

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA CELLULARE, MOLECOLARE E INDUSTRIALE**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza:

03/D1 - Chimica e tecnologie farmaceutiche, tossicologiche e nutraceutico-alimentari

Settore Scientifico disciplinare:

CHIM/11 - Chimica e biotecnologia delle fermentazioni

**PRODUZIONE DI BIOETANOLO DA EFFLUENTI
DEL SETTORE LATTIERO-CASEARIO CON
*Kluyveromyces marxianus***

Presentata da:

Dott.ssa Francesca ZOPPELLARI

Coordinatore Dottorato

Prof. Alejandro HOCHKOEPLER

Relatore

Prof. Fabio FAVA

Correlatrice:

Dott.ssa Laura BARDI

Esame finale anno 2013

A MAMMA,
lei più di me,
ha creduto nel raggiungimento di quest'obiettivo,
e alla fin fine, pure da lassù,
ha fatto sì che il nostro desiderio si realizzasse.

A MASSIMO.



INDICE

1. Introduzione	2
1.1 L'industria lattiero casearia	4
1.1.1 I prodotti e i sottoprodotti dell'industria lattiero casearia	5
1.1.2 Il lattosio	9
1.1.3 La valorizzazione dei sottoprodotti	9
1.2 La fermentazione alcolica	13
1.2.1 La fermentazione	13
1.2.2 La fermentazione alcolica dei prodotti lattiero caseari	14
1.3 Il lievito <i>Kluyveromyces marxianus</i>	16
1.3.1 La tassonomia	16
1.3.2 Biochimica, metabolismo e fisiologia	17
1.3.3 Le applicazioni biotecnologiche	19
1.3.4 I parametri di crescita	20
1.3.5 Le tecniche di processo per produrre etanolo	23
1.4 Il bioetanolo	25
1.4.1 I biocombustibili e l'etanolo	25
1.4.2 Le materie prime e i processi produttivi per la produzione di etanolo	30
1.4.3 Il mercato, l'economia e le politiche	36
1.4.4 La competizione alimentare e la questione ambientale	44
2. Obiettivo della Tesi	47
3. Materiali e Metodi	49
3.1 Le matrici	49
3.2 Microrganismo e condizioni di crescita	49
3.3 Analisi chimiche	50
3.3.1 Etanolo	50
3.3.2 Lattosio e Galattosio	50
3.4 Sistemi di fermentazione	50

Indice

3.4.1	Fermentazioni batch e semicontinue in bioreattore	50
3.4.2	Fermentazioni con cellule incluse in alginato di calcio.....	52
3.5	Condizioni di fermentazioni	55
4.	Risultati	57
4.1	Caratterizzazione matrici	57
4.2	Fermentazioni in aerobiosi	58
4.2.1	Produzione di etanolo	58
4.2.2	Curva di crescita del lievito	59
4.2.3	Andamento del pH.....	60
4.2.4	Consumo di ossigeno	60
4.3	Fermentazioni in anaerobiosi	62
4.3.1	Produzione di etanolo	62
4.3.2	Curva di crescita del lievito	63
4.3.3	Andamento del pH.....	64
4.3.4	Consumo di ossigeno	65
4.3.5	Concentrazioni di lattosio e galattosio e resa in etanolo.....	65
4.4	Effetto di temperature differenti.....	67
4.4.1	Produzione di etanolo	67
4.4.2	Curva di crescita del lievito	69
4.4.3	Andamento del pH.....	71
4.4.4	Concentrazione di ossigeno.....	73
4.4.5	Concentrazioni di lattosio e galattosio e resa in etanolo.....	75
4.5	Fermentazioni con biomassa inclusa in alginato di calcio	76
4.5.1	Fermentazioni con cellule incluse in alginato: in batch e in semicontinuo.....	76
4.5.2	Fermentazioni semicontinue: con cellule incluse in alginato e in fase dispersa	81
4.6	Produzione di etanolo su refluo da produzione di PHA	88
4.6.1	Caratterizzazione iniziale della matrice	88
4.6.2	Produzione di etanolo	88
4.6.3	Curva di crescita del lievito	89

4.6.4	Andamento del pH e del consumo di ossigeno	90
4.6.5	Concentrazioni di lattosio e galattosio	91
5.	Discussione	92
5.1	Fermentazione di siero e scotta	92
5.2	Disponibilità di ossigeno: fermentazioni in aerobiosi e anaerobiosi	94
5.3	Effetto di temperature differenti	97
5.4	Fermentazioni con biomassa inclusa in alginato di calcio	100
5.5	Produzione di etanolo su refluo da produzione di PHA	101
6.	Conclusioni.....	102
7.	Bibliografia	104
	Attività collaterali.....	111
	Ringraziamenti	113

1. Introduzione

L'agricoltura è l'attività che consente l'alimentazione delle persone con il trasferimento della produzione agroalimentare ai sistemi urbani. L'agricoltura ha, quindi, il ruolo fondamentale di legame tra l'umanità e la Terra ed è perciò essa stessa un componente irrinunciabile per la sostenibilità della collettività. Oltre al ruolo connesso con l'alimentazione umana, l'agricoltura svolge altri importanti ruoli, che riguardano i settori dello sviluppo e dell'economia. Pertanto, una visione sistemica dell'agricoltura deve considerare sia gli aspetti di sostenibilità bio-fisica che quelli di sostenibilità socio-economica (Todisco, 2008).

