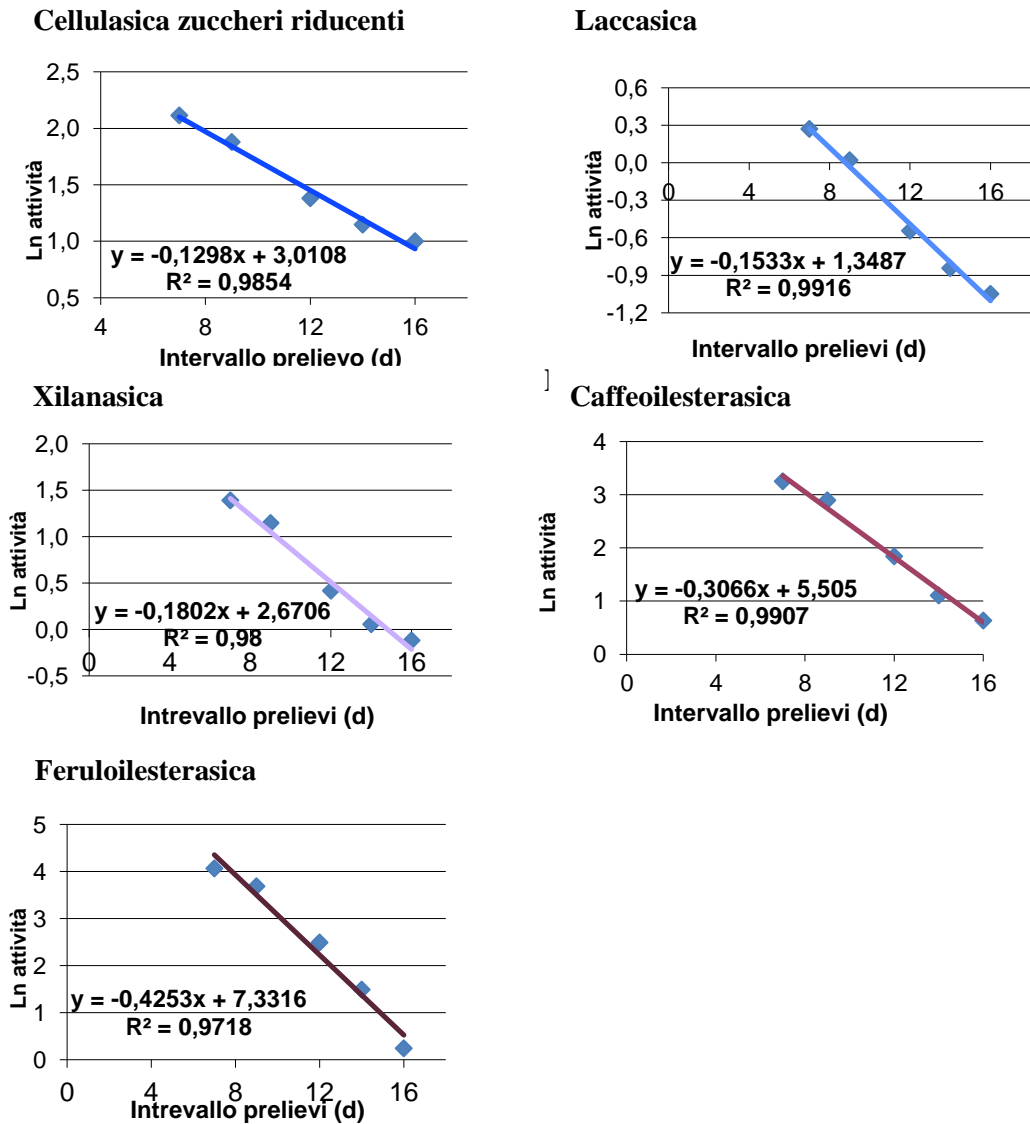


Figura 3.23: Funzione logaritmica delle attività in funzione dell'intervallo dei prelievi con rappresentazione dell'equazione della retta di interpolazione in *lolla di riso*

Graspi d'uva

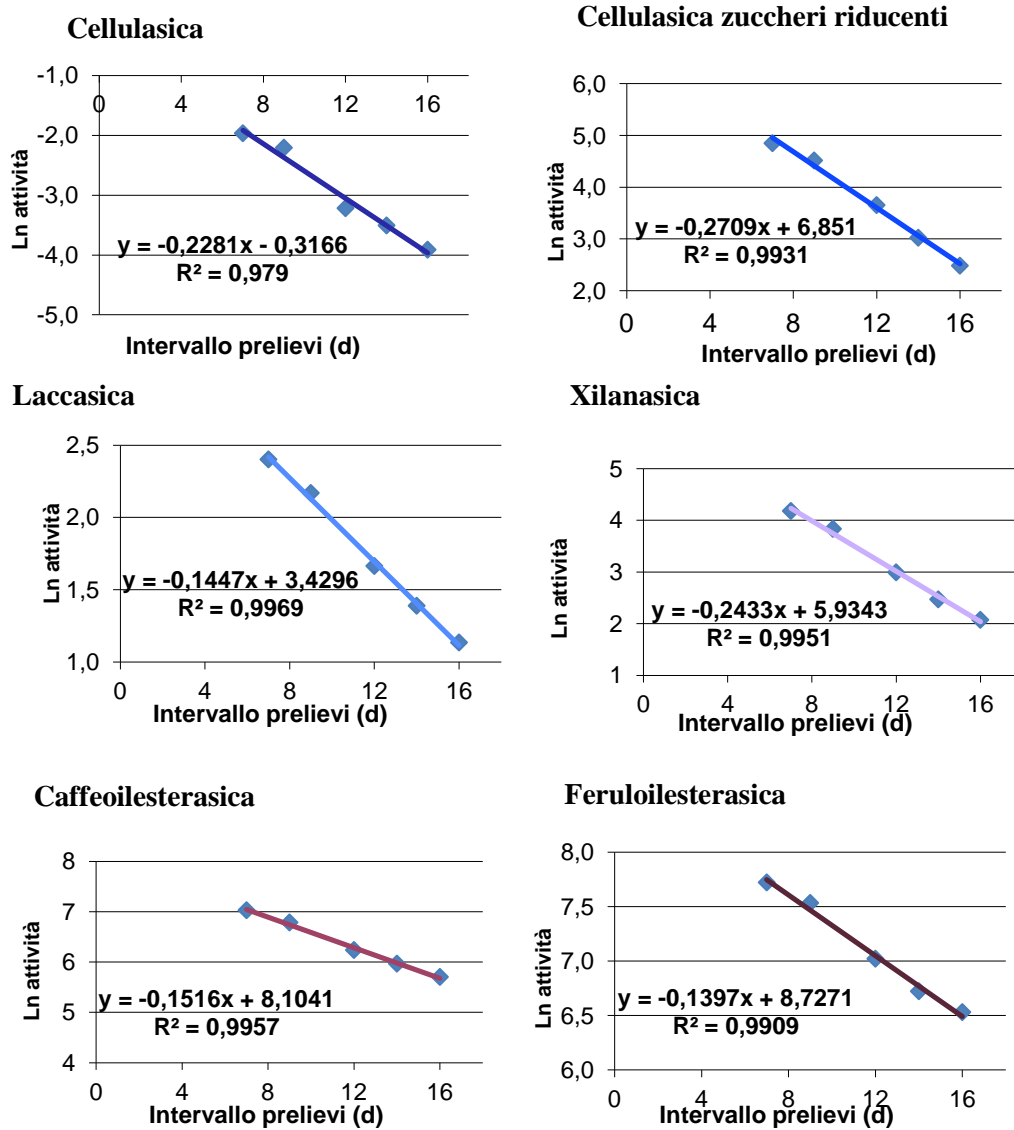


Figura 3.24: Funzione logaritmica delle attività in funzione dell'intervallo dei prelievi con rappresentazione dell'equazione della retta di interpolazione in *graspi d'uva*

Crusca di grano

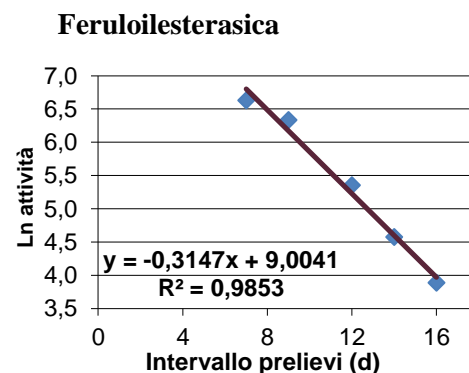
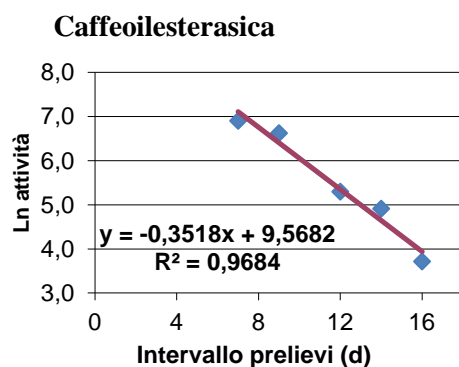
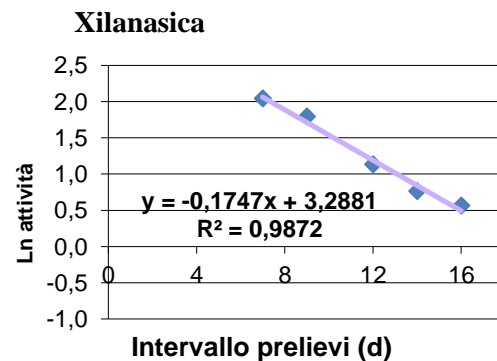
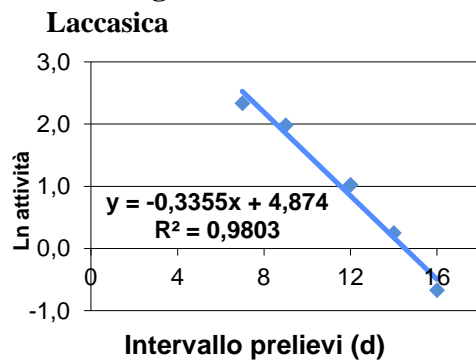


Figura 3.25: Funzione logaritmica delle attività in funzione dell'intervallo dei prelievi con rappresentazione dell'equazione della retta di interpolazione in **crusca di grano**

Per gli zuccheri riducenti dell'attività cellulasica della crusca di grano non è stato possibile stimare l'estrapolazione indicativa delle attività poiché come presentato in Figura 3.21 (B), le rese delle tre frequenze di prelievo seguono un andamento variabile.

La costante sperimentale (K) rappresenta il coefficiente angolare della retta che descrive i valori di interpolazione delle attività logaritmiche in funzione dell'intervallo di tempo. I valori di K per le attività di ciascun substrato sono elencati in Tabella 3.1. Sotto l'aspetto dimensionale, il valore di K rappresenta una frequenza in quanto viene definito come l'inverso di un tempo.

Dai dati sperimentali si evidenzia un valore di K elevato in corrispondenza dei maggiori punti di potenziale massimo di produzione. L'incremento di tale costante sperimentale, corrisponde all'aumento della pendenza della retta che descrive i valori logaritmici della produzione enzimatica in funzione

dell'intervallo di prelievo; dunque risulta un indice del decremento all'aumentare del tempo di prelievo. K è quindi un fattore che riporta l'incremento dell'attività per ogni unità di intervallo di tempo.

Tabella 3.1: valori della costante sperimentale (K) del substrato paglia di grano, lolla di riso, graspi d'uva e crusca di grano delle attività enzimatiche in esame

Attività	Paglia di grano	Lolla di riso	Graspi d'uva	Crusca di grano
Cellulasica	-	-	0,32	-
Cellulasica zuccheri riducenti	3,85	3,01	6,85	-
Laccasica	0,04	1,35	3,43	4,87
Xilanasica	2,43	2,67	5,93	3,29
Caffeolesterasica	5,38	5,51	8,10	9,57
Feruloilesterasica	4,07	7,33	8,73	9,00

Le attività con alti valori di potenziale massimo di produzione al tempo zero presentano un dato importante per un possibile sviluppo di un processo di produzione in continuo, poiché per andamenti rappresentati da una pendenza maggiore della retta, è ragionevole ipotizzare una diminuzione dell'attività all'aumentare dell'intervallo di prelievo e una produzione enzimatica maggiore se la rimozione del percolato avvenisse secondo un processo continuo.

Attualmente, non abbiamo elementi sufficienti per comprendere il motivo di questa relazione esponenziale tra l'attività prodotta e l'intervallo di prelievo sebbene si possa ipotizzare che il micelio venga indotto ad una continua produzione di attività enzimatica durante il periodo in cui questa viene sottratta. Ciò sembra indice dell'instaurarsi di un meccanismo all'equilibrio in cui la produzione di enzima è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima stesso nel bioreattore.

Gli andamenti sono risultati di tipo lineare da cui si possono quindi estrapolare i valori corrispondenti ad intervalli di prelievo prossimi a zero che rappresentano la massima capacità di produttiva del micelio in un ipotetico bioreattore a recupero continuo di percolato.

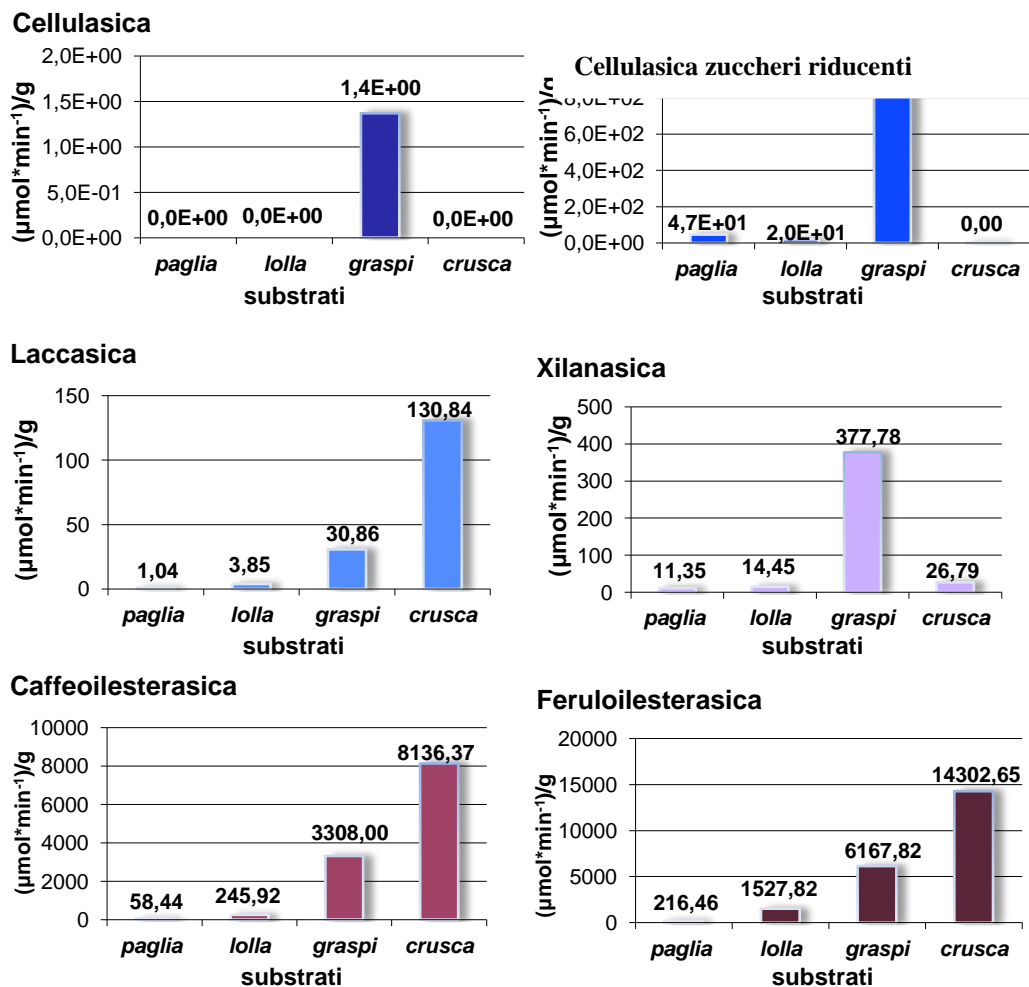


Figura 3.26: Confronto del potenziale massimo di produzione della resa enzimatica al tempo zero (modello in continuo) nei 4 substrati analizzati

In Figura 3.26 vengono riportati gli ipotetici potenziali massimi di resa delle diverse attività enzimatiche per i diversi substrati prevedendo un processo di SSF in continuo.

Attraverso i valori di potenziale massimo di resa delle diverse attività enzimatiche espresse con i diversi substrati, si è potuto valutare la capacità di ogni substrato di indurre la produzione delle singole classi enzimatiche. E' interessante osservare che, in generale, i graspi d'uva e la crusca di grano presentano valori di produttività in assoluto più elevati rispetto alla paglia di grano e lolla di riso. Questo dato può essere legato alla diversa composizione della struttura vegetale. In particolare i graspi d'uva hanno mostrato la maggior resa delle attività cellulase (sia con il metodo della carta funzionalizzata sia con gli zuccheri riducenti) e di quella xilanasica ciò può essere ragionevolmente dovuto alla peculiare presenza di composti polisaccaridici a livello della parete vegetale (30%

cellulosa, 30% emicellulosa, 35% pectina e 1-5% proteine strutturali). La crusca, invece, a fronte di scarse attività cellulasiche e xilanasica presenta elevate attività fenolossidasiche e arilesterasiche. Questo potrebbe essere legato alle caratteristiche del substrato; infatti, la parte più esterna della crusca è molto ricca di cellulosa e se trattata con basi è la frazione, assieme allo strato intermedio, che rilascia la maggior quantità di dimeri e trimeri di acido ferulico. Questi rilasci sono indicativi di legami etere con fenoli acidi che risulta consistente con una significativa presenza di lignina tannini e cutina in questi tessuti⁷⁵. La presenza di questi legami tra gruppi ferulici ed emicellulosa è probabilmente alla base dell'induzione delle attività cinnamoilesterasiche (feruloilesterasiche e caffeoilesterasiche) da parte di *P. ostreatus* così come l'elevata presenza di frazione ligninica indurrà la produzione di attività laccasiche e perossidasiche. Le attività caffeoilesterasica e feruloilesterasica presentano la resa potenziale massima più elevata in assoluto rispetto alle altre attività esaminate.

Queste differenti produzioni di attività enzimatica strettamente dipendenti dal tipo di substrato utilizzato per la crescita del *Pleurotus ostreatus*, costituiscono delle importanti indicazioni al fine di valutare l'opportuna matrice vegetale da utilizzare. Apre, inoltre, la possibilità di studiare opportuni mix di matrici al fine di ottimizzare la produzione di specifici o ampi profili di attività enzimatiche.

3.2 Analisi della produzione enzimatica in modello di SSF con colonna a letto impaccato

I bioreattori a cella hanno evidenziato come la produzione di attività enzimatica fosse inversamente proporzionale all'intervallo dei prelievi effettuati. Su questa base la possibilità di realizzare un disegno di bioreattore con prelievo continuo sembra una soluzione interessante per ottimizzare i parametri operativi. Il fermentatore in stato solido (SSF) è stato definito come un sistema di fermentazione con matrici solide in parziale o totale assenza di acqua libera, in cui una parte di tale substrato solido, possiede una composizione capace di supportare la crescita e il metabolismo del microrganismo inoculato. In precedenti lavori, sono stati studiati e potenziati alcuni modelli di bioreattore poiché le

caratteristiche del design sviluppato, contribuiscono in vario modo alle dinamiche dei processi fermentativi tra il microrganismo e la matrice vegetale.

Abbiamo, quindi, disegnato e realizzato un SSF con colonna a letto impaccato in cui il recupero del percolato segue un percorso ciclico all'interno del sistema (Figura 3.27).



Figura 3.27: Modello di SSF con colonna a letto impaccato progettato in laboratorio.

Tutti gli elementi che costituiscono il fermentatore (Figura 3.28) sono stati sterilizzati in autoclave (120 °C per 20 minuti) per il mantenimento del comparto interno sterile ed isolato da contaminazioni esterne. Nella fase di raccolta, l'acqua di recupero viene introdotta nel polmone del fermentatore (5) tramite una siringa collegata ad una membrana millipore $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$ (6) e con l'azione della pompa peristaltica (9), l'acqua viene prelevata e fatta percolare nella parte superiore del reattore mediante uno sparger (11) realizzato con il tubo della pompa peristaltica disposto in forma a spirale, forato e chiuso all'estremità con un nodo per permettere all'acqua di raggiungere con la pressione applicata sui fori, la parte interna del fermentatore. Il liquido passando attraverso il letto impaccato recupera i prodotti di fermentazione, giunge nella parte inferiore della colonna del fermentatore e defluisce all'interno del polmone dove può essere nuovamente

prelevato (8) per compiere un certo numero di cicli permettendo così un recupero omogeneo del prodotto. Al termine dei passaggi ciclici all'interno del fermentatore, il percolato viene prelevato (6) per determinare le eventuali attività enzimatiche rilasciate. Per evitare la crescita del corpo fruttifero, il reattore è stato ricoperto con una camicia esterna scura, che ne impedisce l'esposizione alla luce. La colonna del fermentatore viene impaccata con strati alterni di supporto inerte e substrato vegetale proveniente come sottoprodotto dei processi agroindustriali. Come supporto inerte viene utilizzata l'argilla espansa che ha la funzione di agevolare il flusso del liquido all'interno della colonna e impedire la fuoriuscita di frazioni solide del complesso formato dalla matrice vegetale e le ife fungine. Inoltre la griglia filtrante (3) posta nella parte inferiore della colonna contribuisce al ruolo di trattenimento e filtrazione delle porzioni sovrastanti.

La matrice vegetale (sottoprodotto) costituisce il substrato per la crescita del fungo che, tramite produzione di enzimi lignocellulolitici, destruttura la composizione della matrice vegetale per ricavare fonte per il nutrimento. Come substrato sono stati utilizzati i raspi d'uva rossa sterilizzati in autoclave in cui è stato inoculato il *Pleurotus ostreatus* cresciute su estratto di malto agarizzato. La fermentazione nella colonna a letto impaccato ha avuto una durata di 42 giorni, con prelievi realizzati settimanalmente facendo ricircolare il percolato all'interno del bioreattore che è stato mantenuto ad una temperatura esterna di circa 20°C e l'ossigenazione consentita dai tappi in cotone poste nei punti di apertura del sistema. Sul percolato raccolto, dopo centrifugazione, vengono effettuate le determinazioni enzimatiche ricorrendo agli stessi saggi utilizzati per i sistemi di SSF a biocella. La procedura utilizzata viene descritta nel paragrafo 5.2.2.