La sostenibilità, o attitudine a durare, è una conseguenza dello stato di organizzazione dell'agroecosistema e in particolare dello stato d'integrazione di tutte le catene trofiche che operano in maniera integrata e sinergica per il funzionamento del sistema nel suo complesso. La massima attenzione va perciò dedicata all'aspetto dell'organizzazione dell'agroecosistema, che consente di avvalersi o meno dei componenti e processi naturali che possono conferire al sistema un elevato grado di autonomia interna e, quindi, una minore necessità di ricorrere ad interventi esterni (energia ausiliaria) (Caporali, 2003).

La sostenibilità degli agroecosistemi non è solo un problema di adeguata produttività, espressa dalla resa assoluta delle colture o degli animali di allevamento, ma anche di bilancio tra input (energia non rinnovabile) ed output (produzioni agrarie, vegetali e animali, commerciabili) in modo tale che risulti minimizzato il rapporto input/output (ossia l'impiego di energia, elementi nutritivi, denaro, ecc., per unità di output prodotto in termini di energia, elementi nutritivi, denaro, ecc.) (Caporali, 2003).

A questo proposito gioca un ruolo molto importante la multifunzionalità dell'agricoltura che può essere considerata come una "lente" con cui leggere le strategie per migliorare l'autonomia delle imprese agricole e la redditività delle risorse a loro disposizione. La multifunzionalità assume un valore economico nel momento in cui diventa una strategia aziendale per diversificare le attività in risposta alla domanda di beni e servizi espressa dai consumatori. Tale strategia comporta una ricollocazione dei fattori produttivi dalla sola produzione agricola a favore di funzioni ambientali, sociali, ecc., che permettono di generare redditi aggiuntivi (Henke e Salvioni, 2010).

Le imprese multifunzionali hanno, in genere, un'elevata consapevolezza del loro ruolo ambientale e del contributo attivo e positivo che possono dare nell'uso delle risorse naturali. La multifunzionalità è pertanto anche una strategia messa in atto per migliorare la redditività delle risorse aziendali e conquistare un maggior grado di autonomia (Henke e Salvioni, 2010).

La sostenibilità dei processi agroindustriali è, quindi, oggi un fattore di primaria importanza per la competitività; da ciò deriva la necessità di valorizzare tutti i sottoprodotti e gli scarti per incrementare il reddito ed il valore aggiunto prodotto in azienda. E' con questa visione che si sta diffondendo il concetto di impresa agricola come bioraffineria, in cui diversi processi si affiancano

per ottenere la massima conversione possibile delle risorse in prodotti. Infatti, il termine bioraffineria sta diventando importante nella comunità scientifica e il concetto è analogo a quello della raffineria di petrolio greggio di oggi, che produce molteplici combustibili e prodotti dal petrolio (Antoni *et al.*, 2007; Cherubini e Jungmeier, 2010).

Per bioraffineria si intende un sistema sostenibile che integra processi di conversione della biomassa di natura chimica, fisica o microbiologica al fine di ottenere un ampio spettro di prodotti ad alto valore aggiunto. Per prodotti si intendono beni commerciabili come prodotti chimici, prodotti cosmetici o nutraceutici, materiali, alimenti, mangimi o prodotti energetici come biocombustibili (ad esempio bioetanolo, biodiesel), energia elettrica e calore (Clark e Deswarte, 2008; D'Avino *et al.*, 2010; IEA 2008).

L'utilizzo completo di residui agricoli al fine di estrarre sia bioenergia che bioprodotto, valorizzando l'intera biomassa, consente di sviluppare un nuovo criterio di sostenibilità con una produttività che va a migliorare le prestazioni ambientali ed economiche delle materie prime (Antoni *et al.*, 2007; Fahd *et al.*, 2011; D'Avino *et al.*, 2010). Infatti, nel caso di una bioraffineria, se i residui sono considerati come substrati ancora utili, la redditività di un processo *bio-based* aumenta. Attraverso la conversione degli scarti in valore aggiunto vengono evitati lo smaltimento in discarica e l'utilizzo di energia supplementare; gli oneri economici e ambientali sono ridotti, massimizzando il valore economico della biomassa utilizzata, riducendo i flussi di rifiuti prodotti e rendendo il beneficio della linea di bioraffineria ancora più grande (Fahd *et al.*, 2011; Kaparaju *et al.*, 2009; Donadio e Marino, 2008).

La possibilità di una bioraffineria, infatti, sfrutta il valore di un grande mercato dei biomateriali e la necessità per il corretto smaltimento dei residui agricoli e agro-industriali (Fahd *et al.*, 2011).

La bioraffineria deve essere un insediamento industriale innovativo, produttivo e integrato nel territorio in grado di utilizzare le risorse agricole locali (Civiero, 2008; Lazzeri, 2012).

La fattibilità economica è, quindi, guidata dal costo ancora basso di energia fossile, nonché dal risparmio derivante dall'aver individuato un'alternativa redditizia per lo smaltimento dei rifiuti dell'agroindustriale. Per evitare, o almeno diminuire, la dipendenza nei combustibili fossili, il processo di produzione deve essere rielaborato attraverso una maggiore integrazione tra le diverse fasi, riducendo al minimo le spese di trasporto e di sfruttamento delle risorse disponibili a livello locale (bio-fertilizzanti, residui ulteriori, potenziali utilizzatori di prodotti) (Fahd *et al.*, 2011).

1.1 L'industria lattiero casearia

L'industria lattiero casearia, che rappresenta una percentuale importante dell'intero comparto produttivo alimentare mondiale, segue sia la filiera del latte dall'azienda zootecnica al consumatore, sia la produzione dei suoi derivati trasformati quali burro, yogurt e formaggi (Gigliotti e Verga, 2007).

Sono definiti prodotti lattiero caseari tutti quegli alimenti che hanno in comune il latte come materia prima (Zambonelli *et al.*, 2001). Questi prodotti sono tipici delle regioni in cui sono presenti in quantità apprezzabili di animali, come vacche, capre e pecore; l'area di maggiore produzione a livello mondiale è l'Europa. Come consumatori di latte gli italiani occupano in Europa le ultime posizioni (Gigliotti e Verga, 2007); anche se nel 2010, secondo dati FAOSTAT, l'Italia risulta essere al 17° posto mondiale per la produzione di latte di vacca intero e fresco. Buono è invece il consumo e la produzione di formaggio (Gigliotti e Verga, 2007). Infatti, nell'Europa a 27, nel 2011 l'Italia è al terzo posto per la produzione di formaggio con $1,17 \cdot 10^8$ quintali di formaggi, solo dopo Germania e Francia che hanno rispettivamente una produzione $2,11 \cdot 10^8$ quintali e $1,93 \cdot 10^8$ quintali (EUROSTAT, 2012; ISTAT, 2011), e al quarto per la produzione di formaggi da latte di vacca intero a livello mondiale (FAOSTAT, 2010).

In Italia il latte di vacca, raccolto presso le aziende agricole dell'industria lattiero-casearia, è stato di circa $1,05 \cdot 10^8$ quintali nell'anno 2011 (ISTAT, 2011). La produzione di siero di latte è stata di $3,37 \cdot 10^8$ quintali circa di cui è stato riutilizzato il 22,15% per la produzione di ricotta, il 67,62% sotto forma liquida per l'alimentazione del bestiame, il 7,06% utilizzato sotto forma concentrata e il 3,17% in polvere e in pezzi (ISTAT, 2011 elaborati F. Zoppellari). Secondo i dati FAOSTAT l'Italia, tra tutti gli altri paesi, nel 2010 risulta essere al primo posto per la produzione di siero condensato e al terzo posto per la produzione di siero fresco.

Nell'industria lattiero casearia il siero (residuo della lavorazione del formaggio) e la scotta (residuo della lavorazione della ricotta) costituiscono i principali prodotti di scarto. Tali sostanze vedono ad oggi poche, solo parziali e talvolta poco redditizie possibilità di reimpiego, mentre rappresentano una fonte d'inquinamento per le acque.

La possibilità di riciclare tali sostanze in prodotti a più alto valore economico e a differente impiego potrebbe rappresentare una valida soluzione alle problematiche ambientali e nel contempo una fonte di guadagno o anche di risparmio per le aziende della filiera casearia.

Le ultime ricerche spingono verso la riqualificazione innovativa degli scarti dell'industria lattiero casearia. Un'attenta analisi delle caratteristiche di tali materie, nonché delle tecniche di trasformazione potenziali presenti ad oggi, rappresenta una valida base di partenza per poter fissare degli obiettivi all'interno di un'ottica di recupero, trasformazione e valorizzazione.