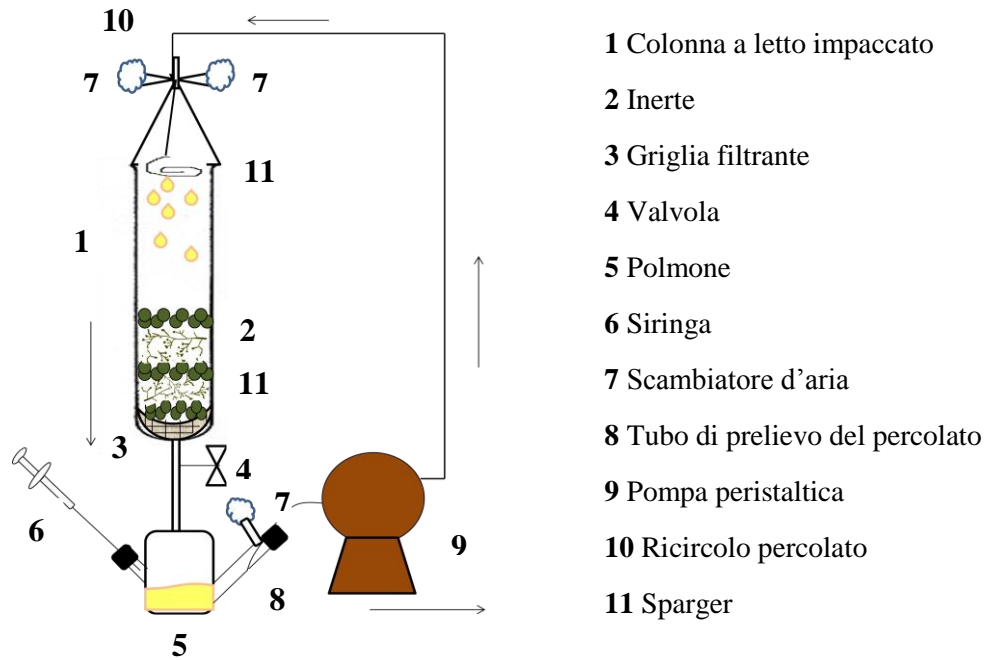


Figura 3.28: Fermentatore a stato solido in colonna a letto impaccato (1- colonna in vetro 7cm di diametro e 27cm di altezza, 2- supporto inerte di argilla espansa, 3- griglia in alluminio, 4- valvola di scarico del percolato, 5- polmone in vetro di 50 ml di volume, 6- Siringa vol. 5ml, 7- Cotone per scambiatori d'aria, 8- Tubo per prelievo del percolato, 9- Pompa peristaltica GILSON Minipuls 2, 10- Tubo di ricircolo del percolato, 11- sparger in acciaio inossidabile e tubo della pompa peristaltica forato)

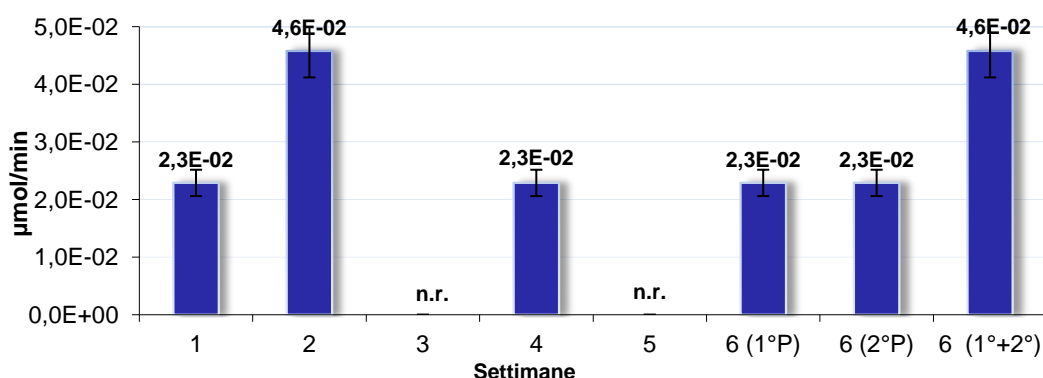
In Figura 3.29 vengono presentate le attività enzimatiche per volume totale di percolato raccolto di ciascun campione prelevato settimanalmente. Durante le fasi di prelievo, i prodotti di fermentazione sono stati rimossi dal bioreattore al termine di una serie di cicli realizzati nell'intervallo di tempo di 30 minuti. Per verificare il contenuto di un secondo percolato, ottenuto immediatamente dopo la raccolta del primo, la 6° settimana sono stati prelevati due percolati e confrontati nei loro valori di attività enzimatica determinata mediante i saggi spettrofotometrici. Questa prova è stata effettuata per verificare lo spettro di variazioni nella composizione delle classi enzimatiche presenti nel percolato successivamente ad un primo prelievo e monitorare la condizione del sistema in seguito alla rimozione dei prodotti di fermentazione. L'ultima colonna degli istogrammi è data dalla sommatoria del valore dei due percolati raccolti la 6° settimana.

La produzione dell'attività enzimatica presenta un andamento simile a quello osservato nelle biocelle. I valori alle prime settimane risultano maggiori o uguali rispetto ai successivi. Le attività arilesterasiche presentano questo andamento in

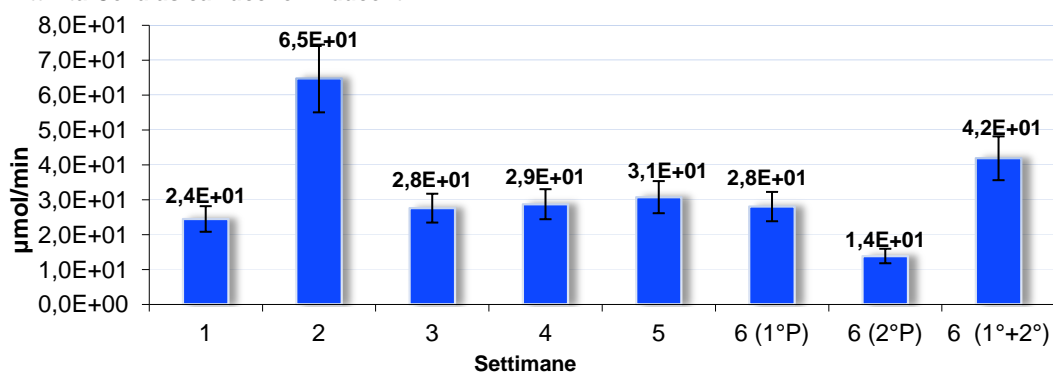
modo più marcato, infatti si può osservare una continua diminuzione dalla prima alla terza settimana di fermentazione, invece le altre attività rilevate presentano un andamento più oscillatorio e distribuito del rilascio delle attività prodotte.

Tranne nel caso dell'attività cellulastica (A) determinata con il metodo della carta funzionalizzata, tutte le altre attività continuano a presentare un nuovo quantitativo di attività enzimatica in tutte le settimane del processo fermentativo.

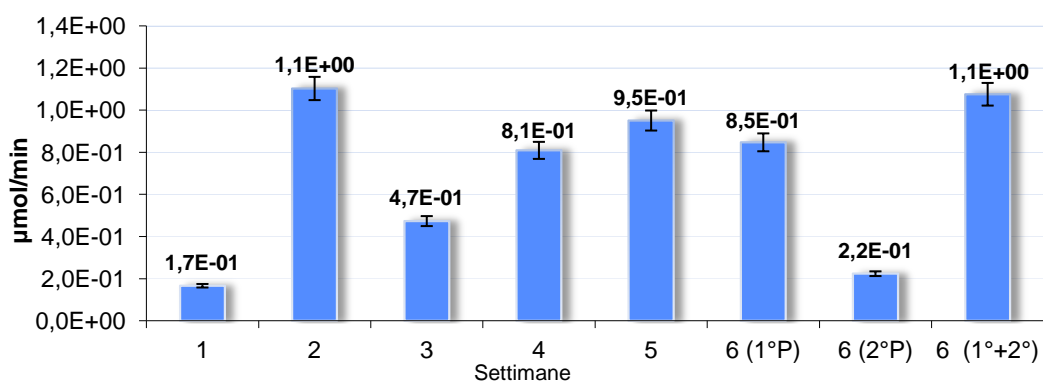
Attività Cellulastica



Attività Cellulastica zuccheri riducenti



Attività Laccasica



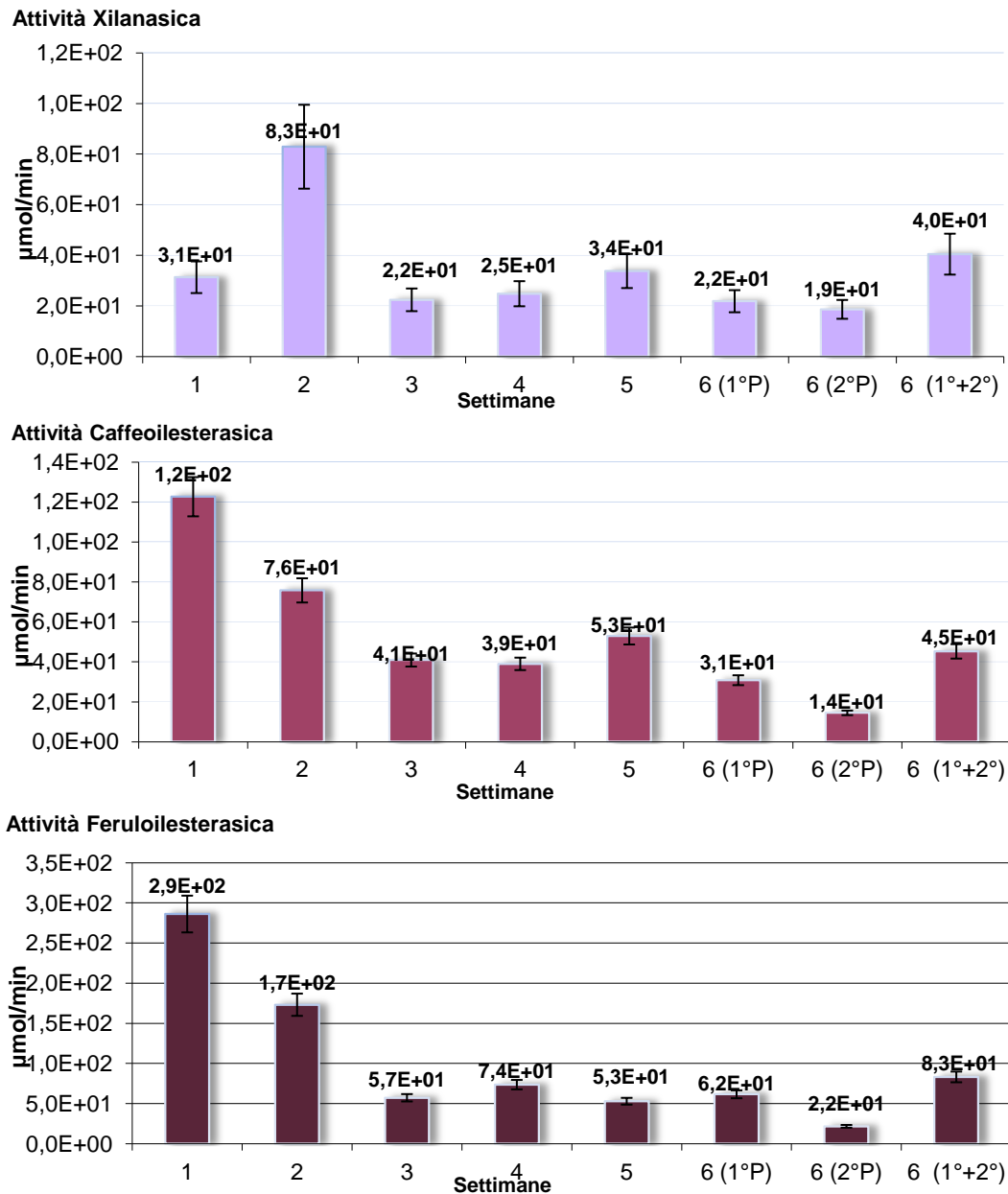


Figura 3.29: Attività enzimatiche per volume totale di percolato (μmol/min). Fermentazione in stato solido in colonna a letto impaccato con grappi d'uva

Rispetto ai valori ottenuti dal SSF a biocella con grappi d'uva, il bioreattore con colonna a letto impaccato presenta valori nettamente inferiori (Figura 3.29). Il percolato 6(1°P) in tutte le attività esaminate (eccetto la cellulasica determinata con il metodo della carta funzionalizzata) possiede un valore superiore rispetto al 6(2°P). Questo andamento può essere ragionevolmente spiegato da una tendenza dei prodotti di fermentazione a confluire preferibilmente dalla prima quantità di liquido che ciclicamente viene introdotta nel sistema e raccoglie le frazioni enzimatiche esocellulari prodotte dal fungo in seguito all'attacco alla matrice

vegetale, in questo caso rappresentata dai graspi d'uva. Tuttavia, la presenza di attività enzimatica anche nel secondo percolato della sesta settimana (6(2°P)), mostra la difficoltà di recuperare gli enzimi all'interno di questo sistema statico, che presenta canali preferenziali formati dalla spessa massa di ife dove il liquido scorre più facilmente lasciando ancora nel bioreattore enzimi prodotti.

Dal dato ottenuto dall'attività enzimatica totale presente nei volumi di percolato raccolti nelle diverse settimane, è stato possibile calcolare la sommatoria dei valori di ciascuna attività negli intervalli settimanali e, ottenuta la sommatoria della produzione enzimatica delle 6 settimane (nel caso del 6° prelievo, si sommano i valori di entrambi i prelievi), verificare la resa effettiva in rapporto ai grammi di peso secco di substrato vegetale introdotti nel bioreattore.

In Figura 3.30 sono presentati i valori delle sommatorie e l'ultima colonna degli istogrammi rappresenta la resa ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{g}$) espressa come attività totale per grammo di peso secco di substrato utilizzato. Anche questo dato conferma dei valori di resa nettamente inferiori rispetto al SSF a biocella con graspi d'uva.

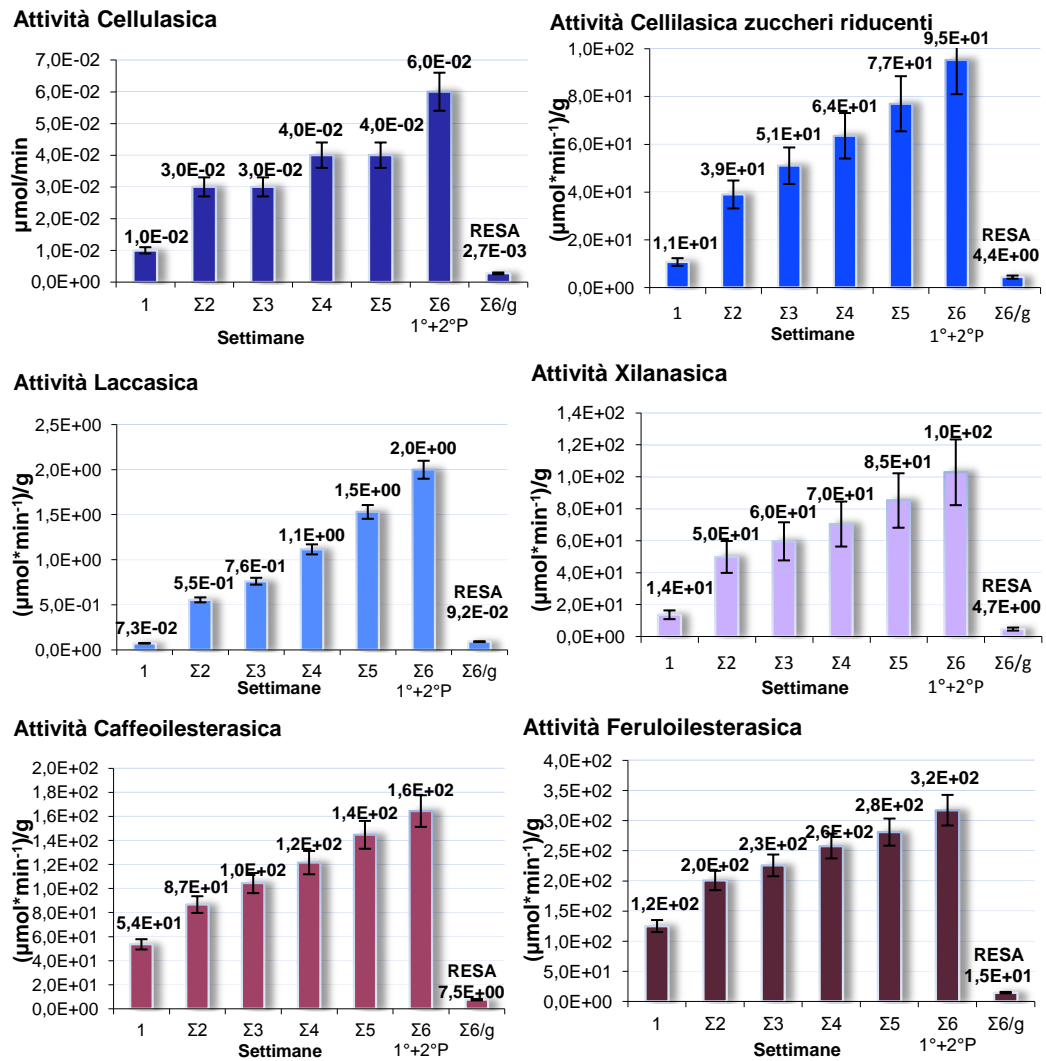


Figura 3.30: Sommatorie delle attività rilasciate e resa (μmol*min⁻¹/g) delle attività enzimatiche incrementali dei prelievi effettuati nelle 6 settimane di fermentazione nella colonna a letto impaccato con grasi d'uva

I fermentatori in stato solido a biocella e colonna a letto impaccato con substrato grapsi d'uva, rappresentano entrambi un sistema con un processo di raccolta del percolato in discontinuo poiché il prelievo viene effettuato con frequenza settimanale. In Figura 3.31 e Figura 3.32 sono rappresentate le rese di ciascuna attività enzimatica, ottenute come la sommatoria dei valori dei 4 prelievi settimanali in rapporto a ciascun grammo di peso secco del substrato grapsi d'uva impiegato per la fermentazione rispettivamente per la biocella e la colonna a letto impaccato.

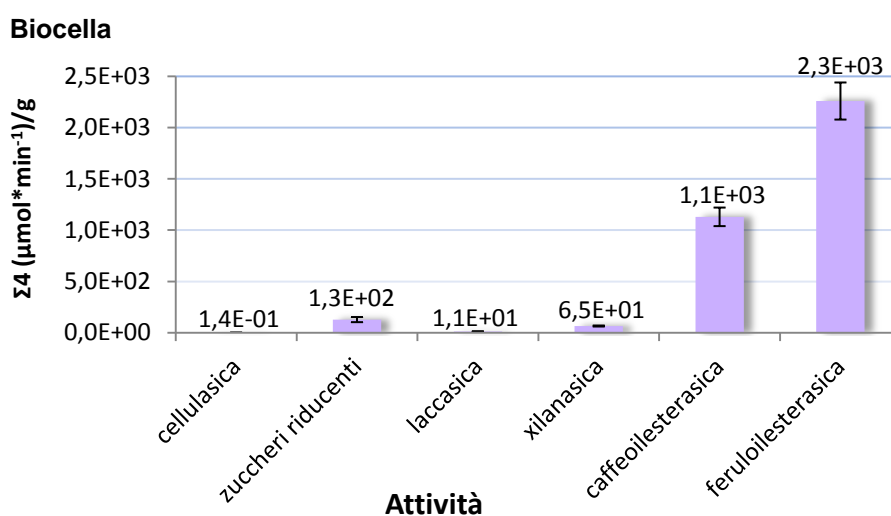


Figura 3.31: Rese (sommatoria dei valori delle 4 settimane su grammo di peso secco di substrato) delle attività enzimatiche in SSF a biocella con grapsi d'uva

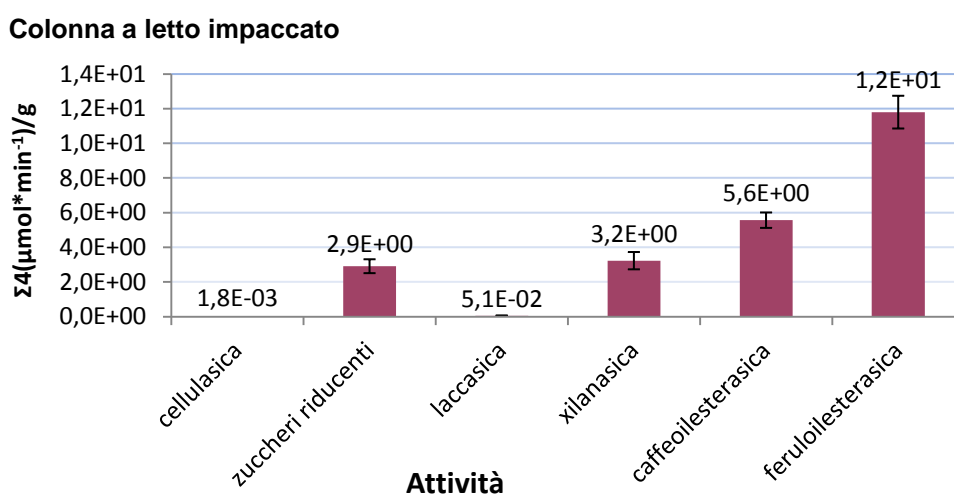


Figura 3.32: Rese (sommatoria dei valori delle 4 settimane su grammo di peso secco di substrato) delle attività enzimatiche in SSF con colonna a letto impaccato con grapsi d'uva

Il bioreattore a letto impaccato presenta una distribuzione di attività enzimatiche del tutto simile a quella riscontrata nella biocella in cui il fungo è cresciuto a danno dello stesso substrato. Le maggiori attività riscontrate sono sempre state quelle arilesterasiche ed in particolare quella feruloilesterasica a conferma del fatto che i graspi d'uva inducono *Pleurotus ostreatus* a produrre questa tipologia di attività. La biocella ha mostrato le maggiori rese di attività enzimatiche superiori di oltre due ordini di grandezza rispetto a quelle del bioreattore a letto impaccato. Pur essendo entrambi i processi basati su raccolta in discontinuo, le condizioni operative hanno, probabilmente, determinato una produzione finale delle attività non omogenea.

Infatti, le differenze sostanziali nella conduzione delle due fermentazioni sono dovute al fatto che il contenuto della biocella è stato periodicamente ribaltato e ciò ha ragionevolmente permesso una maggiore ossigenazione del sistema; inoltre, il mescolamento meccanico ha provocato la rottura delle ife e del substrato, con la liberazione dei prodotti di fermentazione confluiti poi nel percolato di raccolta.

Uno stato limitante del bioreattore con colonna a letto impaccato ha riguardato la possibilità di mescolamento del sistema; la crescita miceliale sulla matrice vegetale e sul supporto inerte, ha sviluppato un complesso compatto all'interno del fermentatore, in cui il percolato ha presumibilmente circolato seguendo canali preferenziali durante le 4 settimane di prelievo, tra cui la porzione periferica di tale complesso che risultava compatta a contatto con la parete della colonna. E' quindi, ragionevole pensare che il liquido di raccolta non abbia raggiunto tutte le porzioni del sistema in cui si è verificata produzione enzimatica da parte del fungo così come la limitata ossigenazione del letto impaccato abbia sfavorito la produzione enzimatica da parte del fungo. Dal confronto dei due sistemi di fermentazione, la condizione ottimale sembra quindi legata ad un modello in cui siano presenti opportuni livelli di ossigeno per la crescita del fungo e un metodo in cui il contenuto del fermentatore venga posto in agitazione e mescolamento meccanico per la circolazione continua dei prodotti di fermentazione, incrementando le rese di produzione.

3.3 Ottimizzazione dei parametri operativi e strutturati del SSF

3.3.1 Pretrattamenti termo-meccanici delle matrici vegetali

Il bioreattore è il cuore di un processo di fermentazione, in cui la materia prima, in condizioni adatte, viene convertita nel prodotto desiderato. La massimizzazione del livello di resa del prodotto all'interno del bioreattore è una parte fondamentale della ottimizzazione del processo produttivo. A differenza dei sistemi SMF, i bioreattori SSF sono ancora in grado di raggiungere un alto grado di sviluppo, principalmente a causa dei problemi connessi con i letti solidi, come la scarsa miscelazione dei materiali e trasferimento di calore⁷⁶.

Un aspetto importante da considerare durante la costruzione di un bioreattore è la sensibilità del substrato e/ o del microrganismo alle forze di taglio generate dalla miscelazione. In uno studio condotto sulla crescita di *Aspergillus oryzae* ACM 4996 su un substrato artificiale a base di gel, Stuart et al. ha osservato diminuzioni o aumenti nella produzione asseconda del substrato fermentato utilizzato in un bioreattore con tamburo rotante. Questo potrebbe essere attribuito alla sensibilità al taglio del substrato, ai danni causati alle ife del fungo, come anche al miglioramento della diffusione del calore e della miscelazione del substrato.

Generalmente, un'agitazione continua, anche se è dolce, può modificare la struttura del terreno solido trasformando lo stesso in pastoso. A seconda della natura delle particelle (granuli di argilla come supporto per esempio), questa agitazione può anche essere abrasiva ed essere dannosa per il micelio⁷⁶.

La staticità del reattore, induce invece 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. Si è osservato (Masutti et al. (2012)) 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 composti 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.

Purtroppo, si è osservato che questi passaggi sono anche portatori di successive contaminazioni, infatti, dalla terza/quarta settimana di fermentazione la crescita di altri microorganismi è facilitata, probabilmente a causa della difficoltà di lavorare in sterilità durante la fase di estrusione.

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. 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.

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)⁷⁷. 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, 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.

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 3.2).

Tabella 3.2: Dimensioni e descrizioni delle matrici vegetali a seguito dei trattamenti effettuati

MATRICE	VALUTAZIONE	DIMENSIONE	DESCRIZIONE
Graspi	<i>Prima del trattamento</i>	20-100 mm di lunghezza per 2-3 mm di diametro	Normali graspi
	<i>Dopo 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>Dopo 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>Dopo 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>Dopo trattamento termo-meccanico</i>	0,1-0,5 mm	Solido polveroso umido

Come si osserva nella Tabella 3.2 sopra riportata, 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 sotto forma di polvere fine per cui l'azione meccanica dell'omogeneizzatore non cambia la dimensione delle particelle.

3.3.1.1 Post-trattamento termo-meccanico ed enzimatico

La staticità del reattore induce diversi fenomeni limitanti al 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. Come osservato in Figura 3.31 e Figura 3.32, l'azione meccanica di rivoltamento del substrato nel fermentatore in stato solido a biocella 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.

La biomassa viene quindi estrusa dopo ogni settimana come descritto nel paragrafo 5.3.2, aggiungendo un volume noto di acqua distillata sterile sufficiente al recupero dei prodotti di fermentazione sottoforma di percolato. Si centrifuga la frazione liquida per eliminare il solido in sospensione e successivamente si realizzano le analisi per determinare i parametri biochimici di interesse. Infine, la biomassa viene reinserito nella biocella, lo stesso quantitativo d'acqua recuperato viene aggiunto per conferire le giusta quantità d'acqua necessaria alla successiva settimana di fermentazione.

Si è potuto notare un differente effetto del comportamento delle biomasse all'azione dell'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 ostreatus*. Nel corso della terza settimana tendono a manifestarsi contaminazioni anche all'interno delle altre biocelle individuando la presenza di nuove muffe.

Secondo Pandey A. (2003), nelle prime fasi della SSF, la temperatura e la concentrazione di ossigeno rimangono uniformi in tutto il substrato, con il procedere della fermentazione, si genera una grande quantità di calore che è direttamente proporzionale alle attività metaboliche del microrganismo e la disponibilità d'ossigeno all'interno del sistema tende a ridursi. La temperatura del

supporto è anche molto critica per quanto riguarda la crescita del microrganismo, la formazione di spore, la germinazione e la formazione del prodotto. L'elevata umidità, diminuisce la porosità del substrato, che a sua volta impedisce la penetrazione di ossigeno. Questo insieme di fattori può aiutare la contaminazione microbica esterna. D'altro canto, un basso contenuto di umidità può portare a scarsa accessibilità dei nutrienti con conseguente riduzione della crescita del fungo.

3.3.1.2 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 destrutturate come avverrebbe a valle di un tipico processo di compostaggio (Figura 3.33, Figura 3.34, Figura 3.35 e Figura 3.36). 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, valutando le percentuali di solido rimasto e di solido solubilizzato prima e dopo i 28 giorni di fermentazione (Tabella 3.3 e Tabella 3.4). 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 3.33: Modificazione del substrato **graspi d'uva** a seguito dei vari trattamenti: (A) Non trattati, (B) dopo il trattamento meccanico ed (C) dopo il trattamento meccanico e la fermentazione in stato solido

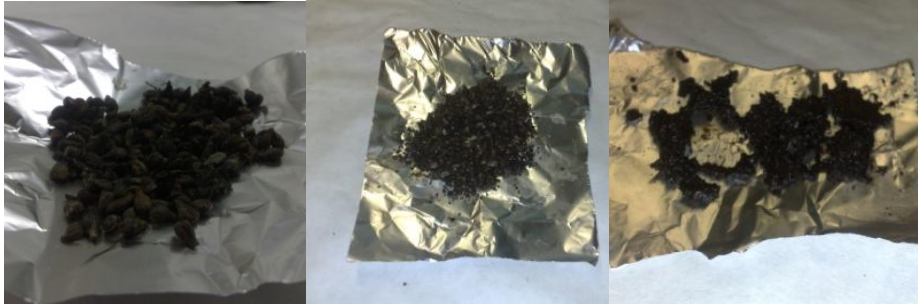


Figura 3.34: Modificazione del substrato **vinaccioli** a seguito dei vari trattamenti: (A) Non trattati, (B) dopo il trattamento meccanico ed (C) dopo il trattamento meccanico e la fermentazione in stato solido



Figura 3.35: Modificazione del substrato **paglia di grano** a seguito dei vari trattamenti: (A) Non trattati, (B) dopo il trattamento meccanico ed (C) dopo il trattamento meccanico e la fermentazione in stato solido

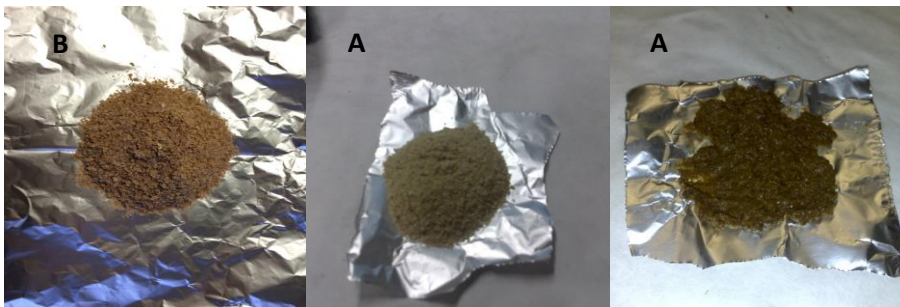


Figura 3.36: Modificazione del substrato **crusca di grano** a seguito dei vari trattamenti: (A) Non trattati, (B) dopo il trattamento meccanico ed (C) dopo il trattamento meccanico e la fermentazione in stato solido

La frazione solubile è stata determinata sospendendo 1g di matrice vegetale secca in 10ml d'acqua distillata da cui il solido viene separato per centrifugazione, seccato e pesato. La differenza di peso secco prima e dopo la sospensione fornisce la quantità di matrice che si è solubilizzata nell'acqua.

Tabella 3.3: Determinazione della variazione percentuale di matrice solida non solubilizzata prima (iniziale) e dopo (finale) 28 giorni di fermentazione

Matrice non solubilizzata				
		Peso umido (g)	Peso secco(g)	% solido
Graspi d'uva	Iniziale	1,00	0,50	50,3
	Finale	1,00	0,20	20,2
Vinaccioli	Iniziale	1,00	0,84	84,5
	Finale	1,01	0,56	55,3
Paglia di grano	Iniziale	1,00	0,96	96,3
	Finale	1,01	0,28	27,9
Crusca di grano	Iniziale	1,00	0,95	95,2
	Finale	1,01	0,24	24,2

Tabella 3.4: Determinazione della variazione percentuale di matrice solida solubilizzata prima (iniziale) e dopo (finale) 28 giorni di fermentazione

Matrice solubilizzata					
		Peso umido(g)	Peso secco(g)	% solido	% di solido solubilizzato
Graspi d'uva	Iniziale	1,01	0,47	47,0	6,63
	Finale	1,00	0,18	18,2	9,99
Vinaccioli	Iniziale	1,01	0,90	88,7	n.r.
	Finale	1,03	0,59	57,4	n.r.
Paglia di grano	Iniziale	0,58	0,54	93,4	2,99
	Finale	0,66	0,17	25,2	9,62
Crusca di grano	Iniziale	0,98	0,82	83,7	12,02
	Finale	1,14	0,23	20,0	17,46

n.r.: non rilevabile

Eccetto la matrice dei vinaccioli, tutti i substrati aumentano la propria percentuale di solido solubilizzato rispetto al valore iniziale dimostrando perciò l'efficacia del trattamento idrolitico enzimatico durante le 4 settimane di fermentazione.

Il caso dei vinaccioli, si discosta dagli altri casi, in quanto è maggiore la presenza lignina più difficilmente idrolizzabile e quindi, la percentuale di solido solubilizzato risulta nulla.

3.3.2 Determinazione delle attività enzimatiche prodotte nel SSF dinamico

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 dipende evidentemente dalle caratteristiche della matrice vegetale e dalla modalità con cui il micelio si adatta al substrato di crescita. Le attività enzimatiche dei substrati calcolate per ml, sono state moltiplicate per il volume totale di percolato raccolto in modo da determinare l'attività totale ottenuta dal processo di fermentazione eliminando in questo modo gli effetti di diluizione dovuti alle differenti condizioni di recupero.

Non è stata rilevata attività perossidasi in tutte le prove fermentative effettuate. E' stato inoltre inserito il saggio dell'attività pectinasi poiché gli enzimi carboidratici vengono frequentemente prodotti dal *Pleurotus ostreatus*^{78,79}.

Le attività enzimatiche rilevate vengono riportate in Figura 3.37, Figura 3.38, Figura 3.39 e Figura 3.40.

L'estratto enzimatico dei graspi (Figura 3.37) mostra buone attività di degradazione di zuccheri complessi (cellulosa, arabino-xilani e pectina) liberando significative quantità di zuccheri riducenti.

Le attività arilesterasiche (caffeoilesterasica e feruloilesterasica) presentano un aumento notevole nella terza settimana di fermentazione. Anche la laccasi mostra un marcato incremento in corrispondenza a questa settimana ma con un aumento decisamente meno evidente. Questi andamenti sono molto diversi da quelli riscontrati precedentemente nelle biocelle dove si osservava un'attività più elevata alla prima settimana di fermentazione che si riduceva in seguito alle settimane successive. In questo caso (Figura 3.37), probabilmente, la produzione di queste classi enzimatiche vengono stimulate a causa della maggiore biodisponibilità della biomassa nei confronti del fungo attraverso una progressiva riduzione delle dimensioni del substrato legata al processo di estrusione settimanale.

Non è stato possibile determinare la produzione enzimatica nella quarta settimana di fermentazione per via di una contaminazione della biocella. Il processo estrusivo, infatti, aumenta notevolmente le probabilità di contaminazione della biocella in quanto viene effettuato fuori dalle condizioni di stretto controllo degli inquinanti microbici.

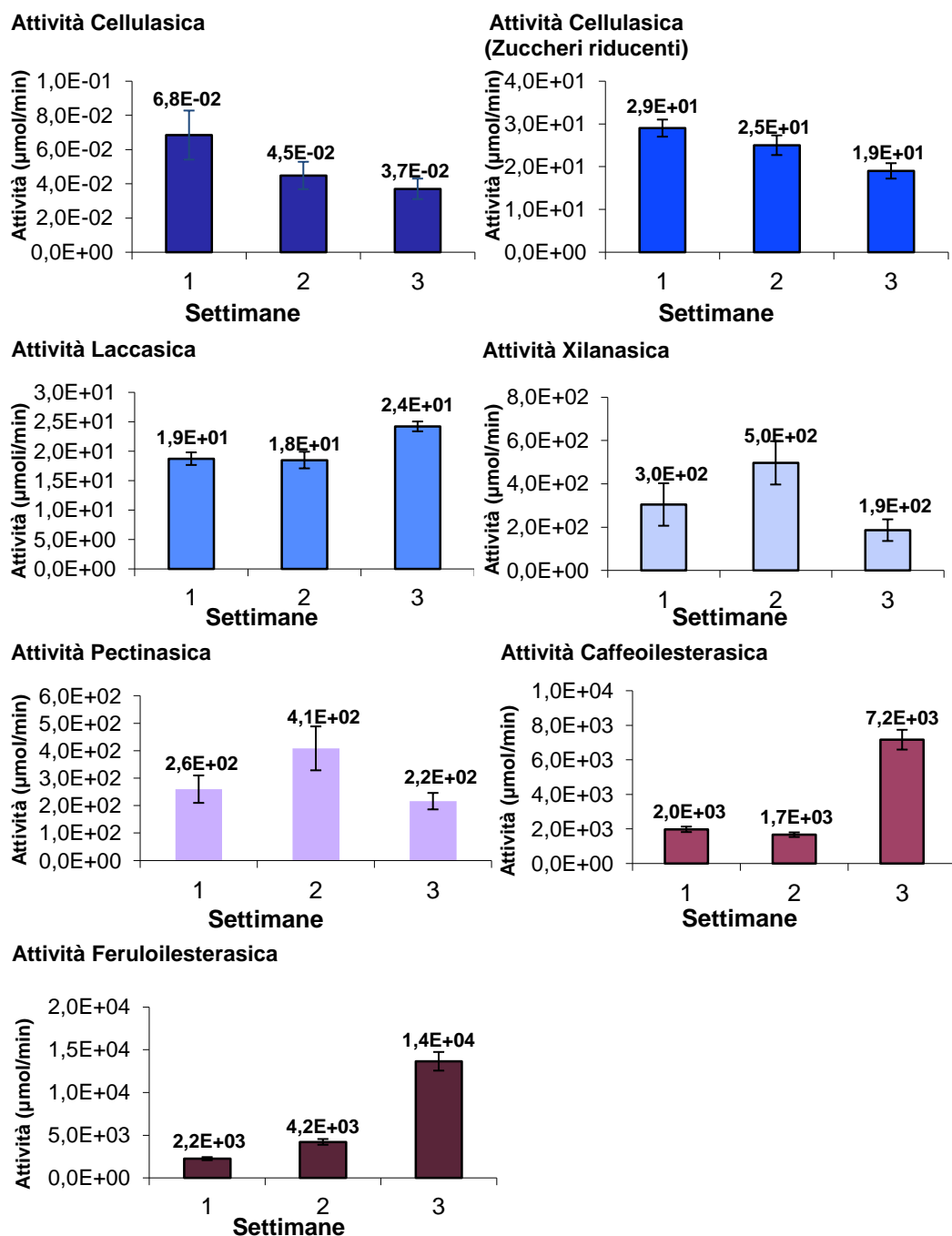


Figura 3.37: Attività enzimatica (µmol/min) per volume totale di percolato raccolto ogni 7 giorni dalla fermentazione con processo di estrusione dei **graspi d'uva**

In Figura 3.38, si osservano degli andamenti abbastanza simili al caso precedente dei graspi d'uva, 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 laccasi e cinnamoilesterasi interessanti per un eventuale recupero di sostanze d'interesse dai sottoprodotti agroalimentari.

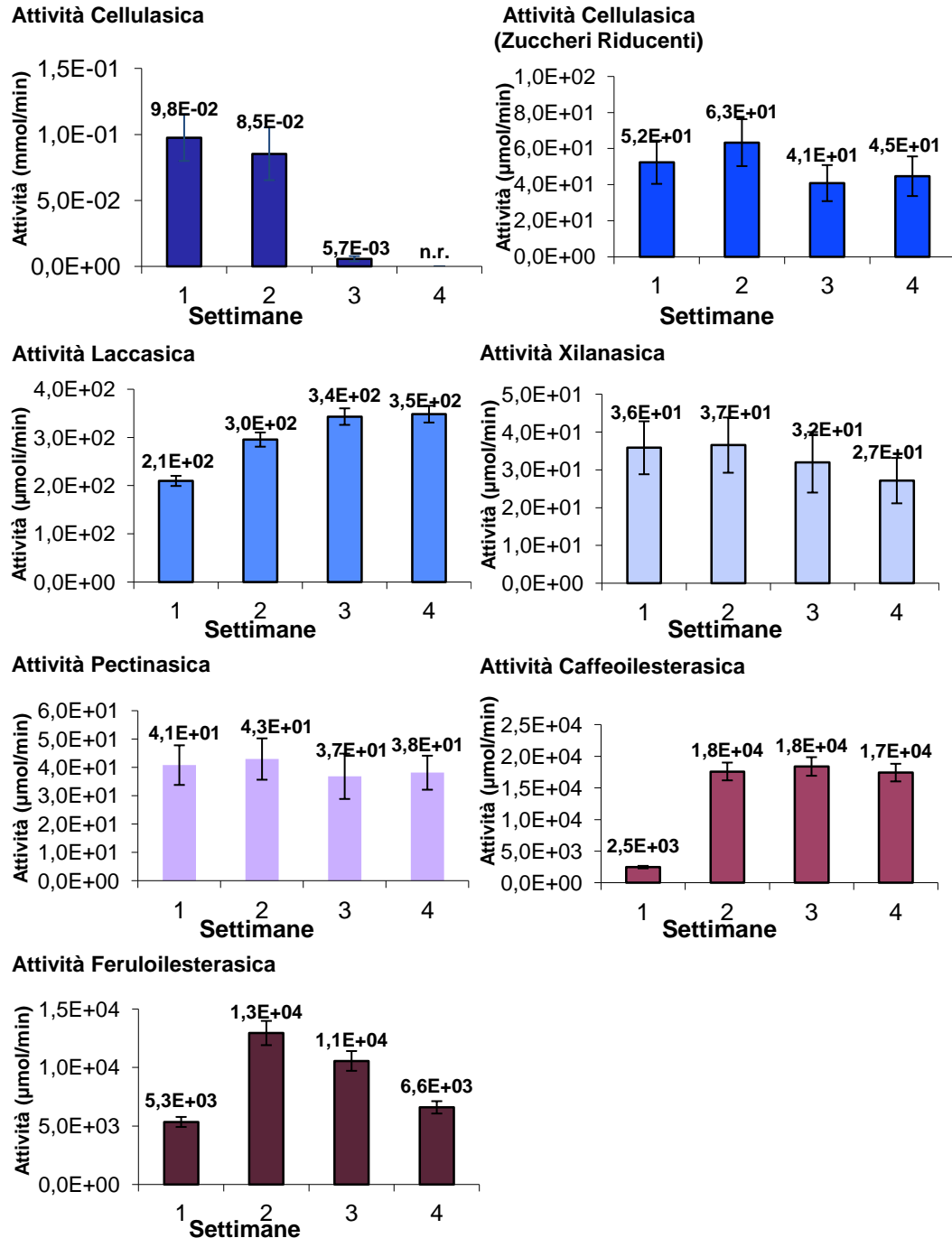
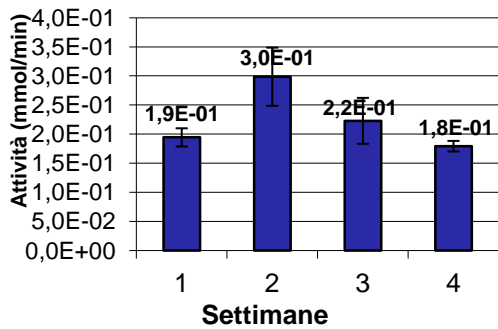
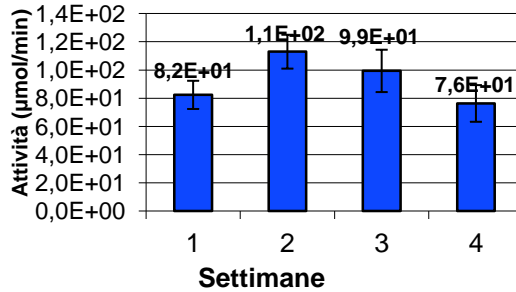


Figura 3.38: Attività enzimatica (μmol/min) per volume totale di percolato raccolto ogni 7 giorni dalla fermentazione con processo di estrusione dei **vinaccioli**

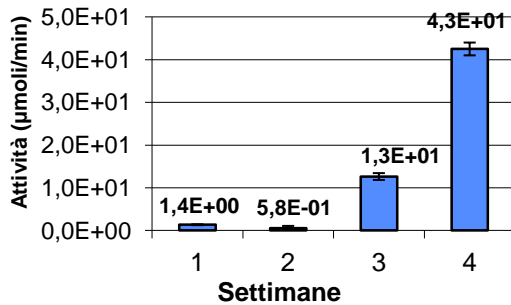
Attività Cellulasica



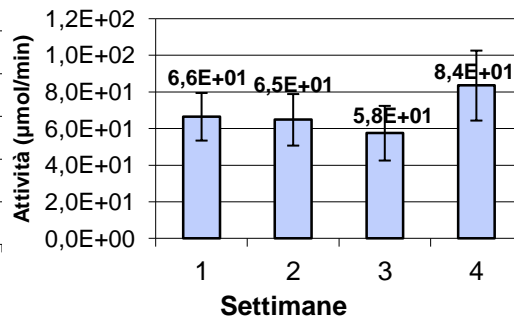
Attività Cellulasica (Zuccheri Riducenti)



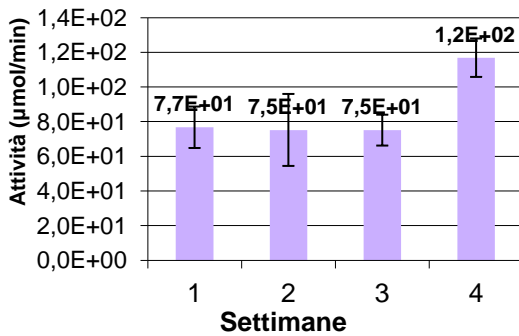
Attività Laccasica



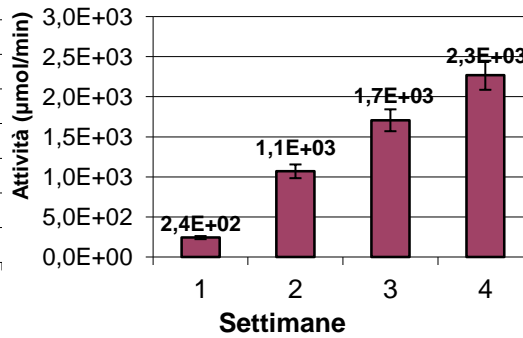
Attività Xilanasica



Attività Pectinasica



Attività Caffeoilesterasica



Attività Feruloilesterasica

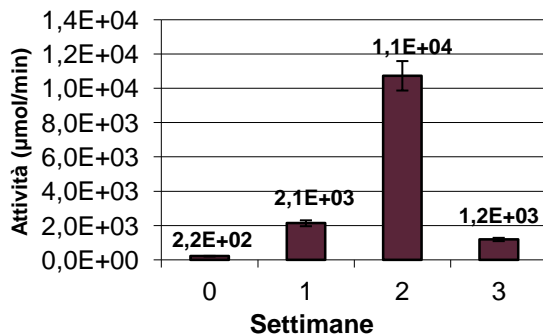


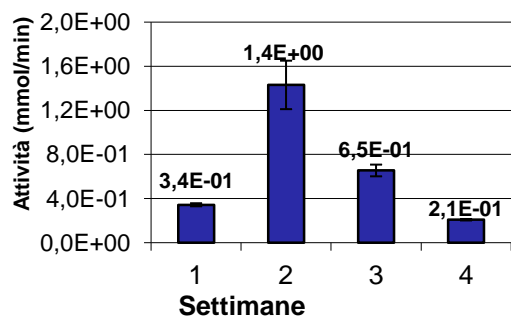
Figura 3.39: Attività enzimatica (μmol/min) per volume totale di percolato raccolto ogni 7 giorni dalla fermentazione con processo di estrusione della **paglia di grano**

Per ciò che riguarda la paglia di grano (Figura 3.39), l'estratto enzimatico 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 a rendere disponibili i metil-esteri alla trasformazione da parte dell'attività cinnamoilesterasica, il cui aumento in concomitanza con la laccasica sembra quindi ragionevole.