1.1.1 I prodotti e i sottoprodotti dell'industria lattiero casearia

Il formaggio

Il formaggio è l'alimento che meglio di altri concretizza il concetto di trasformare e conservare per lunghi periodi i principi nutritivi degli alimenti. La trasformazione del latte in formaggio consente, infatti, di conservare proteine e grassi, elementi essenziali per la vita. Per questo motivo l'origine dei formaggi risale a tempi lontanissimi; era già presente in Asia minore 6000 anni fa e la sua nascita è stata contemporanea alle prime attività agricole e pastorizie dell'uomo primitivo. Le tecniche artigianali casearie erano utilizzate dagli etruschi, passate poi ai romani e mantenute nel loro successivo impero. Il formaggio è poi rimasto nel corso della storia: nel Medioevo la sua stagionatura permetteva di preservare per tutto l'anno un alimento facilmente deperibile come il latte. Nei monasteri si ebbe un perfezionamento delle tecniche casearie, arrivando fino ai giorni nostri con un gran numero di tipologie (Gigliotti e Verga, 2007).

La produzione del formaggio (Figura 1) detta di caseificazione, consiste in una prima fase in cui si riscalda il latte e eventualmente si aggiunge l'inoculo di fermenti; avviene in caldaie riscaldate, di forma, dimensioni e materiali diversi a seconda del tipo di lavorazione. La seconda fase del processo è la coagulazione, una delle fasi più delicate dell'intero processo, consiste nella gelificazione della frazione caseinica per precipitazione delle micelle (particelle lipoproteiche con tendenza ad aggregarsi). La coagulazione avviene o con l'abbattimento del pH, acidificando quindi il latte (coagulazione acida) o grazie all'intervento del caglio che modifica enzimaticamente la k-caseina (coagulazione presamica o enzimatica). Nei comuni processi di caseificazione, però, si effettua la coagulazione presamica, questa viene per aggiunta del caglio al latte portato a temperature di 30-37°C. La cagliata è una massa gelatinosa di paracaseinato bicalcico che forma un reticolo tridimensionale, nelle cui maglie sono intrappolati i globuli di grasso e il siero (frazione liquida), e che tende a contrarsi trattenendo i primi ed espellendo il secondo. L'incipiente produzione di acido lattico da parte dei batteri influenza favorevolmente la consistenza e l'elasticità del coagulo, che si contrae ed espelle il siero. L'acido lattico neutralizza le cariche sulle micelle e, a bassi livelli, rende più permeabile la cagliata e facilita la fuoriuscita del siero attaccando parzialmente il reticolo di paracaseinato di calcio (Cappelli e Vannucchi, 2005).

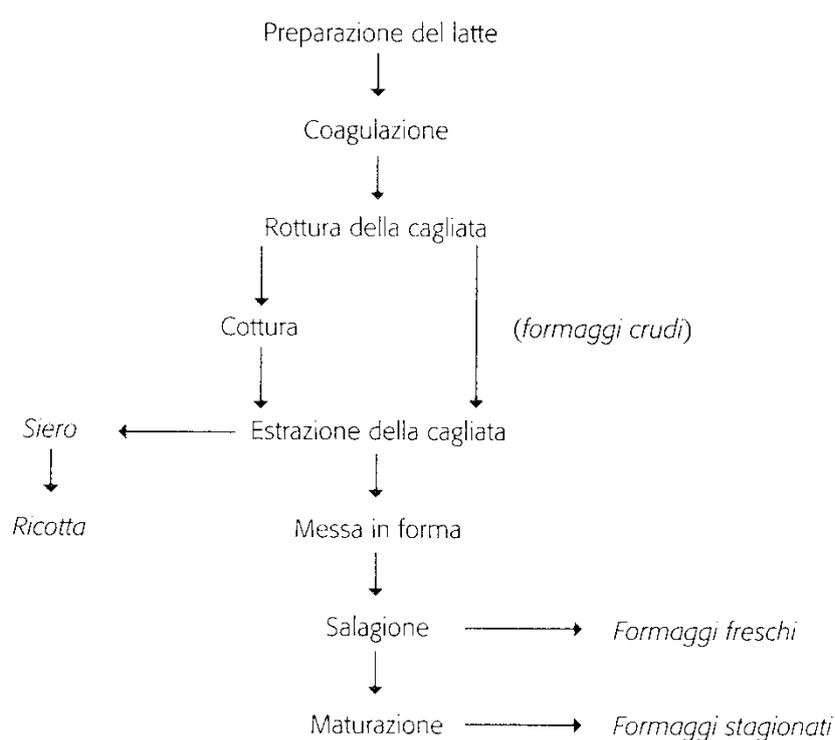


Figura 1. Le fasi della fabbricazione del formaggio (Cappelli e Vannucchi, 2005).

Per ottenere la completa retrattilità della cagliata e lo spurgo del siero, la massa gelatinosa viene rotta (rottura della cagliata), in frammenti più o meno piccoli. In questo modo, aumenta enormemente la superficie attraverso cui fuoriesce il siero (Cappelli e Vannucchi, 2005). La cagliata viene riscaldata a temperature che vanno da 38 a 60°C, fatta eccezione per i formaggi crudi, per tempi variabili, e viene effettuata sulla massa in agitazione, così si completa la contrazione e lo spurgo (Cappelli e Vannucchi, 2005). Il liquido che rimane è il siero di latte.