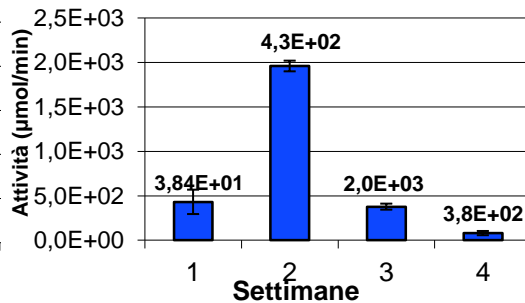
Gli enzimi prodotti nella biocella contenente crusca (Figura 3.40), possiedono tutti attività elevate. In particolare, la degradazione di zuccheri complessi è particolarmente efficiente. Ciò è ragionevole attribuirlo alla struttura vegetale della crusca ricca di nutriliti (circa 30%) di facile estrazione 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 araboxilaniche⁸⁰. L'azione delle xilanasi rende disponibile l'attacco delle arilesterasi ai legami arilesterasici tra acidi ferulici singoli o dimerizzati alle fibre polisaccaridiche.

Tutti i substrati utilizzati 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 esocellulasi piuttosto che come endocellulasi.

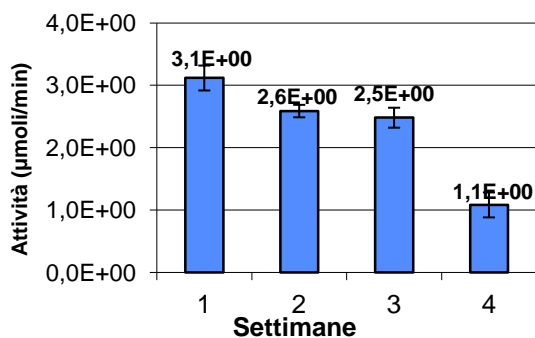
Attività Cellulasica



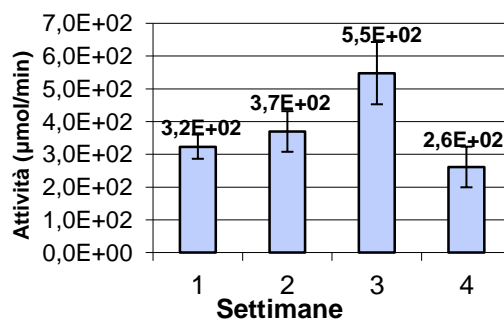
Attività Cellulasica (Zuccheri Riducenti)



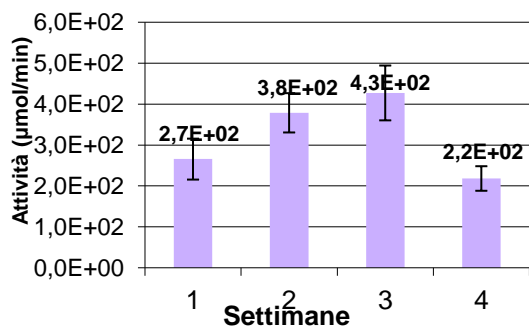
Attività Laccasica



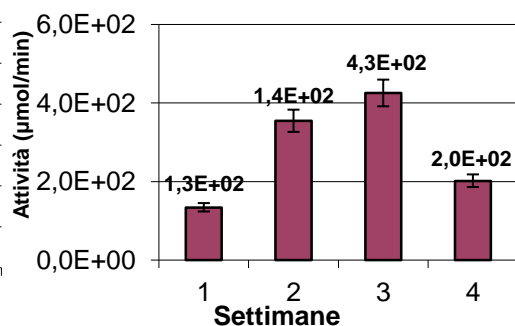
Attività Xilanasica



Attività Pectinasica



Attività Caffeoilesterasica



Attività Feruloilesterasica

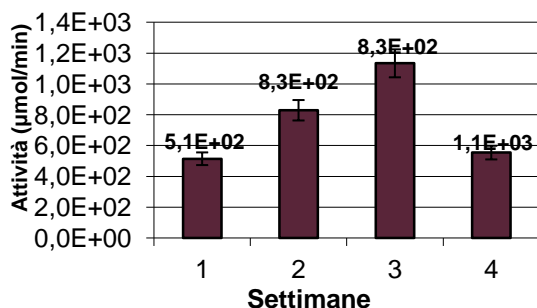


Figura 3.40: Attività enzimatica (μmol/min) per volume totale di percolato raccolto ogni 7 giorni dalla fermentazione con processo di estrusione della **crusca di grano**

3.3.3 Effetto sinergico dei substrati nella produzione enzimatica

In Tabella 3.5, le attività enzimatiche ottenute dalla fermentazione in stato solido dei singoli substrati (vinaccioli, paglia di grano, crusca di grano e graspi d'uva) vengono presentate sotto forma di resa calcolate come quantità di attività complessivamente estratta per 50g (peso secco) di substrato. I valori delle attività per il substrato graspi d'uva sono stati riportati a 50g di peso secco una volta che la fermentazione viene realizzata con 9,1g di peso secco (50g tal quale), in modo da potere confrontare le rese dei diversi substrati.

Tabella 3.5: Rese calcolate come sommatoria delle attività enzimatiche prodotte in 28 giorni di fermentazione ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)/g. I valori evidenziati in viola sono i più elevati per quella specifica attività enzimatica. * I valori dei graspi d'uva sono riferiti soltanto alle prime 3 settimane di fermentazione

Attività enzimatiche	Resa delle attività enzimatiche prodotte ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)/g			
	Graspi d'uva*	Vinaccioli	Paglia di grano	Crusca di grano
Cellulasica	1,6E-02	3,8E-03	1,8E-02	5,3E-02
Cellulasica (Zuccheri Riducenti)	8,1E+00	4,0E+00	7,4E+00	5,7E+01
Laccasica	6,7E+00	2,4E+01	1,1E+00	1,9E-01
Xilanasica	1,1E+02	2,6E+00	5,4E+00	3,0E+01
Pectinasica	9,8E+01	3,2E+00	6,9E+00	2,6E+01
Caffeolesterasica	1,2E+03	1,1E+03	1,1E+02	2,2E+01
Feruloilesterasica	2,2E+03	7,1E+02	2,9E+02	6,1E+01

L'analisi dei dati pone in evidenza una diversa capacità dei substrati di indurre la produzione di differenti attività enzimatiche ed in particolare, si osserva che le attività maggiori sono così ripartite: xilanasica, pectinasica e arilesterasiche dalla fermentazione di graspi d'uva, cellulasica dalla crusca di grano e (laccasica e caffeolesterasica dai vinaccioli. Si intravede quindi, un interessante utilizzo simultaneo di questi substrati per la possibile complementazione della produzione enzimatica in un'unica fermentazione. Interessante notare che seppure l'effetto di una specie chimica è ben dimostrato che possa indurre la produzione di enzimi specifici, le differenti specificità delle matrici naturali complesse, come quelle

derivanti da scarti agroalimentari, sembrano tuttavia mantenere le medesime selettività.

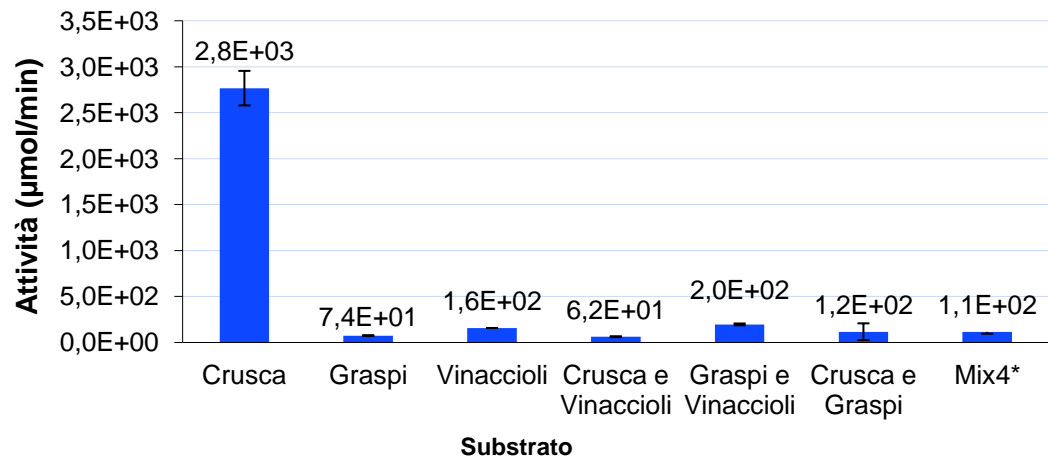
3.3.3.1 Analisi e confronto delle attività enzimatiche dei mix di substrati

Le conclusioni del paragrafo precedente inducono a verificare gli eventuali effetti sinergici dei substrati di crescita così come le loro caratteristiche di effettore e/o inibitori dell'attività enzimatica da parte del *Pleurotus ostreatus*, sono state realizzate fermentazioni su stato solido con diversi mix di substrati.

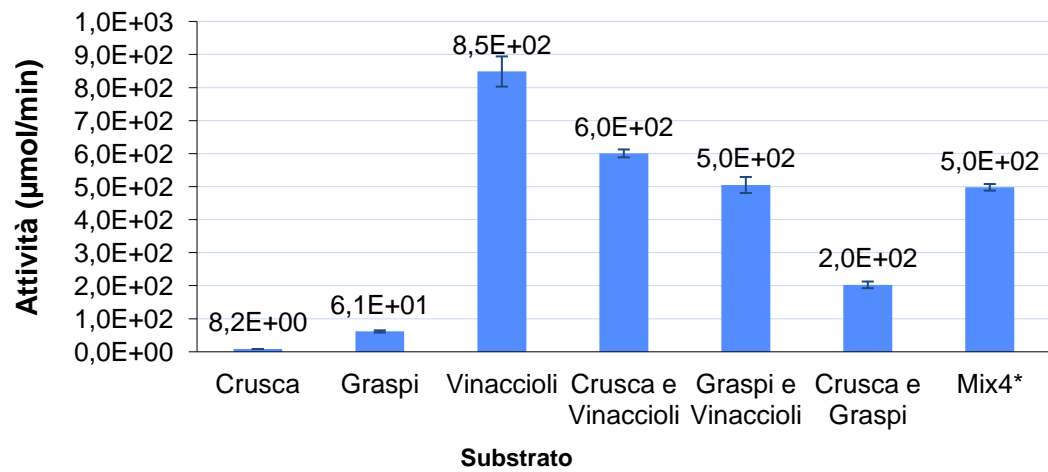
Le miscele di substrato sono state preparate utilizzando 25g di ogni substrato in modo da mantenere i 50g totali di biomassa utilizzati in tutte le fermentazioni contenenti i singoli substrati. Il mix contenente graspi-paglia-crusca-vinaccioli, viene preparato con un quarto del peso di ogni substrato in rispetto a quando utilizzati singolarmente. Il fermentatore in stato solido viene preparato come descritto nel paragrafo 5.3.2.

La fermentazione viene condotta per 21 giorni, in quanto nella quarta settimana si è sviluppata una forte contaminazione fungina che non ha permesso di effettuare il recupero e analisi del quarto percolato. Le rilevazioni delle attività enzimatiche sono state eseguite ogni sette giorni (recupero settimanale del percolato).

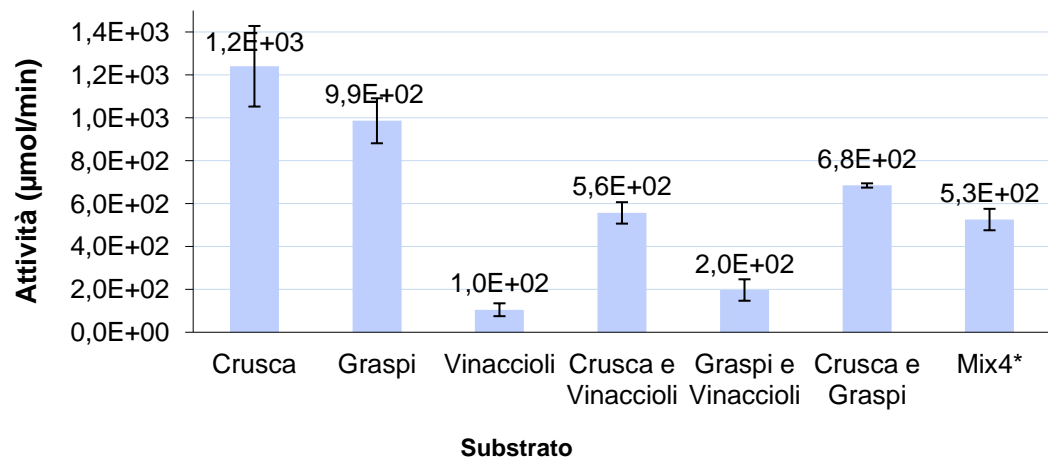
Cellulasica (Zuccheri riducenti)



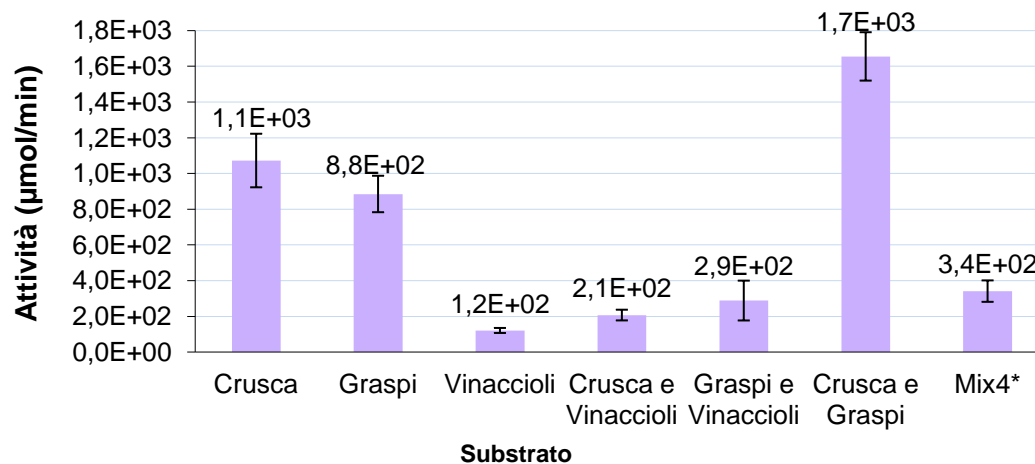
Laccasica



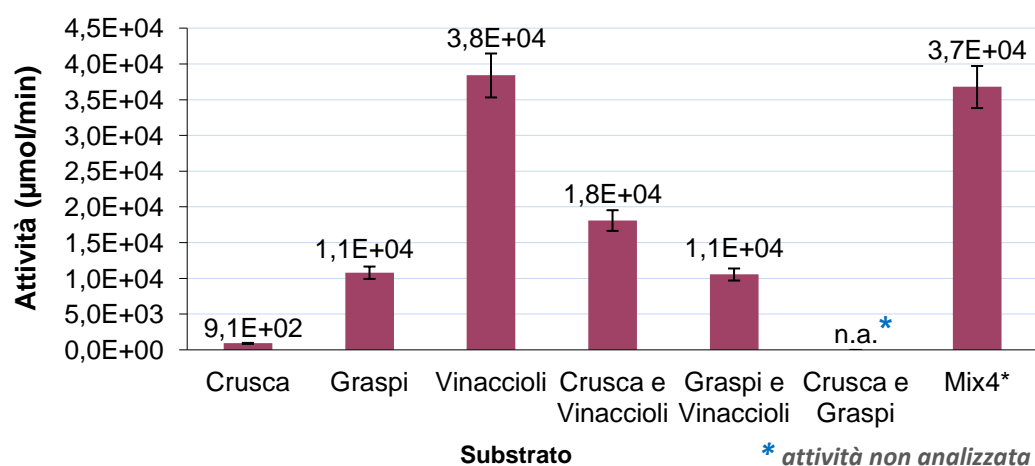
Xilanasica



Pectinasi



Caffeolesterasi



Feruloilesterasi

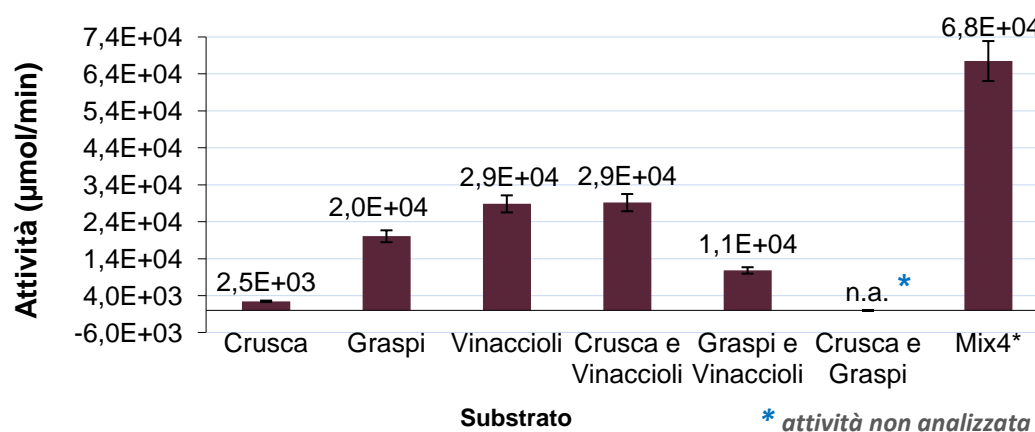


Figura 3.41: Confronto tra le sommatorie delle attività (µmol/min) ottenute con la fermentazione dei singoli substrati crusca, vinaccioli, graspi e dei mix di substrati crusca-vinaccioli, graspi-vinaccioli, crusca-graspi e mix4 (*graspi-crusca-paglia-vinaccioli) ottenute nelle prime 3 settimane di fermentazione.

In Figura 3.41, vengono confrontate le sommatorie delle attività enzimatiche prodotte nelle fermentazioni con singoli substrati e con i diversi mix di substrati. Si osserva che per le attività carboidrasiche, la crusca di grano presenta le attività cellulasiche (zuccheri riducenti) e xilanasica maggiori, invece per quanto riguarda l'attività pectinasi, questa si presenta più elevata con il mix di substrati crusca-graspi che è infatti composta dai substrati che singolarmente avevano espresso i valori più significativi per questa classe enzimatica.

Per quanto riguarda l'attività laccasica il substrato di vinaccioli risulta essere il più interessante. La mancata produzione di attività carboidrasiche nei diversi mix lascia ipotizzare un'azione inibente della matrice dei vinaccioli sui substrati di crusca e graspi. È ragionevole quindi pensare che i differenti substrati agiscano sia da induttori sia da inibitori rispetto alle specificità di ogni singola matrice.

Per quanto riguarda il mix4, questo presenta elevate attività arilesterasiche, maggiori o uguali rispetto a quelle riscontrate nelle matrici separate. Il valore di attività feruloilesterasica è, invece, molto superiore ai singoli substrati. Questi risultati ci inducono ad ipotizzare che esista quindi un effetto sinergico dei substrati che stimola la produzione di alcuni enzimi da parte del basidiomicete. È anche interessante notare che gli effetti di induzione o di inibizione non sembrano essere “dose dipendenti” ma più strettamente legati a sinergie incrociate tra effettori ed inibitori.

Si osserva quindi, che nei substrati fermentati singolarmente si registrano determinate attività elevate, ovvero, sembrerebbe che il fungo focalizzi la produzione in base alla matrice su cui si sviluppa inibendo o inducendo il rilascio degli enzimi necessari alla degradazione del substrato. Inoltre, con il mix4 è possibile ottenere una sovrapproduzione dell'attività feruloilesterasica. Probabilmente, regolando la miscela di substrati, con il giusto rapporto di ogni tipologia di substrato, si potrebbe in futuro sovrapprodurre anche le altre classi enzimatiche.

Gli effetti dei substrati sono stati elaborati attraverso un'analisi comparativa normalizzata circa la produzione delle diverse classi di attività enzimatica. Alle attività enzimatiche complessive (Figura 3.41) sono stati assegnati dei valori arbitrari attraverso una scala di grandezza proporzionali da 1 a 5 dove: 1

rappresenta il valore minore e 5 il valore maggiore di attività rilasciata per una determinata classe enzimatica (Tabella 3.6).

Comparando i dati prodotti dalle diverse combinazioni di substrati, si è cercato di evidenziare gli effetti di induzione o inibizione da parte delle matrici vegetali sulla produzione enzimatica. È interessante osservare in Tabella 3.6 come per le attività carboidrasiche (cellulasica e xilanasica) sono indotte dalla crusca ovvero dalla matrice vegetale più ricca di cellulosa ed emicellulose di una tipica monocotiledone (Tabella 3.5). Interessante notare, invece, che l'attività pectinasica è prodotta maggiormente in presenza di graspi d'uva che rappresenta una matrice vegetale caratterizzata dalla presenza di sostanze pectiche tipica di una dicotiledone (Tabella 3.5). Tuttavia, le attività enzimatiche maggiormente espresse da una tipica matrice vegetale, come per esempio la cellulasica o la xilanasica in presenza di crusca, tendono a ridursi nei mix i cui effetti non risultano quindi additivi. Tale risultato può essere quindi interpretato come un'azione inibente o modulante dell'attività enzimatica da parte di matrici che svolgono un'azione antagonista. Per esempio, le matrici dei graspi o dei vinaccioli, quando presenti nei mix, sembrano contrastare l'azione induttiva della crusca nella sintesi dell'attività sia cellulasica sia xilanasica. Questa azione antagonista sulle carboidrasi sembra piuttosto evidente con l'utilizzo dei vinaccioli come anche evidenziato dalla produzione dell'attività pectinasica. L'attività laccasica è maggiormente prodotta con i vinaccioli in quanto rappresenta una matrice particolarmente ricca di lignina. La presenza dei vinaccioli nei mix induce la produzione di laccasi senza subire un significativo effetto antagonista delle altre matrici. L'attività laccasica sembra quindi dipendere soltanto dalla presenza di frazioni ligniniche a differenza delle attività carboidrasiche che sembrano quindi risentire negativamente dell'elevata presenza di frazioni fenoliche in soluzione.

Le attività arilesterasiche sono tipicamente indotte dalla presenza dei vinaccioli, tale effetto sembra ragionevole in quanto le arilesterasi agiscono per separare le frazioni emicellulosiche dalla lignina. Per questo motivo sono debolmente prodotte nei mix in cui non vi è presenza di vinaccioli.

Tabella 3.6: Analisi comparativa delle sommatorie delle attività ($\mu\text{mol}/\text{min}$) rilasciate nelle fermentazioni con i singoli substrati e mix di substrati. I valori vengono riportati in una scala da 1 a 5, dove: 1 rappresenta il valori più basso e 5 il più elevato.

*graspi-crusca-paglia-vinaccioli - *attività non analizzata

<i>Attività Cellulasica (zuccheri riducenti)</i>				
	Crusca	Graspi	Vinaccioli	Mix4*
Crusca	5	2	1	2
Graspi		1	2	
Vinaccioli			2	

<i>Attività Laccasica</i>				
	Crusca	Graspi	Vinaccioli	Mix4*
Crusca	1	2	4	3
Graspi		2	4	
Vinaccioli			5	

<i>Attività Xilanasica</i>				
	Crusca	Graspi	Vinaccioli	Mix4*
Crusca	5	3	2	2
Graspi		4	1 o 2???	
Vinaccioli			1	

<i>Attività Pectinasica</i>				
	Crusca	Graspi	Vinaccioli	Mix4*
Crusca	4	5	1 o 2???	2
Graspi		3 o 4???	2	
Vinaccioli			1	

<i>Attività Caffeoilesterasica</i>				
	Crusca	Graspi	Vinaccioli	Mix4*
Crusca	1	n.a.*	3	5
Graspi		2	2	
Vinaccioli			5	

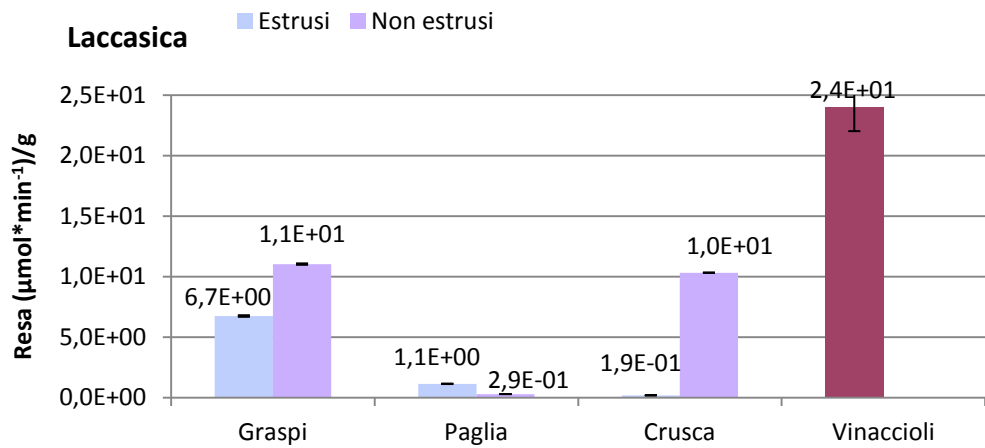
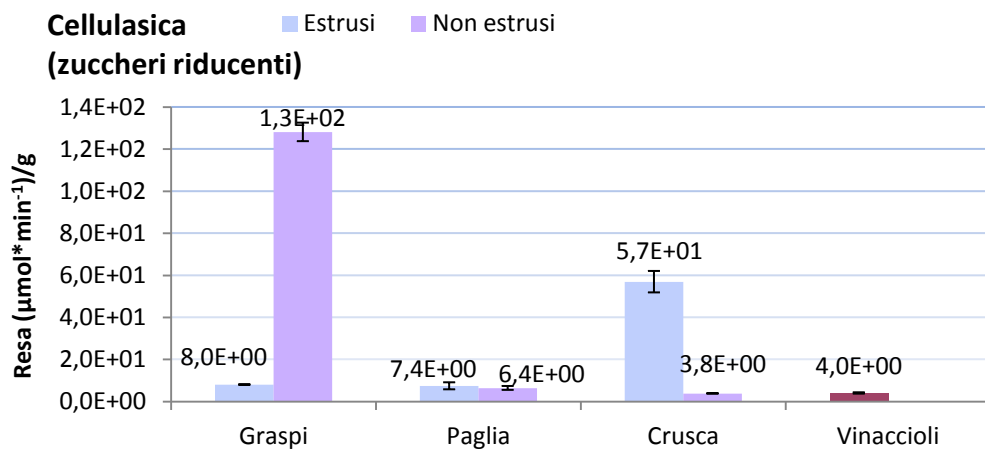
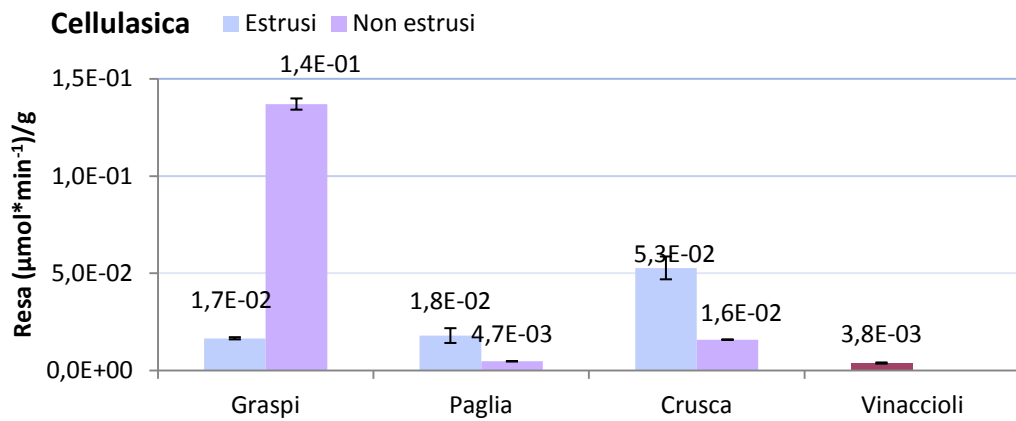
<i>Attività Feruloilesterasica</i>				
	Crusca	Graspi	Vinaccioli	Mix4*
Crusca	1	n.a.*	3	5
Graspi		2	2	
Vinaccioli			3	

Si può quindi parlare di effetti di inibizione sulle carboidrasi in presenza di vinaccioli mentre di forte induzione da parte dei vinaccioli sulle laccasi e sulle arilesterasi. Non si sono osservati fenomeni di tipo sinergico nei mix di substrati. Queste considerazioni sono ancora più evidenti nei MIX4 in cui la produzione degli enzimi carboidrasici e delle laccasi è sostanzialmente una media di quelli ottenuti nei mix a due substrati mentre risulta fortemente indotta quella degli enzimi arilesterasici.

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

La fermentazione in stato solido che viene sottoposta a una fase di estrusione periodica si può definire come dinamica rispetto a quella statica tradizionale. La fermentazione dinamica esplorata in questo lavoro, mostra fenomeni diversi 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.

I risultati mostrano che le migliori attività carboidrasiche si ottengono con le matrici più ricche di fibre polisaccaridiche come la paglia e la crusca, mentre le attività fenolossidasiche (laccasi) vengono espresse con le matrici ricche di lignina come i vinaccioli e in parte la paglia (Figura 3.42). 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.



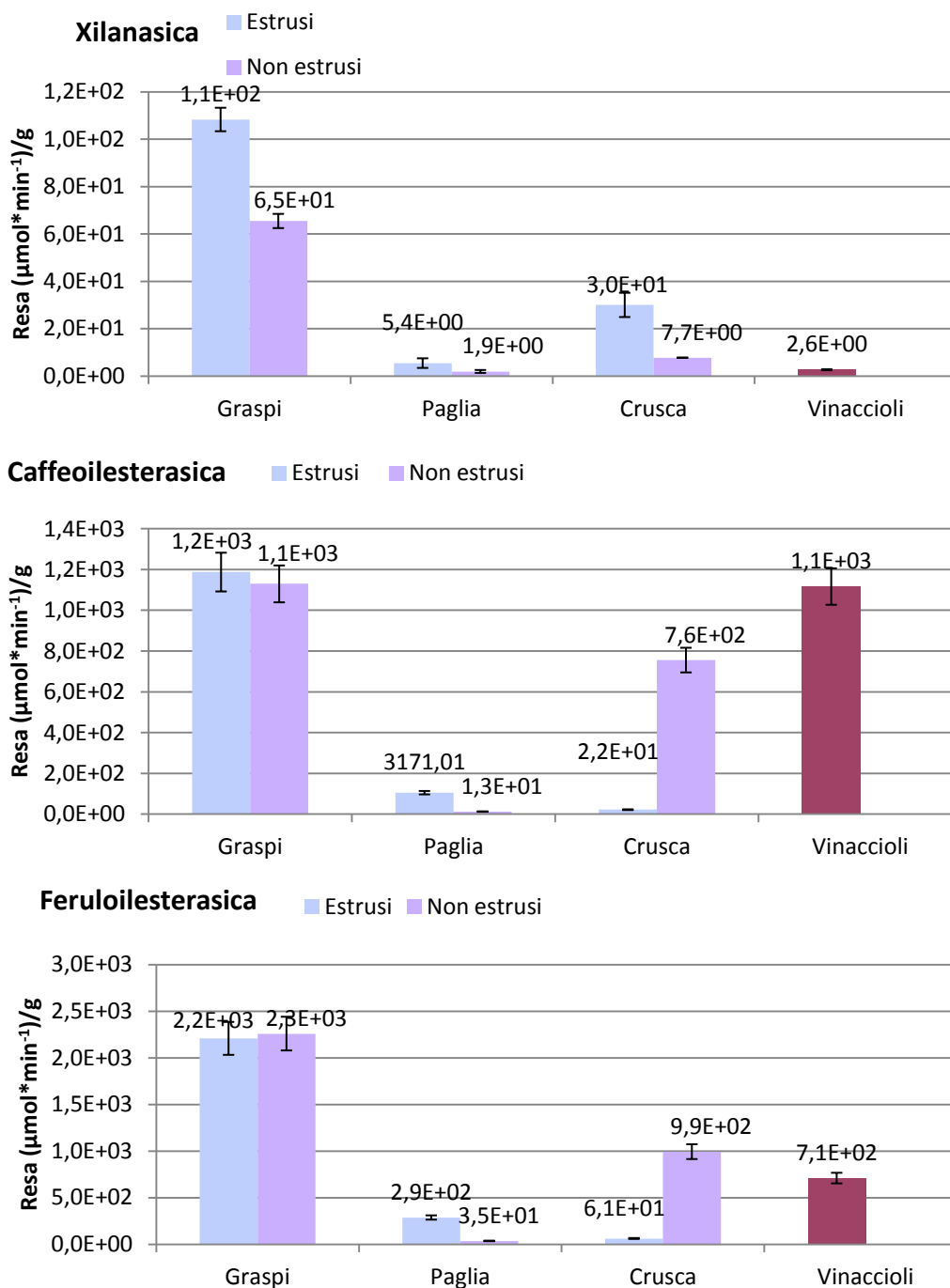


Figura 3.42: Confronto delle rese calcolate dalle sommatorie (4 settimane) per 50g di substrato, delle varie attività enzimatiche con e senza il processo di estrusione ((μmol*min⁻¹)/g)

L'effetto dell'estrusione è ben visibile mettendo a confronto le rese delle fermentazioni in stato solido dinamiche con quelle statiche Figura 3.42, infatti, i bioreattori dinamici presentano un aumento significativo della maggior parte delle attività enzimatiche.

E' evidente, in particolare come vi siano degli incrementi nelle attività cellulasiche e xilanasiche degli enzimi estratti dalla crusca. La paglia di grano anche se non ha avuto aumenti così evidenti, presenta comunque maggiori rilasci di tutte le attività in corrispondenza delle fermentazioni dinamiche. I grappi d'uva invece non dimostrano grandi miglioramenti, tranne nel caso dell'attività xilanastica.

Per quanto riguarda i dati inerenti ai vinaccioli, questi non dispongono di un confronto in quanto non sono state realizzate fermentazioni in stato solido statiche. Si può comunque osservare come le attività calcolate (specialmente laccasica, caffeoilsterasica e feruloilsterasica) siano elevate.

Stuart et al. (1999) hanno osservato che in fermentazioni in stato solido con la crusca di grano, la crescita fungina di *Aspergillus oryzae* è migliorata nel bioreattore con tamburo rotante (agitazione) rispetto alle condizioni statiche. Le condizioni dinamiche sono state ottenute attraverso una movimentazione della biomassa complessiva senza sottoporla a particolari stress estrusivi. Questo miglioramento viene attribuito agli effetti dei fenomeni di trasporto come miscelazione, taglio, trasferimento di calore e di massa all'interno del letto del substrato.

3.4 Valorizzazione dei sottoprodotti della lavorazione di funghi Champignon: gambetto e terriccio di crescita esausto

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 d'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, nell'ordine di qualche decina di migliaia di euro.

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 di tipo statico.

Sono state quindi eseguite indagini preliminari come descritto nel paragrafo 5.8 per valutare la presenza di attività enzimatiche in scarti di lavorazione di funghi Champignon sia sui gambetti, definiti come "funghi", che sul letto esausto di crescita, definito come "terriccio".

La Figura 3.43 mostra che entrambe le matrici analizzate presentano buone attività di enzimi idrolitici come cellulasi, xilanasi e pectinasi). I valori più elevati si sono riscontrati nel caso del terriccio fatta eccezione per l'attività cellulastica determinata con la carta funzionalizzata, dimostrando una presenza maggiore di endocellulasica in questa matrice.

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.

I risultati, anche se non approfonditi, dimostrano un'interessante varietà di attività enzimatiche che possono aprire a nuovi potenziali utilizzi nel settore della valorizzazione di questi sottoprodotti.

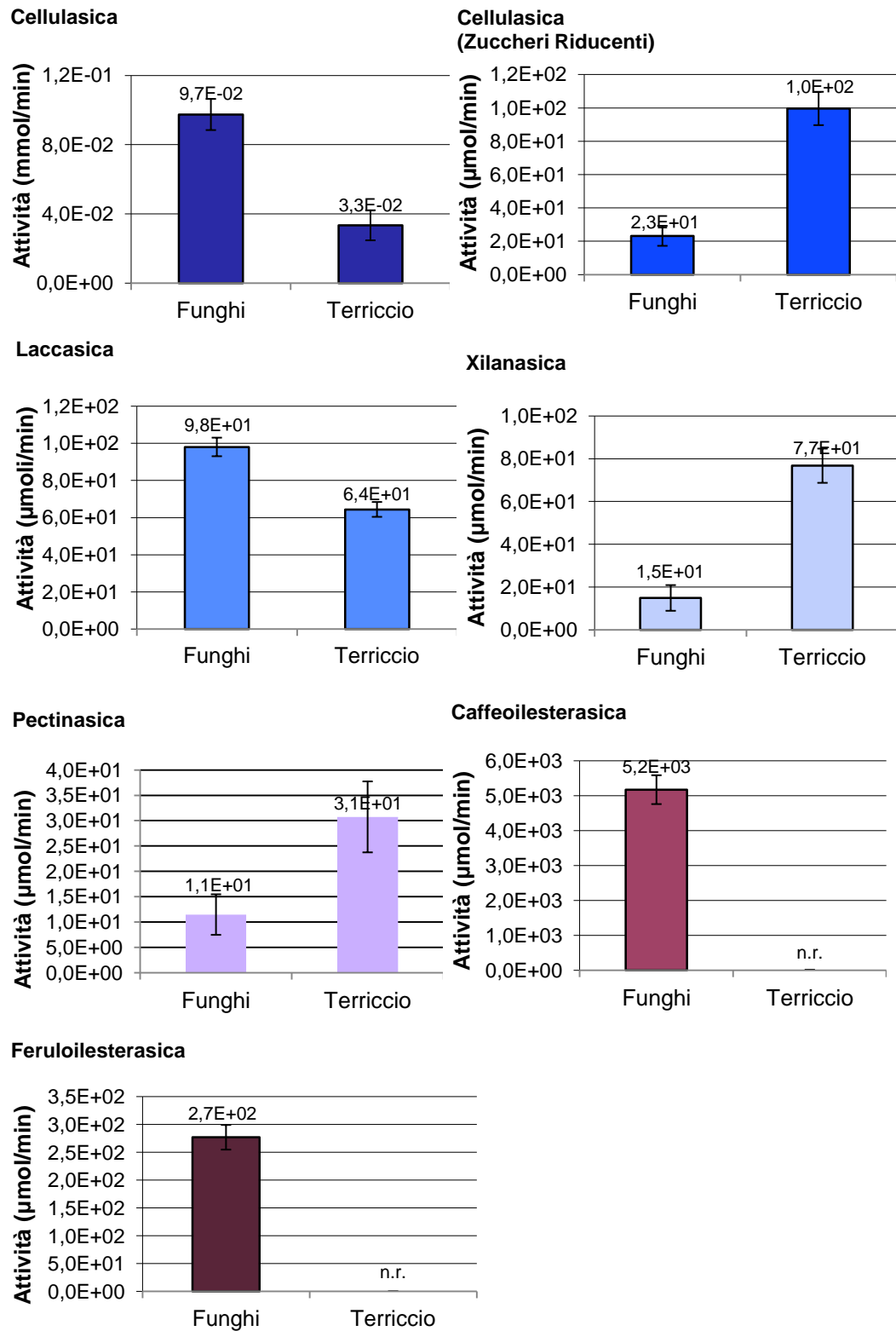


Figura 3.43: Valori di attività enzimatica presenti in 50g di sottoprodotto dalla lavorazione di *Agaricus bisporus* “funghi” (gambo) e “terriccio” (lettiere di crescita)

3.5 Processi d'idrolisi enzimatica sui sottoprodotti agroalimentare 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, 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 di grano 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 di grano) allo scopo di valutare la liberazione di sostanze tipiche dell'azione idrolitica quali zuccheri riducenti e sostanze polifenoli come descritto nei paragrafi 5.4.4^{II} e 5.7 rispettivamente.

InErrore. L'autoriferimento non è valido per un segnalibro. Tabella 3.7, vengono riportate le concentrazioni degli zuccheri riducenti rilasciati in soluzione successivamente all'idrolisi enzimatica realizzata come descritto nel paragrafo 5.6. 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 separatamente per l'enzima e per il substrato trattato termo-meccanicamente riportandoli al volume aggiunto. Le attività vengono determinate come quantità rilasciata di glucosio normalizzata all'unità di volume.

Tabella 3.7: Concentrazione di **zuccheri riducenti** rilasciata dai 4 substrati trattati con i 6 diversi percolati ai diversi tempi (0, 24 e 45 ore) - (Aumento o riduzione percentuale calcolate sul maggiore incremento rispetto al tempo zero).

ZUCCHERI RIDUCENTI (METODO ADNS)					
SUBSTRATO	ENZIMA (Percolati)	CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO AL TEMPO ($\mu\text{mol/ml}$)			AUMENTO (%)
		0 h	24 h	45 h	
GRASPI	Graspi	2,9E+01	6,7E+01	6,8E+01	130
	Vinaccioli	1,2E+01	5,6E+00	5,4E+00	-55
	Paglia	1,4E+01	7,0E+00	7,1E+00	-49
	Crusca	7,1E+00	1,1E+01	8,1E+00	54
	Champignon	7,8E+00	5,7E+00	5,2E+00	-27
	Terriccio	6,4E+00	8,1E+00	8,3E+00	30
VINACCIOLI	Graspi	3,6E+01	8,5E+01	7,5E+01	140
	Vinaccioli	1,9E+01	1,0E+01	1,0E+01	-46
	Paglia	2,1E+01	1,6E+01	1,5E+01	-24
	Crusca	1,4E+01	3,1E+01	2,5E+01	120
	Champignon	2,0E+01	1,2E+01	5,7E+00	-41
	Terriccio	1,9E+01	1,2E+01	1,2E+01	-33
PAGLIA	Graspi	3,0E+01	7,3E+01	7,6E+01	150
	Vinaccioli	1,3E+01	8,0E+00	7,9E+00	-39
	Paglia	1,4E+01	1,0E+01	9,8E+00	-28
	Crusca	7,9E+00	2,4E+01	2,1E+01	210
	Champignon	1,4E+01	2,2E+01	6,3E+00	54
	Terriccio	1,3E+01	2,3E+01	1,2E+01	77
CRUSCA	Graspi	3,2E+01	7,5E+01	5,7E+01	140
	Vinaccioli	1,5E+01	2,0E+01	2,0E+01	33
	Paglia	1,6E+01	2,5E+01	2,5E+01	49
	Crusca	9,8E+00	7,2E+01	5,8E+01	640
	Champignon	1,8E+01	4,5E+01	3,2E+01	150
	Terriccio	1,7E+01	5,4E+01	5,0E+01	220

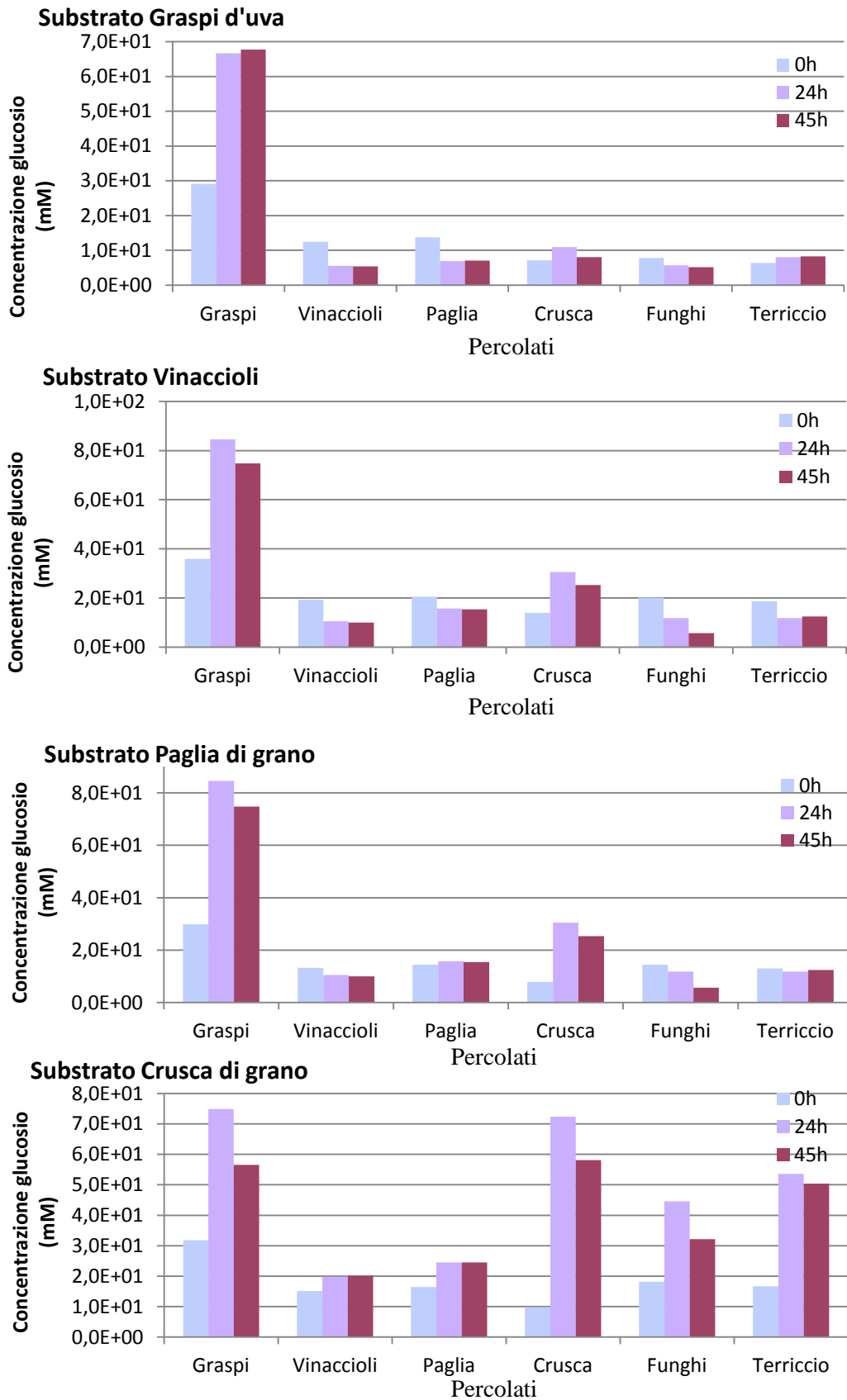


Figura 3.44: Concentrazione di **zuccheri riducenti** rilasciata dai substrati trattati con i 6 diversi percolati ai diversi tempi (0, 24 e 45 ore)

Si può notare (Figura 3.44) come per tutti i substrati, la produzione di zuccheri riducenti sia massima con l'aggiunta del percolato ricavato dai graspi d'uva e dalla crusca di grano coerentemente con il valore delle attività riscontrate nelle precedenti prove di fermentazione con *Pleurotus ostreatus*. 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 idrolizzata da tutti gli estratti enzimatici. Questo è probabilmente da ricondurre al fatto che le strutture arabinoxilatiche della crusca sono idrolizzabile dalle attività xilanasiche generalmente riscontrate in quantità più o meno abbondanti in tutte le prove fermentative. Nel caso specifico, la produzione di zuccheri riducenti sul substrato di crusca tramite l'azione enzimatica dell'estratto derivante dalla fermentazione su crusca, ha un valore di produzione percentuale e molare addirittura superiore a quello calcolato con l'estratto proveniente dai graspi coerentemente con il fatto che la specie fungina ha ragionevolmente prodotto la più adatta attività enzimatica.