Il siero di latte

Il siero è uno dei maggiori sottoprodotti dell'industria lattiero casearia (Zafar *et al.*, 2005) ed è, come già spiegato in precedenza, la frazione acquosa che si forma durante la coagulazione della caseina del latte nella produzione di formaggio (Guimarães *et al.*, 2010).

Il siero di latte è prodotto in quantità significativa; per ogni kg di formaggio sono prodotti, infatti, circa 9 l di siero (Zafar *et al.*, 2005; e Zafar e Owais, 2005; Ozmihci e Kargi, 2007; Gigliotti e Verga, 2007; Guimarães *et al.*, 2010).

La produzione mondiale di siero nel 2008 è stata di oltre 160 milioni di tonnellate l'anno, stimato in 9 volte la produzione di formaggio, e mostra un tasso di crescita annuale di 1-2% (OECD-FAO, 2008; Guimarães *et al.*, 2010); nel 2010 la produzione mondiale di siero è di oltre 180 milioni di tonnellate l'anno (stimato in 9 volte la produzione di formaggio), e mostra un tasso di crescita annuale del 3-4% circa (OECD-FAO 2010).

Secondo dati FAOSTAT nel 2010 la produzione mondiale di siero condensato è stata di 342.785 tonnellate a cui aggiungere la produzione di siero secco di 2.342.931 tonnellate. Inoltre, sempre dai dati FAOSTAT 2010 si può osservare che il mercato import/export di siero di latte è piuttosto limitato; è stato, infatti, caratterizzato da un'importazione di 26.839 tonnellate di siero di latte ed esportazioni per 5.467 tonnellate.

In Italia la produzione di siero di latte è stimata essere di circa sei milioni di tonnellate l'anno (Castelli, 2011).

Ci sono due varietà principali di siero, che derivano da tecnologie diverse (Grba *et al.*, 2002; Adrian *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2010):

- Il siero di latte dolce, che deriva dalla produzione di formaggi a pasta pressata e a pasta cotta, formaggi stagionati, e di caseina ottenuta per azione del presame. Un litro di questo siero contiene 65 g di residuo secco, di cui 48 g di lattosio, 8 g di proteine, 7 g di sali e circa 1 g di grassi (Adrian *et al.*, 2009), pH 6-7 (Guimarães *et al.*, 2010).
- Il siero di latte acido, che è sottoprodotto dei formaggi a pasta fresca e molle e della produzione di caseina lattica. L'acidificazione del latte provoca una maggiore demineralizzazione della cagliata; di conseguenza questo siero è caratterizzato da un tenore minerale più elevato del siero di latte dolce e pH più basso (Adrian *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2010).

La composizione di diversi tipi di siero di latte è variabile (Guimarães *et al.*, 2010).

Questo pregiato sottoprodotto della produzione di formaggio contiene molte delle sostanze nutritive del latte (Grba *et al.*, 2002), rappresenta circa il 85-95% del volume di latte e contiene circa il 50-55% dei solidi totali del latte (Rech *et al.*, 1999; Gigliotti e Verga, 2007; Guimarães *et al.*, 2010).

In particolare il siero è ricco di proteine 0,6-1% (Domingues *et al.*, 2000; Gigliotti e Verga, 2007; Foda *et al.*, 2010; Kargi e Ozmihci, 2006; Guimarães *et al.*, 2010), peptidi, lipidi 0,03-0,1% (Gigliotti e Verga, 2007; Kargi e Ozmihci, 2006; Guimarães *et al.*, 2010), sali minerali 0,5-0,8% (Gigliotti e Verga, 2007; Foda *et al.*, 2010), vitamine, acido lattico 0,2-0,8% (Gigliotti e Verga, 2007) e soprattutto lattosio 4-6% (Domingues *et al.*, 2000; Gigliotti e Verga, 2007; Foda *et al.*, 2010; Ozmihci e Kargi, 2007; Grba *et al.*, 2002; Kargi e Ozmihci, 2006; Guimarães *et al.*, 2010).

Il siero di latte contiene anche apprezzabili quantità di altri componenti, quali: acido citrico, composti azotati non proteici (urea e acido urico) e vitamine del gruppo B (Guimarães *et al.*, 2010). Questi valori ovviamente aumentano quando si parla di polvere di siero di latte commerciale che ha la seguente composizione media: acqua 5%, proteine 12%, lipidi 1,5%, ceneri 14% e lattosio 70% (Adrian *et al.*, 2009).