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 realizzata in un ambiente completamente asettico, e messo in evidenza da una verifica qualitativa della presenza di alcune specie microbiche inquinanti (dati non mostrati).

Tabella 3.8: Concentrazione di **polifenoli** rilasciati dai 4 substrati trattati con i 6 diversi percolati ai diversi tempi (0, 24, 45 ore) - (Aumento o riduzione percentuale calcolate sul maggiore incremento rispetto al tempo zero).

POLIFENOLI (METODO FOLIN)					
SUBSTRATO	ENZIMA (Percolati)	CONCENTRAZIONE DI FENOLI TOTALI AL TEMPO ($\mu\text{mol/ml}$)			AUMENTO (%)
		0 h	24 h	45 h	
GRASPI	Graspi	3,5E+03	6,1E+03	4,4E+03	73
	Vinaccioli	1,2E+02	1,6E+03	4,1E+03	3300
	Paglia	2,5E+02	2,3E+02	8,4E+02	230
	Crusca	3,6E+02	4,1E+02	2,6E+03	610
	Champignon	1,1E+02	1,6E+02	7,8E+01	47
	Terriccio	1,1E+02	2,5E+02	2,6E+02	130
VINACCIOLI	Graspi	6,1E+03	5,9E+03	4,9E+03	-2,6
	Vinaccioli	2,7E+03	6,5E+02	4,5E+02	-76
	Paglia	2,8E+03	1,1E+03	2,0E+03	-31
	Crusca	2,9E+03	1,9E+03	5,4E+03	85
	Champignon	1,3E+03	6,9E+02	1,7E+02	-47
	Terriccio	1,3E+03	5,6E+02	5,0E+02	-57
PAGLIA	Graspi	4,2E+03	4,0E+03	4,7E+03	12
	Vinaccioli	7,6E+02	3,8E+02	9,5E+02	25
	Paglia	8,9E+02	1,1E+03	2,7E+03	200
	Crusca	1,0E+03	1,6E+03	8,8E+02	60
	Champignon	6,4E+02	1,3E+02	7,3E+02	14
	Terriccio	6,4E+02	4,3E+02	6,3E+02	-2,6
CRUSCA	Graspi	3,5E+03	3,2E+03	3,5E+03	-0,4
	Vinaccioli	1,4E+02	2,3E+02	4,1E+02	210
	Paglia	2,7E+02	5,7E+01	2,8E+02	6,2
	Crusca	3,7E+02	6,0E+02	9,6E+02	160
	Champignon	8,8E+01	2,6E+02	2,4E+02	190
	Terriccio	9,5E+01	1,6E+02	2,5E+02	160

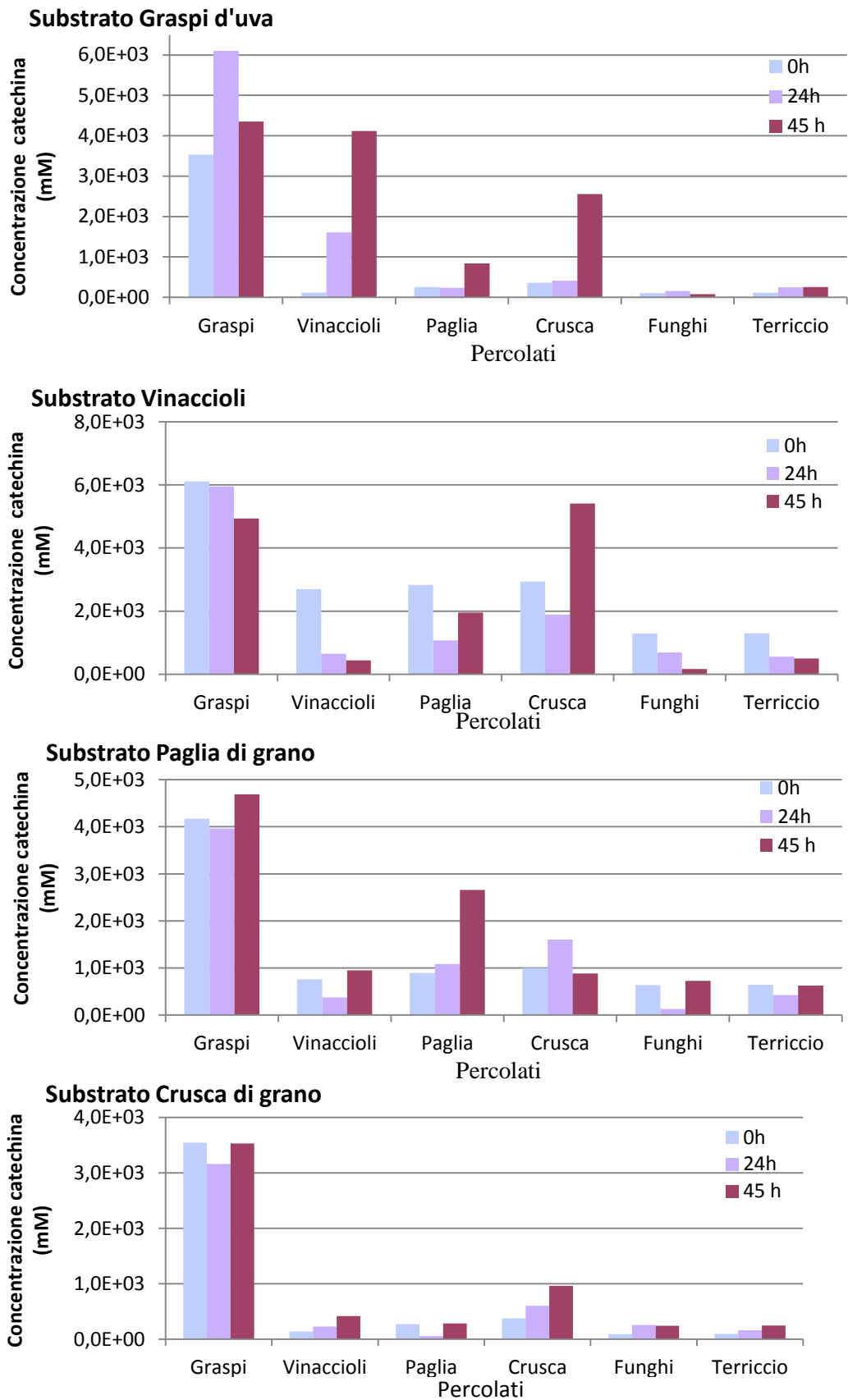


Figura 3.45: Concentrazione di polifenoli totali rilasciati dai substrati trattati con i 6 diversi percolati (0, 24, 45 ore)

In Figura 3.45 è possibile verificare gli incrementi nel tempo delle concentrazioni di polifenoli totali rilasciati in soluzione, dovuto all'azione idrolitica dei percolati enzimatici di diverse provenienze sulle matrici vegetali selezionate. Si osserva soprattutto, incrementi della concentrazione rispetto al tempo zero, di polifenoli provenienti dai sottoprodotti enologici che rilasciano quantitativi più rilevanti in soluzione in rispetto alle altre biomasse. Questo è dovuto sia alla natura delle matrici che sono ricche di polifenoli, che anche alle caratteristiche dei percolati che sono in grado di idrolizzare la struttura vegetale per liberare queste sostanze in soluzione.

Analizzando il substrato dei vinaccioli, si può osservare come la concentrazione presente prima di aggiungere l'estratto enzimatico sia già molto alta rispetto agli altri substrati. I vinaccioli rilasciano in soluzione componenti polifenoliche che si liberano durante il trattamento termo-meccanico. Si è comunque visto come l'aggiunta dell'enzima proveniente dalla crusca favorisca un'ulteriore produzione di oltre l'84% (Tabella 3.8).

Nei substrati di paglia e crusca si evidenzia una produzione abbastanza bassa di polifenoli. Si può notare come il percolato enzimatico della fermentazione della paglia, sulla stessa matrice sulla quale poi si è andato ad aggiungere, abbia un effetto maggiore rispetto agli altri.

In Tabella 3.9 viene riportata l'analisi comparativa del rilascio di zuccheri riducenti (Tabella 3.7) e frazioni fenoliche (Tabella 3.8) dalle idrolisi enzimatiche derivanti dall'aggiunta incrociata dei vari percolati ottenuti dalle fermentazioni ai singoli substrati e (graspi d'uva, vinaccioli, paglia di grano e crusca di grano).

Gli estratti enzimatici, quali percolati provenienti dalle diverse fermentazioni, che favoriscono il rilascio di zuccheri riducenti sono quelli derivanti da graspi d'uva e crusca di grano che abbiamo visto naturalmente ricchi di attività cellulasiche, xilanasiche e pectinasiche. In particolare l'estratto dai graspi è in grado di rilasciare elevate concentrazioni di zuccheri riducenti da graspi e da vinaccioli mentre l'estratto da crusca agisce prevalentemente su paglia e crusca. Sui primi si può ragionevolmente pensare che agiscano le pectinasi mentre sui secondi le cellulasi e le xilanasie. Tali dati andranno poi ulteriormente approfonditi da specifiche analisi sulla composizione degli zuccheri riducenti rilasciati in

soluzione. Dall'altra parte gli estratti enzimatici che rilasciano maggiori quantità di composti fenolici sono quelli derivanti da vinaccioli, paglia e crusca. In questo caso le interpretazioni richiedono maggiori approfondimenti a causa dell'elevato contenuto di fenoli di partenza in alcune matrici come quella dei vinaccioli.

Tabella 3.9: Analisi comparativa per la determinazione del percolato enzimatico ottimale per il rilascio di zuccheri riducenti e polifenoli di ogni tipologia di matrice vegetale tramite idrolisi

Provenienza enzima (percolati)	Substrati idrolizzati			
	Graspi	Vinaccioli	Paglia	Crusca
Graspi	Zuccheri riducenti	Zuccheri riducenti		
Vinaccioli	Polifenoli			Polifenoli
Paglia			Polifenoli	
Crusca		Polifenoli	Zuccheri riducenti	Zuccheri riducenti
Funghi				
Terriccio				

Perciò che riguarda il substrato graspi d'uva e crusca di grano, si può notare come gli estratti enzimatici (percolato) più efficaci per il rilascio dei zuccheri riducenti sia proprio quello ricavato dalle stesse matrici rispettivamente. Questo probabilmente è dovuto al fatto che il fungo produce gli enzimi necessari all'idrolisi della biomassa per ricavare i nutrienti necessari al suo sviluppo, ed il percolato enzimatico raccolto dopo questo processo, presenta quindi le condizioni ottimali per l'idrolisi delle stesse matrici.

3.6 Raffinazione

Nell'ottica di un futuro utilizzo industriale, le attività enzimatica risultano complessivamente poco elevate, per cui si è voluta esplorare la possibilità di concentrare le attività prodotte e stabilizzare il prodotto enzimatico per una sua conservazione prima dell'uso.

Sono state esplorate diverse tecniche di concentrazione e stabilizzazione come la produzione di polveri enzimatiche e/o di concentrati liquidi. La liofilizzazione e lo

spray-dry sono state utilizzate come tecniche per rendere l'estratto enzimatico pulverulento.

3.6.1 Effetti della liofilizzazione sull'estratto enzimatico

Il percolato prodotto dopo la fermentazione in stato solido viene sottoposto al processo di liofilizzazione come descritto nel paragrafo 5.5. Al fine del processo, il percolato che era ricco in zuccheri, si presenta sotto forma di polvere compatta e gommosa (Figura 3.46) che comporta una complessa fase di gestione pratica. L'analisi delle attività residue nel liofilizzato è stata determinata risospendendo la polvere in acqua distillata.

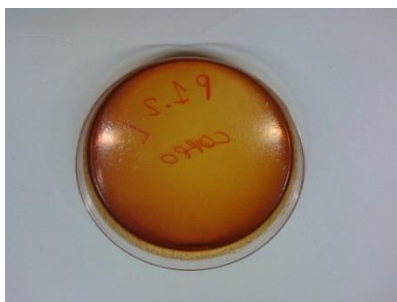


Figura 3.46: Piastra di Petri contenente il liofilizzato dell'attività prodotta dal *Pleurotus ostreatus*

In Figura 3.47 vengono riportate le attività prodotte nella prima settimana di fermentazione, analizzando il percolato tal quale e dopo il processo di liofilizzazione.

La Figura 3.47 mostra che le attività cellulasiche, pectinasiche e xilanasiche presentano una buona resistenza al processo di liofilizzazione, conservando oltre il 50% della loro attività iniziale. Invece, le attività laccasiche, caffeoilsterasiche e feruloilsterasiche hanno una perdita dell'attività enzimatica molto maggiore, arrivando a una perdita di circa 84% di quella iniziale.

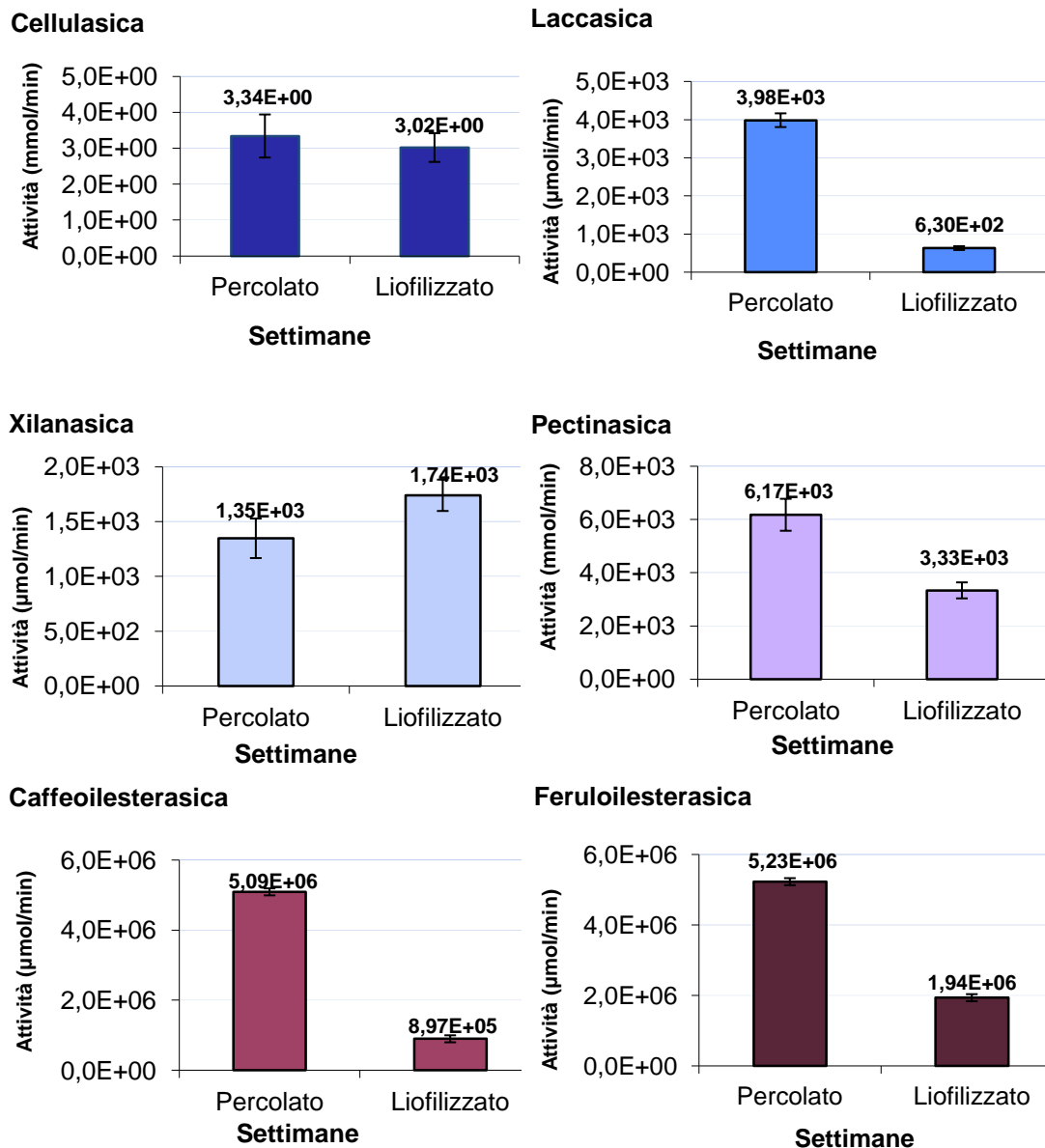


Figura 3.47: Attività enzimatiche prodotte nella prima settimana di fermentazione di un mix di substrati composto da grappi d'uva, paglia di grano, crusca di grano e vinaccioli, prima e dopo il processo di liofilizzazione

Il fenomeno della diminuzione dell'attività (Figura 3.47) è probabilmente spiegabile considerando lo stress che la struttura terziaria della proteina subisce durante il processo di solidificazione della soluzione. D'altro canto, il fenomeno della resistenza a questo passaggio critico di alcune classi enzimatiche, viene giustificato dall'elevato grado zuccherino del percolato liofilizzato.

Infatti, è possibile che gli enzimi legati agli zuccheri durante il processo di congelamento resistano di più visto che il loro sito attivo è occupato e diventa quindi meno soggetto a fenomeni di folding strutturale.

3.6.1.1 Processi d'idrolisi enzimatica su sottoprodotti agroalimentari utilizzando gli enzimi prodotti dalle SSF dinamiche tal quale e liofilizzato

Sono state eseguite alcune prove di degradazione enzimatica allo scopo di idrolizzare sottoprodotti agroalimentari come descritto nel paragrafo 5.6. 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.

Il percolato tal quale e liofilizzato ottenuti della fermentazione del mix di substrati (graspi-paglia-crusca-vinaccioli) sono stati successivamente utilizzati per valutare la sua capacità idrolitica, utilizzando come substrato una nuova miscela composta dagli stessi substrati usati nella produzione di questo percolato.

La reazione è stata portata avanti per 48 ore e sono state fatte analisi per valutare il potenziale idrolitico del percolato. Sono stati determinati gli zuccheri riducenti liberati in soluzione a 24 e 45 ore (dall'inizio dell'aggiunta di enzima) in seguito all'idrolisi tramite il saggio dell'ADNS come descritto nel paragrafo 5.4.4^{II}.

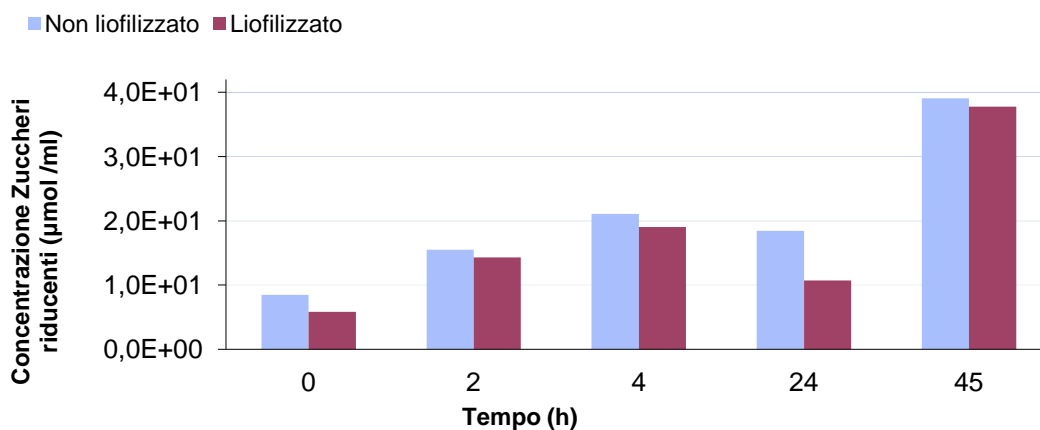


Figura 3.48: Concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati in soluzione nei processi d'idrolisi del mix di substrato (graspi d'uva, paglia di grano, crusca di grano e vinaccioli), in presenza del percolato non liofilizzato (tal quale) e liofilizzato.

I valori ottenuti (Figura 3.48) evidenziano l'efficacia degli estratti enzimatici nell'idrolisi ed estrazione di composti d'interesse. Si osserva anche in questo caso che il percolato conserva le attività cellulase, xilanasica e pectinase dopo il processo di liofilizzazione, dato che queste sono direttamente responsabili del

rilascio degli zuccheri riducenti in seguito alla degradazione della matrice vegetale.

Da questa prova si conferma che, gli enzimi prodotti dalla SSF in presenza di *Pleurotus ostreatus* agiscono degradando la matrice vegetale ed in questo modo possono essere resi disponibili una vasta gamma di sostanze di interesse ad utilizzo industriale nel settore alimentare, cosmeceutico, farmaceutico, ecc.

3.6.2 Effetti della polverizzazione tramite spray dryer sull'estratto enzimatico

Lo spray dryer è un processo adatto per la produzione continua di solidi secchi in polvere, granulato o particelle agglomerate. Il prodotto finale deve soddisfare precisi standard qualitativi in termini di distribuzione granulometrica, umidità residua, densità relativa e morfologia delle particelle ed soprattutto, è adatto per materiali termicamente sensibili come gli enzimi.

Il percolato prodotto è stato quindi polverizzato, anche se inizialmente sono state riscontrate problematiche correlate alla perdita dello stesso che si depositava sulla parete della camera di essiccamento e sul ciclone, dovuto agli zuccheri presenti in soluzione che rendevano la polvere appiccicosa. Una volta messe a punto le condizioni ottimali operative, sono state ridotte fino a circa 95% la perdita del prodotto finale.

Tabella 3.10: Attività enzimatiche prima (percolato tal quale) e dopo il processo di spray dryer (granulato)

Effetti sull'attività enzimatica – Spray dryer			
	Laccasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Xilanasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Pectinasica ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Percolato tal quale	7,4E+01	1,2E+02	1,4E+02
Granulato	5,7E+00	5,7E+01	4,8E+01

Dopo la concentrazione con lo spray dryer, il granulato viene risospeso e le attività enzimatiche vengono determinate. In Tabella 3.10 si osserva un recupero del 7,7% di attività laccasica, del 47,6% di quella xilanasica e del 33,5% di quella pectinasica. La tecnica dello spray-dry se da una parte produce un granulato più

facile da gestire dall'altra presenta minori recuperi delle attività enzimatiche anche se più rilevanti per l'attività laccasica. Questo mette in evidenza una minore resistenza degli enzimi all'esposizione alle alte temperature anche se per brevi tempi.

L'utilizzo di concentrati enzimatici può essere utile ai fini di un utilizzo pratico, presentando anche i vantaggi di essere più facilmente conservati e trasportati.

4 CONCLUSIONI

In questo lavoro di ricerca la produzione di enzimi da *Pleurotus ostreatus* è stata studiata utilizzando diverse tipologie di bioreattori in stato solido statici (biocella e colonna a letto impaccato) e dinamici (biocella con processo di estrusione). Per quanto riguarda la SSF statica, la biocella ha mostrato i migliori risultati in termini di resa di produttività enzimatica rispetto al bioreattore su colonna a letto impaccato. Il reattore a biocella è stato sviluppato prendendo in considerazione diversi substrati per la crescita del fungo *Pleurotus ostreatus*.

I reattori a biocella hanno messo in evidenza un'interessante aspetto legato alla produzione di attività enzimatica che è inversamente dipendente dalla frequenza dei prelievi; infatti, i prelievi settimanali hanno presentato una produzione enzimatica significativamente più elevata rispetto agli intervalli di campionamento più lunghi (14 e 28 giorni). Questa condizione concorderebbe in modo ragionevole con un fenomeno per cui il micelio venga indotto ad una continua produzione di attività enzimatica durante il periodo in cui questa viene sottratta. Ciò sembra indice dell'instaurarsi di un meccanismo all'equilibrio in cui la produzione di enzima è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima stesso nel bioreattore.

Attraverso i valori ipotetici di potenziale massimo di resa delle diverse attività enzimatiche espressi con i diversi substrati, si è potuto valutare la capacità di ogni substrato di indurre la produzione delle singole classi enzimatiche. Le attività con alti valori di potenziale massimo di produzione al tempo zero presentano un dato importante per un possibile sviluppo di un processo di produzione in continuo, poiché per andamenti rappresentati da una pendenza maggiore della retta, è ragionevole ipotizzare una diminuzione dell'attività all'aumentare dell'intervallo di prelievo e una produzione enzimatica maggiore se la rimozione del percolato avvenisse secondo un processo continuo.

Le condizioni operative sono di fondamentale importanza per l'ottimizzazione della produzione e della crescita fungine all'interno dei fermentatori a stato solido. Un SSF in continuo è sicuramente di difficile esecuzione, tuttavia, i calcoli che stimano il potenziale massimo di produzione, direzionano ipoteticamente l'incremento della produzione a questa tipologia di fermentatore dove l'intervallo

tra i prelievi tende a zero. Nonostante queste considerazioni siano del tutto ipotetiche, fanno intravedere diverse operazioni di ottimizzazione per incrementare le rese di produzione. Questi modelli di previsione sono risultati del tutto originali rispetto ai dati disponibili in letteratura.

I valori ottenuti dalle fermentazioni in stato solido dinamiche, sono stati messi in evidenza dal confronto con i dati delle fermentazioni in stato solido statiche, ovvero, prive di un passaggio estrusivo della matrice, (Masutti et al. 2012), da cui si è osservato un incremento considerevole della produzione di alcune attività enzimatiche. 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 la diffusione dell'ossigeno, l'area superficiale del substrato e la permeabilità dell'acqua quale solvente di estrazione.

È interessante osservare come si verificano effetti di induzione o inibizione da parte delle matrici vegetali sulla produzione enzimatica. Le attività carboidrasiche (cellulasica e xilanasica) sono indotte dalla crusca di grano, ovvero, dalla matrice vegetale più ricca di cellulosa ed emicellulose (monocotiledone), e l'attività pectinasica è prodotta maggiormente in presenza di graspi d'uva che rappresenta una matrice vegetale caratterizzata dalla presenza di sostanze pectiche (dicotiledone).

Le matrici dei graspi o dei vinaccioli, quando presenti nei mix, sembrano contrastare l'azione induttiva della crusca nella sintesi dell'attività sia cellulasica sia xilanasica. La presenza dei vinaccioli nei mix di substrati, induce la produzione di laccasi senza subire un significativo effetto antagonista delle altre matrici. L'attività laccasica sembra quindi dipendere soltanto dalla presenza di frazioni ligniniche, a differenza delle attività carboidrasiche che sembrano quindi risentire negativamente dell'elevata presenza di frazioni fenoliche in soluzione.

Le attività arilesterasiche sono tipicamente indotte dalla presenza dei vinaccioli, tale effetto sembra ragionevole in quanto le arilesterasi agiscono per separare le frazioni emicellulosiche dalla lignina. Per questo motivo sono debolmente prodotte nei mix in cui non vi è presenza di vinaccioli.

Si può quindi parlare di effetti di inibizione sulle carboidrasi in presenza di vinaccioli mentre di forte induzione da parte dei vinaccioli sulle laccasi e sulle arilesterasi. Non si sono osservati fenomeni di tipo sinergico nei mix di substrati.

La capacità idrolitica dei percolati raccolti da fermentazioni in stato solido dinamico nella degradazione degli stessi substrati vegetali, sui quali erano cresciuti i funghi, 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 grappi 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.

Abbiamo dimostrato come i percolati presentano caratteristiche reologiche tali da essere trasformati in polveri utilizzando processi di liofilizzazione e di spray dryer. Tutti gli enzimi hanno mostrato una discreta resistenza ai processi di polverizzazione, anche se si sono registrati cali significativi per alcune attività specifiche come quelle legate alle fenolossidasi e arilesterasi. Le cellulasi e le xilanasi si sono invece rivelati enzimi più resistenti al processo di liofilizzazione, non registrando praticamente perdite a seguito del trattamento.

Sotto il profilo applicativo, le differenti produzioni di attività enzimatica strettamente dipendenti dal tipo di substrato utilizzato per la crescita del *Pleurotus ostreatus* costituiscono delle importanti indicazioni al fine di valutare l'opportuna matrice vegetale da utilizzare. Tale presupposto apre la possibilità di studiare opportune combinazioni di matrici vegetali al fine di ottimizzare la produzione di specifici o ampi profili di attività enzimatiche su scala industriale.

I risultati ottenuti lasciano intravedere la possibilità di sviluppo di un processo integrato di valorizzazione degli scarti agroalimentari da utilizzarsi per la produzione degli enzimi necessari ad un processo di bioraffinazione per la demolizione orientata delle pareti cellulari al fine di recuperare le componenti chimiche in esse contenute.

5 MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione del terreno di coltura agarizzato con estratto di malto

E' stato utilizzato il seguente terreno di coltura solido per la crescita del *Pleurotus ostreatus*:

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 (acquistato presso l'Azienda Agricola Funghi Mara ®, BO) e lo si inocula al centro di una piastra di Petri agarizzata con il terreno a base di malto e posto in stufa a 25-30°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 nuove piastre agarizzate con un terreno di uguale composizione. La crescita delle colonie avviene in stufa a 25-30°C.

5.2 Fermentazione in stato solido statica

La produzione enzimatica da parte del fungo *Pleurotus ostreatus* viene indotta all'interno di due diverse tipologie di fermentatore in stato solido statico: biocella e colonna a letto impaccato.

5.2.1 Fermentazione in stato solido statica in biocella

Il processo di fermentazione in stato solido statico utilizza un reattore 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 (Figura 5.1). Come substrato di

crescita per il fungo filamentoso della specie *Pleurotus ostreatus*, sono stati utilizzati 50g di sottoprodotti ottenuti da processi agroindustriali:

- paglia di grano (50 g peso secco)
- lolla di riso (50 g peso secco)
- graspi d'uva rossa (50 g peso umido = 9,1 g peso secco)
- crusca di grano (50 g peso secco)



- **Figura 5.1:** SSF a biocella sviluppati in laboratorio su pirex da 500 ml e tappo in cotone subito dopo l'inoculo con *Pleurotus ostreatus*.

La biocella è stata sterilizzata in autoclave (120°C per 20 minuti), e inoculata a temperatura ambiente con 7,5 g di *Pleurotus ostreatus* cresciuto preventivamente in piastra su estratto di malto agarizzato come descritto nel paragrafo 5.1. Il fungo *Pleurotus ostreatus* è posto a contatto con la matrice vegetale ed il percolato (frazione liquida) prodotto viene raccolto aggiungendo una quantità nota d'acqua sterile (sufficiente al prelievo del percolato) con l'ausilio di una pipetta sterile. Il percolato viene infine centrifugato (13000 rpm per 5 minuti) per eliminare eventuali frazioni solide presenti in sospensione ed i saggi enzimatici vengono realizzati al fine di determinare le attività prodotte.

La matrice presente all'interno della biocella eseguirà un altro ciclo di fermentazione.

5.2.2 Fermentazione in stato solido statica in colonna a letto impaccato

Nella fermentazione in colonna a letto impaccato, il bioreattore viene sterilizzato in autoclave a 120°C per 20 minuti. La matrice vegetale e il micelio del fungo vengono impaccati in una colonna alternando strati di biomassa e argilla espansa (matrice inerte e porosa). Come substrato sono stati utilizzati 120 g di graspi

d'uva umidi (21,8 g peso secco), sterilizzati in autoclave in cui sono stati inoculati 15 g di colonie di *Pleurotus ostreatus* cresciute su estratto di malto agarizzato. La fermentazione nella colonna a letto impaccato ha avuto una durata di 42 giorni, con prelievi realizzati settimanalmente facendo ricircolare il percolato per 30 minuti all'interno della colonna impaccata, tramite una pompa peristaltica, una quantità nota di acqua sterile in cui vengono raccolti i prodotti di fermentazione.

Il percolato viene infine raccolto, centrifugato (13000 rpm per 5 minuti) per eliminare eventuali frazioni solide presenti in sospensione ed i saggi enzimatici vengono realizzati al fine di determinare le attività prodotte.

Il bioreattore è stato mantenuto ad una temperatura esterna di circa 20°C e l'ossigenazione consentita dai tappi in cotone poste nei punti di apertura del sistema.

5.3 Fermentazione in stato solido dinamica

5.3.1 Pretrattamenti termo-meccanici delle matrici vegetali

Il pre-trattamento meccanico è stato eseguito con un omogeneizzatore a taglio mentre il pre-trattamento termico consiste nell'autoclavare il substrato vegetale prima dell'inoculo del fungo *Pleurotus 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 al fine di ridurre gli effetti di una contaminazione esterna.

5.3.2 Fermentazione in stato solido dinamica in biocella con processo di estrusione

Il processo di fermentazione in stato solido dinamico viene preparato come descritto nel paragrafo 5.2.1. Come substrato di crescita per il fungo filamentoso della specie *Pleurotus ostreatus*, sono stati utilizzati 50g di sottoprodotti ottenuti da processi agroindustriali:

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

La biocella è stata sterilizzata in autoclave (120°C per 20 minuti), e inoculata a temperatura ambiente con 7,5 g di *Pleurotus ostreatus* cresciuto preventivamente in piastra su estratto di malto agarizzato come descritto nel paragrafo 5.1.

La reazione in biocella ha durata di fermentazione di 28 giorni, ad una temperatura di 20°C, il sistema viene chiuso con un tappo in cotone che consente l'ossigenazione del sistema 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 ogni 7 giorni attraverso un trattamento meccanico di estrusione tale da ottenere una riduzione delle dimensioni del substrato e contemporaneamente movimentare le ife del fungo allo scopo di aumentare il processo fermentativo.

L'operazione di estrusione viene effettuata tramite l'utilizzo di un estrusore a coclea opportunamente sterilizzato per ridurre fenomeni di contaminazione esterna. L'apparato estrusore (Figura 5.2) è costituito da una coclea in grado di comprimere la matrice su una griglia forata avente fori del diametro di 5 mm.

La procedura consiste quindi in più stadi: passaggio all'interno del estrusore a coclea, estrazione del percolato, aggiunta di un'aliquota d'acqua distillata sterile pari alla quantità di percolato rimossa e reinserimento della biomassa all'interno della biocella.

Dopodiché, un trattamento di filtrazione sotto pressione (il composto viene strizzato manualmente con un panno sterile) ci permette di ottenere il percolato che verrà centrifugato (13000 rpm per 5 minuti) ed infine verranno realizzati i saggi per la determinazione delle attività enzimatiche.

Prima di reinserire il substrato nel reattore per il successivo ciclo di fermentazione, viene aggiunta un'aliquota d'acqua distillata sterile pari alla quantità di percolato rimossa.



Figura 5.2: passaggio di estrusione della matrice

5.4 Saggi di determinazione enzimatica

Tutti i saggi enzimatici sono stati sviluppati utilizzando il percolato ottenuto dal processo di fermentazione di *Pleurotus ostreatus* cresciuto sulla matrice vegetale proveniente da scarti agroalimentari all'interno dei fermentatori in stato solido. I prodotti di reazione sono stati determinati eseguendo le prove con campioni preparati in doppio ed ognuno a sua volta viene letto spettrofotometricamente in doppio.

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 dipende evidentemente dalle caratteristiche della matrice vegetale e dalla modalità con cui il micelio si adatta al substrato di crescita. Le attività enzimatiche dei substrati calcolate per ml, 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.

5.4.1 Determinazione dell'attività laccasica

Per la determinazione dell'attività laccasica è stata utilizzata una metodica messa a punto da Setti et al⁸¹ basata sulla reazione di accoppiamento ossidativo tra il 3-metil 2-benzotiazolinone idrazone (MBTH) e l'orto-metossifenolo (guaiacolo Sigma) come mostrato in Figura 5.3.

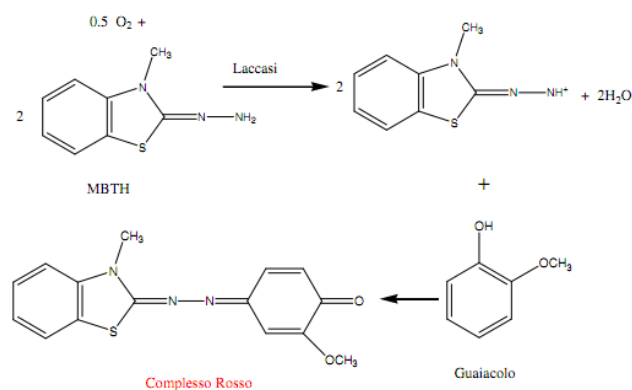


Figura 5.3: reazione di accoppiamento ossidativo tra MBTH e guaiacolo per la determinazione dell'attività laccasica

I campioni sono preparati aggiungendo a 3 ml di tampone fosfato (25 mM, pH 6,5), 100 µl di percolato, all'interno di una provetta e lasciati in incubazione sotto agitazione, a 30°C (il bianco è preparato allo stesso modo, ma senza percolato). A questa soluzione si aggiungono in rapida sequenza e avendo cura di miscelare bene con il Vortex 50 µl di guaiacolo 500 mM in etanolo e 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:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{Abs} \times 10^3 \times V_{\text{tot}}}{t \times \varepsilon \times b \times V_{\text{enz}}} \times V_{\text{perc}}$$

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 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

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

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

V_{perc} = volume totale di percolato raccolto (ml)

5.4.2 Determinazione dell'attività perossidasi

La determinazione dell'attività perossidasi segue la metodica messa a punto da Setti et al⁸². Il saggio viene sviluppato con la stessa procedura descritta per la determinazione dell'attività laccasi. Poiché l'attività perossidasi include l'uso di H_2O_2 come cosubstrato di reazione, il saggio prevede l'aggiunta di 40 μl di H_2O_2

250 mM in rapida successione ai 500 μl di MBTH aggiunti nel tubo di reazione. Nella formula per il calcolo dell'attività, il coefficiente estinzione del molare del complesso ha un valore di 15,5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Le prove di determinazione enzimatica sono state realizzate in atmosfera inerte gorgogliando N_2 per un intervallo di tempo di 5 minuti nel tubo di reazione contenente tampone e percolato. Successivamente l' N_2 è stato insufflato nello spazio di testa della provetta nel corso dell'intera reazione, in cui sono stati aggiunti i reagenti per la successiva determinazione enzimatica del campione.

5.4.3 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.

5.4.4 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 al⁸³ 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 Brilliant 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 una 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 precedenti⁸⁴ è stata individuata nel corso di prove in laboratorio una relazione costante tra il rilascio

¹ **Funzionalizzazione della cellulosa con RBBR: 3 filtri di cellulosa (Whatman Ø = 11cm) all'interno di una vaschetta, sono stati aggiunti in sequenza: 250 ml di H₂O a 100°C; 1.5 g di RBBR 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.**

di colore della carta funzionalizzata e la quantità di glucosio in soluzione. Tale rapporto è rappresentato dal fattore di determinazione 27,3.

L'attività cellulastica viene espressa come:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \left(\text{Abs} \times \frac{27,3}{360} \right) \times V_{\text{perc}}$$

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

V_{perc} = volume totale di percolato raccolto (ml)

- Metodo della determinazione degli zuccheri riducenti

Per la determinazione degli zuccheri riducenti è stata seguita la procedura basata sul metodo di Bailey et al.⁸⁵ che consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti, tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS)^{II}. Gli zuccheri riducenti da determinare sono le frazioni di glucosio liberate dall'idrolisi della cellulosa funzionalizzata catalizzata dall'attività cellulastica presente nel tubo di reazione.

La reazione che avviene tra il reattivo ADNS e uno zucchero, alla base del metodo, è riportata in Figura 5.4:

^{II} 75g di sodio potassio tartrato vengono sciolti 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.

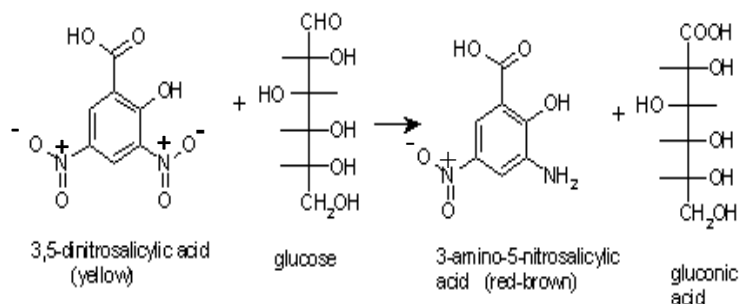


Figura 5.4: reazione ossidativa fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso)

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. $C_6H_{12}O_6$ 180,16 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 0,8 mg/ml in acqua come mostrato in Figura 5.5.

$$\text{Glucosio rilasciato (mg/ml)} = (\text{Abs}_{550\text{nm}} + 0,0241)/1,0518$$

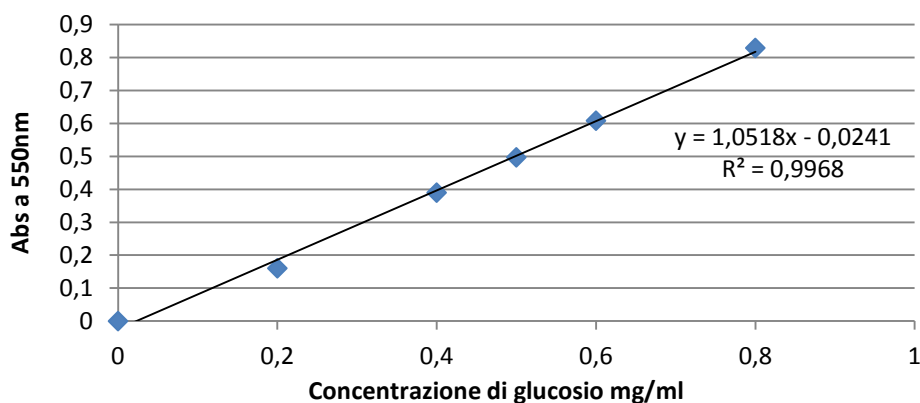


Figura 5.5: Retta di taratura per la determinazione degli zuccheri riducenti (glucosio) nei campioni ottenuti dalla reazione tra l'attività cellulastica presente nel volume di percolato raccolto e la carta funzionalizzata

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 cellulastica viene utilizzata la seguente formula:

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

glucosio (mmol/ml) = zuccheri riducenti (mg/ml)/ml

t = tempo di reazione (minuti)

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

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

V_{perc} = volume totale di percolato raccolto (ml)

5.4.5 Determinazione dell'attività xilanasica

Per la determinazione dell'attività xilanasica, è stato seguito il metodo descritto da Bailey et al.⁸⁵. La procedura consente la determinazione spettrofotometrica dello xilosio (unità che costituisce la struttura polimerica dello xilano), zucchero riducente liberato tramite reazione ossidativa della xilanasia, con acido 3,5-dinitrosalicilico (ADNS). 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 5.6.

$$\text{Xilosio rilasciato (mg/ml)} = (\text{Abs } 550_{\text{nm}} + 0,0346) / 1,1861$$

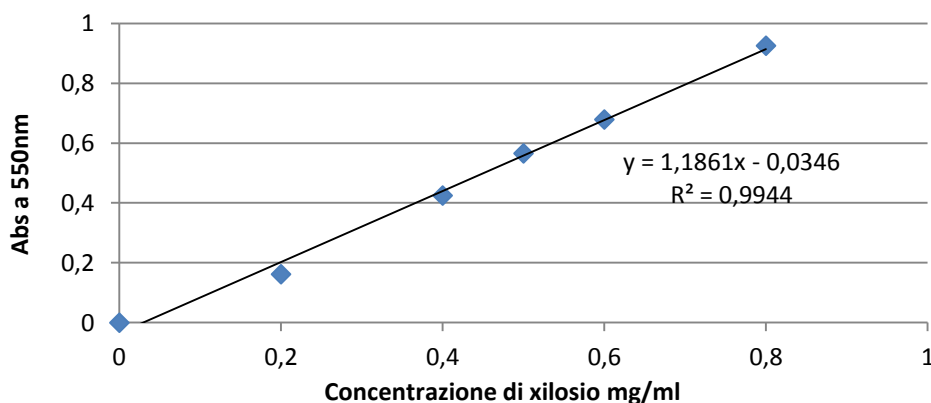


Figura 5.6: retta di taratura per la determinazione dell'attività xilanasica

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 sono 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:

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

xilosio (mmol/ml) = zuccheri riducenti (mg/ml)/ml

t = tempo di reazione (minuti)

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

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

V_{perc} = volume totale di percolato raccolto (ml)

5.4.6 Determinazione dell'attività pectinasi

Per la determinazione dell'attività pectinasi, 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 5.7.