A causa del suo elevato livello di sostanze organiche, principalmente lattosio, il siero ha un elevato BOD (*biological oxygen demand*), circa 30-60 g•l⁻¹ (Rech *et al.*, 1999; Zafar *et al.*, 2005; Zafar e Owais, 2005; Koller *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010) a seconda del processo di caseificazione

utilizzata (Rech 1999) e un valore medio di COD (*chemical oxygen demand*) tra 60 e 80 g•l⁻¹ (Zafar *et al.*, 2005; Zafar e Owais, 2005, Guimarães *et al.*, 2010). In confronto, 5000 litri di siero di latte sono equivalenti all'effluente trattato di 2000 persone (Rech *et al.*, 1999). Il recupero di proteine riduce il COD del siero solo di circa 10 g•l⁻¹ (Guimarães *et al.*, 2010).

A dispetto dell'alto contenuto in zuccheri e proteine, il siero è sempre stato considerato uno scarto della filiera lattiero casearia.

L'utilizzo del siero di latte è stato una sfida da quando l'uomo ha iniziato a fare il formaggio (Guimarães *et al.*, 2010). Il principale problema del siero, a causa degli elevati volumi di produzione e della sua materia organica ad alto contenuto di carbonio (Guimarães *et al.*, 2010), è, infatti, il suo smaltimento attraverso il trattamento delle acque reflue (che rappresenta una delle maggiori fonti d'inquinamento delle acque) (Zafar *et al.*, 2005).

Siccome in passato la produzione di formaggio stava aumentando, e, di conseguenza, cresceva anche il volume di siero, molti caseifici costruiti nei pressi di corsi d'acqua scaricavano la maggior parte del siero di latte in questi (Guimarães *et al.*, 2010). Ancora oggi, non essendoci piani per l'utilizzazione del siero in molti paesi del mondo si creano problemi d'inquinamento (Foda *et al.*, 2010). Inoltre, anche se ci sono stati provvedimenti che vietano il suo scarico nei corsi d'acqua e nelle reti fognarie, i trattamenti convenzionali non sono adatti ridurre a sufficienza il carico inquinante del siero (Guimarães *et al.*, 2010).

Al fine di sviluppare soluzioni integrate, il siero deve essere considerato come una risorsa e non solo come una sostanza di scarto, in vista del suo grande potenziale come fonte di prodotti con valore aggiunto (Guimarães *et al.*, 2010) anche se una forte limitazione all'impiego di tale substrato è dovuta ai costi di stoccaggio e di trasporto, in relazione al limitato contenuto di lattosio (Manzoni, 2006).

La scotta

Il siero di latte può essere utilizzato per la produzione di ricotta e quindi per effetto del calore, a temperature che oscillano tra i 75 e i 90°C, si verifica la coagulazione delle siero proteine, che inglobano il grasso del siero e formano un precipitato, costituito essenzialmente da lattoalbumina unita a grasso, lattosio e sali minerali, che risale in superficie. La massa proteica è, quindi, raccolta e posta in apposite forme a sgocciolare, per la produzione della ricotta, mentre, il liquido rimanente prende il nome di scotta (Ottogalli, 2002; Cappelli, 2005).

La scotta, chiamata anche siero di ricotta (*Ricotta cheese whey*), è uno scarto dell'industria casearia caratterizzato da un contenuto in lattosio di circa 45-50 g•l⁻¹ e da un contenuto proteico molto inferiore (0,22 - 0,24% in peso) rispetto al siero di latte grezzo (Saraceno *et al.*, 2010; Sansonetti *et al.*, 2009) e da valori di BOD di 50 g•l⁻¹ e di COD di 80 g•l⁻¹. (Sansonetti *et al.*, 2009). Inoltre si stima che produzione italiana ammonti a circa 1Mt l'anno, determinando così notevoli problemi ambientali legati al suo smaltimento (Sansonetti *et al.*, 2009).

1.1.2 Il lattosio

Il lattosio è l'unico disaccaride di origine animale che si trova nel latte (Cappelli, 2005) e ne costituisce la quasi totalità degli zuccheri (Gigliotti e Verga, 2007), con una concentrazione compresa tra 4,5 e 5 g•100ml⁻¹ (Corradini, 1995), che rappresenta circa 4,7-5% (peso/volume). Una concentrazione simile si riscontra anche nel siero, frazione liquida ottenuta dalla lavorazione del formaggio, dopo la fase di coagulazione (Gigliotti e Verga, 2007).

Il lattosio C₁₂H₂₂O₁₁ con peso molecolare di 342 (Corradini, 1995) viene sintetizzato dalle cellule delle ghiandole mammarie, in presenza di α -lattoalbumina (Cappelli, 2005) a partire dal glucosio ematico (Adrian *et al.*, 2009). La molecola di lattosio è costituita da glucosio e galattosio, entrambi in forma piranica legati in β 1→4; il suo nome chimico è 1- β galattopiranosil – 4 ($\alpha\beta$) glucopiranosio (Corradini, 1995; Adrian *et al.*, 2009, Guimarães *et al.*, 2010). È un solido cristallino, incolore, riducente (Quagliarini *et al.*, 1995) e poco solubile in acqua: il suo limite di solubilità è di 22 g per 100 g di acqua a 25°C (Corradini, 1995; Quagliarini *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 2010). Il lattosio svolge un leggero effetto dolcificante sul latte, anche se molto ridotto rispetto al saccarosio che è 6 volte più dolcificante. Il lattosio è idrolizzato nei due monomeri che in tal modo possono essere utilizzati dai batteri lattici per produrre acido lattico, responsabile dell'acidificazione del latte (Gigliotti e Verga, 2007).

1.1.3 La valorizzazione dei sottoprodotti

Il siero

Il problema dell'utilizzo del siero di latte o del lattosio del siero è stato ben descritto in letteratura (Grba *et al.*, 2002).

Le prime modalità di smaltimento del siero riguardarono i fiumi, i laghi o l'oceano, oppure il convogliamento in grotte, o lo spandimento su campi. Un'altra opzione è quella di scaricare il siero di latte in lagune di ossidazione o nella rete fognaria. Ma lo smaltimento del siero di latte in questo modo non fornisce alcun prodotto di valore, ed è impegnativo e costoso (Domingues *et al.*, 2000; Grba *et al.*, 2002; Guimarães *et al.*, 2010). Pertanto, visto il grande potenziale del siero come fonte di prodotti con valore aggiunto (Guimarães *et al.*, 2010) si possono pensare altri utilizzi che vadano oltre il semplice smaltimento, come ad esempio la fabbricazione della ricotta (Cappelli, 2005).

Il primo passo nella maggior parte delle procedure di valorizzazione del siero consiste nel recupero della frazione di proteine (Guimarães *et al.*, 2010). Il siero può, infatti, essere demineralizzato, ultrafiltrato, concentrato, essiccato ecc. per recuperare i microelementi di maggiore valore nutrizionale come proteine e lattosio (Gigliotti e Verga, 2007; Cappelli, 2005).

Le proteine del siero rappresentano circa il 20% delle proteine del latte (Guimarães *et al.*, 2010), sono contenute in concentrazione del 30-60% nei concentrati di siero e rappresentano una fonte proteica abbastanza competitiva rispetto alla soia (Gigliotti e Verga, 2007). La separazione delle proteine del siero di latte è tipicamente raggiunta mediante ultrafiltrazione o diafiltrazione per produrre le cosiddette “proteine del siero concentrato” (*WPC = whey protein concentrates*) (Figura 2), che hanno molte applicazioni nell'industria alimentare (Domingues *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2010). Le proteine del siero hanno anche usi non alimentari, soprattutto nei prodotti cosmetici e nei prodotti farmaceutici (Audic *et al.*, 2003, Guimarães *et al.*, 2010).

Soltanto una piccola parte del siero di latte, a livello mondiale, viene impiegata per produrre lattosio poiché la domanda che proviene dai settori alimentare e farmaceutico è limitata e gli investimenti richiesti sono elevati (Gigliotti e Verga, 2007).



Figura 2. Vie di utilizzazione del siero di latte (Gigliotti e Verga, 2007).

Il siero di latte trova anche in parte impiego in alimentazione animale come mangime (Manzoni, 2006; Guimarães *et al.*, 2010; Cappelli, 2005; Domingues *et al.*, 2000). Infatti, la gran parte del siero viene utilizzata in Italia per l'allevamento dei suini sia tal quale che dopo opportuni trattamenti per migliorarne sia la conservabilità che il valore nutrizionale (Gigliotti e Verga, 2007; Ottogalli, 2002).

Circa il 50% del totale della produzione mondiale di siero di latte è trattato e trasformato in vari prodotti alimentari (Guimarães *et al.*, 2010).

Una grande frazione del siero di latte viene lavorata ed essiccata per produrre siero di latte in polvere, mantenendo così la qualità per un periodo di tempo più lungo rispetto al siero fresco e facilitando la manipolazione e il trasporto (Guimarães *et al.*, 2010; Biavati e Sorlini, 2008). Il siero in polvere è principalmente utilizzato per l'alimentazione animale ma piccole quantità possono essere utilizzati anche negli alimenti umani, come gelati, prodotti da forno, dolci, salse, derivati del latte, ecc. (Guimarães *et al.*, 2010).

Nell'alimentazione di molte persone soprattutto anziane il lattosio causa però problemi perché queste persone non sono in grado di idrolizzare il lattosio, a causa della mancanza di β -galattosidasi nel loro tratto digestivo. Stesso problema si riscontra con l'utilizzo di lattosio del siero di latte (o latte) per l'alimentazione dei maiali adulti, mentre i suini giovani non hanno problemi nel consumarlo. Questo ha portato molte limitazioni nell'uso di siero di latte nell'alimentazione umana o animale. Un'alternativa per l'uso del siero è di idrolizzare con l'enzima lattasi il suo lattosio a glucosio e galattosio. L'idrolisi è molto utile per il miglioramento dei processi per la produzione di gelato o alimenti per l'infanzia (Grba *et al.*, 2002).