Acido galatturonico rilasciato (mg/ml) = (Abs 550_{nm} + 0,0353)/1,1842

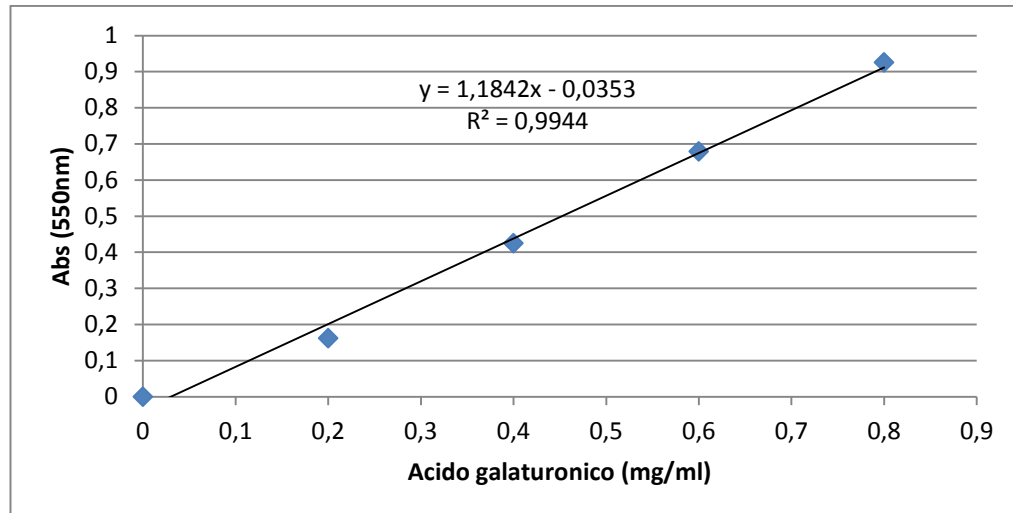


Figura 5.7: retta di taratura per la determinazione dell'attività pectinasi

Per la preparazione del substrato modello su cui verrà saggiata l'attività pectinasi 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 pectinasi) allo 0,3%. La pectina viene solubilizzata mantenendo la soluzione in ebollizione e sotto agitazione magnetica per 3 minuti.

La reazione enzimatica viene eseguita aggiungendo 200 μ l di percolato raccolto ad 1,8 ml di substrato pectina 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 5.4.4^{II}. La lettura spettrofotometrica viene effettuata contro un bianco preparato analogamente ai campioni, aggiungendo a 1,8 ml di substrato, 200 μ l di acqua distillata.

L'attività pectinasi viene determinata con la formula seguente:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{Ac.galaturonico} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \right) \times 10^3 \times V_{\text{tot}}}{t \times V_{\text{enz}}} \times V_{\text{perc}}$$

Acido galatturonico (mmol/ml) = zuccheri riducenti (mg/ml)/ml

t = tempo di reazione (minuti)

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

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

V_{perc} = volume totale di percolato raccolto (ml)

5.4.7 Determinazione dell'attività arilesterasica

La cinetica di formazione degli acidi cinnamici⁸⁶, 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 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) e caffeati (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) può essere determinata nel modo descritto:

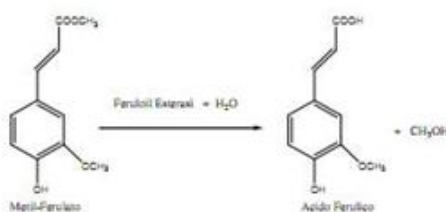


Figura 5.8: reazione idrolitica su metil-ferulato di una feruloil esterasi

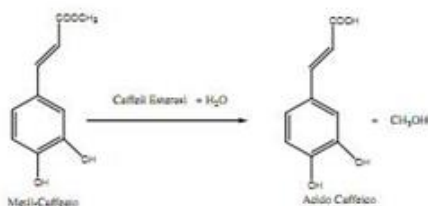


Figura 5.9: reazione idrolitica su metil-caffeato di una caffeoil esterasi

Per la preparazione delle soluzioni dei substrati 0,1 mM, il metilcaffeato e metilferulato 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:

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

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)

V_{perc} = volume totale di percolato (ml)

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

5.5 Liofilizzazione dell'estratto enzimatico

Per valutare la liofilizzazione come tecnica per la concentrazione degli enzimi prodotti, il percolato viene precedentemente centrifugato per eliminare eventuali residui di substrato ancora presenti in soluzione.

Si procede quindi alla divisione del percolato in più piastre di Petri ognuna con circa 25 ml di campione che vengono congelate per 24 ore. Successivamente, le piastre vengono trasferite all'interno del liofilizzatore che procederà fintanto che il campione non avrà perso l'acqua. Solitamente il processo procede per non meno di 24 ore.

Le piastre di Petri contenente il liofilizzato vengono conservate in essiccatore e giunto il momento di effettuare le analisi di attività enzimatica lo si risolubilizza la polvere in acqua distillata mantenendo un rapporto 2,4 volte più concentrato.

5.6 Idrolisi enzimatica

Sono state eseguite alcune prove di degradazione enzimatica allo scopo di idrolizzare matrici agroalimentari. 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 idrolisi enzimatica è stato eseguito un trattamento termomeccanico tritutando 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^{87,88} è risultato come il trattamento termico ideale che massimizzi il rilascio di metaboliti sia da eseguire su di una matrice immersa in acqua nel rapporto di 1:7, substrato:acqua.

Si sono quindi posti 10 g di biomassa 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 idrolitico siano i seguenti:

- 1 g di substrato (matrice vegetale)
- 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 45 ore e sono state fatte analisi per la ricerca di zuccheri riducenti a 0, 2, 4, 24 e 45 ore dall'inizio dell'aggiunta di enzima.

5.7 Determinazione dei polifenoli totali

La determinazione dei polifenoli totali viene eseguita mediante il metodo di Folin-Ciocalteu⁸⁹.

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 5.10):

$$\text{Catechina (mg/ml)} = (\text{Abs } 700_{\text{nm}} + 0,005)/9,8561$$

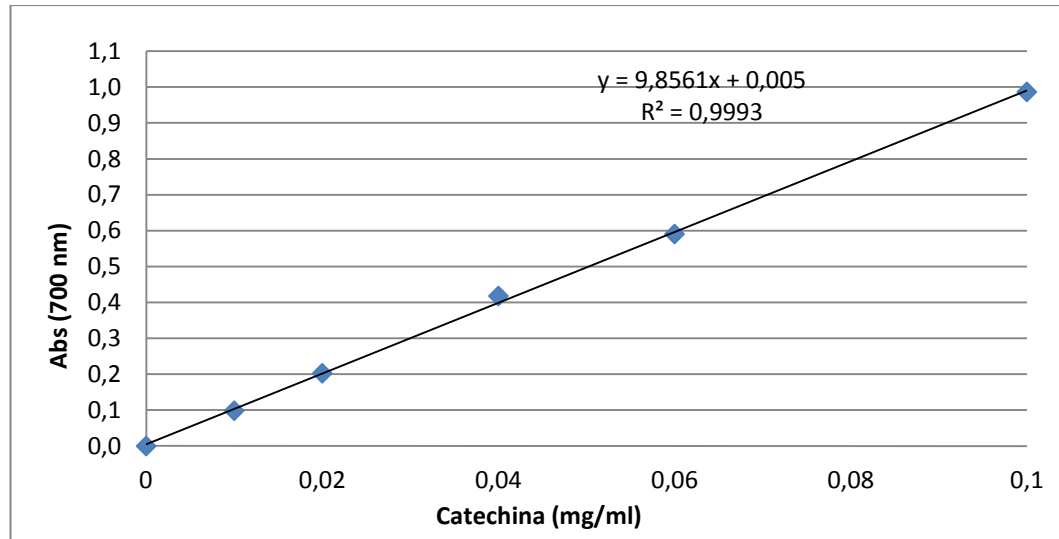


Figura 5.10: Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30°C.

$$\text{Polifenoli } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{Catechina } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{ml}}\right) \times 10^3 \times V_{\text{tot}}}{t \times V_{\text{enz}}}$$

t = tempo di reazione (minuti)

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

V_{enz} = volume enzima aggiunto (ml)

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, 1.0 g/ 6 ml, 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.

5.8 Valutazione delle eventuali attività enzimatiche sugli scarti della produzione di Champignon

Recupero enzimatico dagli scarti del fungo:

A 95 g* di gambetto (o parte inferiore) del fungo macinati, si aggiungono 30ml di acqua distillata. Il tutto viene mescolato ed in seguito si recupera la frazione liquida che verrà sottoposta agli saggi spettrofotometrici per la determinazione delle attività enzimatiche presenti.

Recupero enzimatico dagli scarti del fungo:

A 50 g di terriccio si aggiungono 30 ml di acqua distillata. Il tutto viene mescolato ed in seguito si recupera la frazione liquida che verrà sottoposta agli saggi spettrofotometrici per la determinazione delle attività enzimatiche presenti.

*Le attività presenti sia nel fungo che nel terriccio sono riferite a 50 g di biomassa.

5.9 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;
- Liofilizzatore – SCANVAC COOLSAFE;
- Spray Dryer SD-05 – LABPLANT;
- Bagno termostato ad ultrasuoni Elmasonic S 30 H – ELMA.

Ringraziamenti

Dedico questo lavoro di tesi ai miei amori: Mauro e Leonardo Baldini che riempiono la mia vita d'amore e felicità!

Grazie coração per l'infinita pazienza, comprensione, supporto, amicizia, amore e per il regalo più bello e prezioso: nostro figlio! Grazie di tutto, sono molto felice di amarti e di potere contare sempre con la tua amicizia! Eu amo você!

Leonardo, non potevo veramente capire la grandezza dell'amore prima del tuo arrivo. Mi trasformi costantemente in una persona migliore. Grazie di avermi fatto conoscere l'amore senza limiti. Tutte le cose hanno preso un nuovo significato e niente è più importante di te! Ti amo infinitamente!!!!

Mãe querida, obrigada por tudo! Você é o meu exemplo, a minha força, a minha melhor amiga, o meu porto seguro! Eu te amo sempre..... eu amo mais!!!!!!!

Obrigada pai, pelo incentivo ao estudo, pelo exemplo de responsabilidade, determinação e dedicação. Obrigada por participar desse momento importante! Amo você!

Jefferson e Mayra, a vida não seria a mesma sem vocês. Eu amo muito vocês e me sinto sempre orgulhosa e honrada por ser vossa irmã. Obrigada por cada momento e pelos sobrinhos maravilhosos!

Ana Paula querida, tive o prazer de escolher una grande amiga para fazer parte da minha vida e fui tão sortuda que ela virou minha cunhada. Te adoro demais!

Monja, un grazie speciale a te che hai preso cura del mio gioiello più prezioso come se fosse tuo. Ti sei rivelata una vera amica e sono felicissima e onorata di averti nella nostra vita. Grazie!

Grazie al professore Setti (Sevens) per la preziosa conoscenza trasmessa, per l'immensa pazienza, amicizia e semplicità; ma soprattutto, per le fantastiche canzoni (Sevens Compilation) che rallegrano le nostre giornate di lavoro e ci fanno capire che la serietà sul lavoro deve andare di pari passo con la giusta e sana "leggerezza".

Ragazzi del laboratorio, come ringraziarvi???? Passiamo la maggior parte della giornata insieme, ridendo e condividendo le nostre storie assurde. Barbara, Ilaria, Elena, Francesco, Ruggero, Alberto e Valentina, vi adoro!!!! Grazie veramente di tutto, soprattutto della amicizia!

Alessandra, Fabio e Claudio: i miei piccini! Mi sento davvero orgogliosa di avere avuto il privilegio di essere stata vostra correlatrice e di avere condiviso un periodo importante insieme a voi. Il vostro futuro sarà sicuramente pieno di successo e realizzazioni. Siete bravissimi!!!

Grazie a Dio per la vita e la famiglia meravigliosa!

6 BIBLIOGRAFIA

- ¹ A. Pandey, P. Selvakumar, CR Soccol, P. Nigam, (1999). "Solid state fermentation for the production of industrial enzymes". *Current Science*, 77(1): 149-162
- ² 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
- ³ Zhang YHP, (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries". *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 367-375
- ⁴ 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
- ⁵ A.Koopmans, J.Koppejan, (1997). "Agricultural and forest residues – Generation, utilization and availability". *Regional Consultation on Modern Applications of Biomass Energy*, Kuala Lumpur, Malaysia
- ⁶ 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*
- ⁷ *The State of Food and Agriculture*, (2005). FAO report
- ⁸ Dati ISTAT: www.istat.it
- ⁹ C.Di Blasi, V.Tanzi, M.Lanzetta, (1997). "A study on the production of agricultural residues in Italy". *Biomass and Bioenergy*, 12: 321-331
- ¹⁰ E.Vandamme, A.Cerdobbel, W.Soetaer, (2006). "Biocatalysis on the rise: Part 2". *Applications.Chem Today*, 24: 57-61
- ¹¹ JB Van Beilen, (2008). "Transgenic plant factories for the production of biopolymers and platform chemicals". *Biofuels Bioprod Bioref*, 2: 215-228
- ¹² D.Morris, (2006). "The next economy: From dead to living carbon". *J Sci Food Agric*, 86: 1743-1746
- ¹³ SK Dahod, (1999). "Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes". *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 213-220
- ¹⁴ B.Kamm, M.Kamm, (2004). "Principles of biorefineries". *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 137-145
- ¹⁵ 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

- ¹⁶ 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
- ¹⁷ 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
- ¹⁸ P.Nigam, A.Pandey, (2009). “Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation”. Springer Editor
- ¹⁹ 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
- ²⁰ A. Hatakka, (1994). “Lignin-modifying enzymes from select white-rot fungi: production and role in lignin degradation”. FEMS Microbiol Rev, 13: 125-35
- ²¹ 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
- ²² S. R. Couto, J. L. Toca-Herrera, (2007). “Laccase production at reactor scale by filamentous fungi”. Science Direct; Biotechnology Advances, 25: 558-569
- ²³ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4
- ²⁴ http://www.rivistedigitali.com/Industria_della_carta/2009/4/.../scaricaPdf
- ²⁵ <http://www.brenda-enzymes.info>
- ²⁶ 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
- ²⁷ V. Mastihuba, L. Kremnick, M. Mastihubov, J.L. Willet, G. L. Coté, (2002). “A spectrophotometric assay for feruloyl esterases”. Analytical Biochemistry, 309: 96–10
- ²⁸ A. Pandey, (1992). “Recent process developments in solid-state fermentation”. Process Biochem. 27 (2): 109–117
- ²⁹ A. Pandey, C.R. Soccol, J.A.R. Leo, P. Nigam, (2001). “Solid-state Fermentation in Biotechnology”. Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, p 221
- ³⁰ D.A. Mitchell, B.K. Lonsane, (1990). “Definition, characterization and economic evaluation, in: H.W. Doelle, C. Rolz (Eds.), General Principles of Solid Substrate Fermentation”, Rapid Publications of Oxford Ltd., UK
- ³¹ D.N. Ogbonna, T.G. Sokari, S.C. Achinewhu, (2001). “Development of an owoh-type product from African yam beans (*Sphenostylis stenocarpa*) (Hoechst (ex. A. Rich.) Harms.) seeds by solid substrate fermentation”. Plant Foods Human Nutr. 56 (2): 183–194

-
- ³² A.B.P. Medeiros, A. Pandey, R.J.S. Freitas, P. Christen, C.R. Soccol, (2000). "Optimization of production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology". *Biochem. Eng. J.* 6 (1): 33–39
- ³³ T. Robinson, P. Nigam, (2003), "Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation". *Biochem Eng J*, 13: 197-203
- ³⁴ R. Rani Singhanian, A. Kumar Patel, C. R. Soccol, A. Pandey, (2009), "Recent adevances in solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal* 44: 13-18
- ³⁵ A. Pandey, C.R. Soccol, D.A. Mitchell, (2000). "New developments in solid-state fermentation". I. Bioprocesses and products, *Process Biochem.* 35 (10): 1153–1169.
- ³⁶ K.M. Nampoothiri, A. Pandey, (1996). "Solid state fermentation for l-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp.", *Biotechnol. Lett.* 16 (2): 199–204
- ³⁷ A. Pandey, P. Kavita, P. Selvakumar, (1998). "Culture conditions for production of 2-1-₂-d-fructan-fructanohydrolase in solid culturing on chicory (*Cichorium intybus*) roots", *Braz. Arch. Biol. Technol.* 41 (2): 231–236
- ³⁸ J. L. Toca-Herrera, J. F. Osmá, 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
- ³⁹ M.A. Murado, M.P. González, L. Pastrana, (1998). "Production of microfunga metabolites on inert solid supports". S.G. Pandalai Editors, *Research Signpost, India*, 1: 405-432
- ⁴⁰ A. Bauera, P. Böschb, (2009). "Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production". *Journal of Biotechnology*, 142: 50-55.
- ⁴¹ <http://digilander.libero.it/tuttosullanutrizione/Composizione%20alimenti/Crusca%20di%20frumento.htm>
- ⁴² Ventura B., Vodret A., Farris G.A., (1998) "Valorizzazione della crusca ai fini tecnologici e nutrizionali", *Tecnica molitoria*.
- ⁴³ C. B. Faulds, B. Bartolomé, G. Williamson, (1996). "Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases", *Industrial Crops and Products*, 6: 367-374.
- ⁴⁴ L. Yu, K. Zhou, J. W. Parry, (2005) "Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals", *LWT*, 38: 463-470.
- ⁴⁵ A. Wen, P. Delaquis, K. Stanich, P. Toivonen, (2003). "Antilisterial activity of selected phenolic acids", *Food Microbiology*, 20: 305-311.

- ⁴⁶ A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, A. De Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, F. Bonina, “In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents”, *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 39-47.
- ⁴⁷ S. Sakai, H. Ochiai, K. Nakajima, K. Terasawa, (1997). “Inhibitory effect of ferulic acid on macrophage inflammatory protein-2 production in a murine macrophage cell line raw264.7”, *CYTOKINE*, 9:242-248.
- ⁴⁸ A. Suzuki, D. Kagawa, A. Fujii, R. Ochiai, I. Tokimitsu, I. Saito, (2002). “Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats”, *AJH*, 15:351–357.
- ⁴⁹ Y. Z. Hou, J. Yang, G. R. Zhao, Y. J. Yuan, (2004) “Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II”, *European Journal of Pharmacology*, 499:85-90.
- ⁵⁰ Z. Zhang, T. Wei, J. Hou, G. Lia, S. Yu, W. Xin, (2003) “Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid”, *European Journal of Pharmacology*, 467:41- 47.
- ⁵¹ J.D. Mauseth, (2006). “La parete: un graticcio intermolecolare”. *Botanica*, Parte Generale II edizione
- ⁵² J.D. Mauseth, (2006). “La parete: un graticcio intermolecolare”. *Botanica*, Parte Generale II edizione
- ⁵³ 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”
- ⁵⁴ *Office International de la vigne et du vin*.
- ⁵⁵ Dati APAT: www.apat.gov.
- ⁵⁶ Dati Camera di Commercio Regione Emilia-Romagna: www.cameradicommercioemilia-romagna.it
- ⁵⁷ A. Bossini, A. Di Guardo, M. Mannini, *Industrie agrarie*, 1993, 224.
- ⁵⁸ V. Scincalopore, *Industrie agrarie olearie, enologiche, lattiero-casearia*. Unione tipografica torinese, Torino, 1998, 234.

- ⁵⁹ G. Ribereau, Y. Glories, "I composti fenolici dell'uva e del vino", Institut d'Oenologie-Faculté des Science de l'Université di Bordeaux, 148.
- ⁶⁰ Direttiva Europea 2009/28/CE
- ⁶¹ G. Riva, (1997). "Residui agricoli e agro-industriali utilizzabili a fini energetici: valutazione del potenziale nazionale e verifica in due province del nord e centro Italia". 1° Convegno Nazionale -Valorizzazione energetica e industriale delle biomasse lignocellulosiche
- ⁶² 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"
- ⁶³ <http://www.chim.unisi.it/basosi/didattica/ENERGIA-BIOMASSE.pdf>
- ⁶⁴ <http://www.terna.it/LinkClick.aspx?fileticket=axZsbhFJBW8%3d&tabid=418&mid=2501>
- ⁶⁵ F. Zimbardi, E. Viola, E. Ricci, (2000). "Miglioramento dell'utilizzo delle biomasse mediante trattamento di Steam Explosion". *L'ambiente*, Ranieri Editore, 6: 8-12
- ⁶⁶ B.R. Allen, J Cousin, G.E. Pierce, (1980). "Pretreatment methods for the degradation of lignin". Final Report
- ⁶⁷ N. N. Potter. (1986). Food Science, 0-87055-496-4
- ⁶⁸ J. Wiley. (1992). Encyclopedia of Food Science and Technology. 0-471-50541-2
- ⁶⁹ 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
- ⁷⁰ 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
- ⁷¹ 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
- ⁷² A. Pandey, (2003). "Solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84
- ⁷³ G.Boari, I.M. Rameini (1987). Trattamenti delle acque di vegetazione, *Ingegneria sanitaria*, 12: 165-172
- ⁷⁴ Z.Kerem, D.Friesem, Y. Hadar, (1992). "Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*". *App. and Env. Microb.*, 58 (4): 1121-1127
- ⁷⁵ K.Iiyama, T.B.T. Lam, B.A.Stone, (1990). "Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes", *Phytochemistry*, 29: 733-737

- ⁷⁶ K.S.M.S. Raghavarao, T.V. Ranganathan, N.G. Karanth, (2003). "Some engineering aspects of solid-state fermentation" *Biochemical Engineering Journal* 13: 127–135
- ⁷⁷ Sherwin Carlquist, (1988). "Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood". Berlin, Springer
- ⁷⁸ A.A. Sherief, A.B. El-Tanash and A.M. Temraz, (2010). "Lignocellulolytic Enzymes and Substrate Utilization During Growth and Fruiting of *Pleurotus ostreatus* on Some Solid Wastes". *Journal of Environmental Science and Technology*, 3: 18-34
- ⁷⁹ M. M. Rashad, H. M. Abdou, W. G. Shousha, M. M. Ali, N. N. El-Sayed, (2009). "Utilization of some food processing wastes for production of *Pleurotus ostreatus* pectinases", 31 (3): 151-157
- ⁸⁰ Craig B. Faulds, (1997). "Ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*: their application in the biotransformation of agricultural residues", PhD Thesis, University of East Anglia
- ⁸¹ L. Setti, S. Giuliani, G. Spinuzzi, P.G. Pifferi, (1999). "Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hidrazone and methoxyphenols". *Enzyme and microbial tecnology*, 25: 258-289
- ⁸² L. Setti, S. Scali, I. Degli Angeli, P.G. Pifferi, (2008). "Horseradish peroxidase-catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols". *Enzyme and Microbial Technology* 22: 656–661
- ⁸³ R.P. Poincelot, P.R. Day, (1972). "Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi". *Applied and Environmental Microbiology*, 23: 875-879
- ⁸⁴ G. Spinuzzi (1994-1995). "Rimozione di fenoli da sistema modello per via fermentativa", Tesi di laurea in Chimica industriale, Università di Bologna
- ⁸⁵ M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, (1992). "Interlaboratory testing of methods for assay of xilanase activity", *Journal of Biotechnology*, 23: 257-270
- ⁸⁶ 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
- ⁸⁷ David Morini, (2003-2004). "Trattamenti enzimatici per la valorizzazione integrata di scarti enologici". Tesi di laurea in Chimica industriale, Università di Bologna
- ⁸⁸ 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
- ⁸⁹ O. Folin, V. Ciocalteau, (1927). "Tyrosine edn triptophan determination in protein". *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627-650