La parte non destinata all'allevamento dei suini, o all'estrazione di composti richiesti dal settore mangimistico, può essere usata come substrato per la digestione anaerobica (Castelli, 2011).

Il siero, inoltre, può essere impiegato in processi come la produzione di acidi organici (Manzoni, 2006) come ad esempio l'acido lattico (Domingues *et al.*, 2000; Grba *et al.*, 2002).

Il siero può essere anche utilizzato come *pabulum* per la produzione di biomasse microbiche utilizzando microrganismi che sfruttano il lattosio, come ad esempio i lieviti (Domingues *et al.*, 2000; Manzoni, 2006, Grba *et al.*, 2002; Cappelli, 2005).

Viene anche considerato uno dei substrati più interessanti per la produzione di *single-cell protein* (SCP). La sua importanza è dovuta all'ampia disponibilità, all'accettabilità (provenienza dal settore agro-alimentare ed utilizzo di agenti biologici quali i lieviti ed i batteri lattici già presenti nell'alimentazione sia umana che animale) ed al basso costo (Gigliotti e Verga, 2007).

Usi alternativi del lattosio attualmente comprendono la sua riduzione a lattilolo, l'isomerizzazione a lattulosio, od ancora la trasformazione in lattosilurea, impiegata come forma di azoto non proteico nei mangimi per ruminanti permettendo di ridurre i livelli di ammonio che sono tossici (Gigliotti e Verga, 2007).

Alternativamente può essere utilizzato, in funzione del suo elevato contenuto di zuccheri, in particolare di lattosio, in processi come la produzione di etanolo (Domingues *et al.*, 2000; Manzoni, 2006; Zafar e Owais, 2005; Ozmihici e Kargi, 2007; Grba *et al.*, 2002; Kargi e Ozmihici, 2006) per fermentazione alcolica del lattosio.

La scotta

La scotta non è riutilizzata in alcun modo ed è, pertanto, considerata solo uno scarto industriale. La scotta, perciò, potrebbe rappresentare un'efficace fonte non vegetale di produzione di energia rinnovabile (Sansonettil *et al.*, 2009; Foda *et al.*, 2010) può, infatti, potenzialmente rappresentare un interessante substrato di fermentazione per la sua caratteristica principale, cioè il suo significativo contenuto di zuccheri fermentabili e per il suo basso costo (Sansonettil *et al.*, 2009).

Il lattosio

La maggior parte del lattosio è prodotta recuperandolo dal siero di latte o dal siero di latte permeato con operazioni che implicano la cristallizzazione (Gänzle *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010).

Il lattosio è stato per lungo tempo impiegato quale fonte di carbonio classica per la produzione di penicillina, poiché, essendo una fonte di carbonio più lentamente metabolizzabile rispetto ad altri carboidrati (ad esempio il glucosio) contribuisce alla rimozione dei meccanismi di repressione catabolica da carbonio (Manzoni, 2006). Gli utilizzi principali del lattosio sono come ingrediente alimentare, ingrediente per cibi per bambini, come riempimento o rivestimento per le compresse per l'industria farmaceutica e come materia prima per la produzione di derivati del lattosio (come lattulosio, lattitolo, acido lattobionico, urea lactosyl e galatto-oligosaccaridi) (Zadow, 1984; Audic *et al.*, 2003; Gänzle *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010). Le soluzioni d'idrolizzato di lattosio possiedono un potere dolcificante superiore a quello del lattosio e hanno un'utilizzazione connessa con il settore alimentare, in particolare nelle industrie dolciarie e dei gelati in sostituzione allo sciroppo di saccarosio o amido (Zadow, 1984; Quaglierini *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 2010). La tecnologia per la produzione di sciroppo di lattosio idrolizzato è ben sviluppata ed è utilizzata, per esempio, per produrre latticini con lattosio idrolizzato per individui intolleranti al lattosio, visto che l'idrolisi di questo elimina tale inconveniente (Gänzle *et al.*, 2008; Quaglierini *et al.*, 1995).

Un'altra applicazione importante per il lattosio del siero di latte, o permeato, è il suo uso come substrato per fermentazione per la produzione di composti di valore. Gli esempi classici sono l'etanolo e la produzione di SCP in processi biologici a base di lievito, con una moltitudine di bio-prodotti alternativi (Audic *et al.*, 2003; Siso, 1996; Yang e Silva, 1995; Zadow, 1984). Tra questi bio-prodotti ci sono: biogas (metano), acidi organici (acetico, propionico, lattico, citrico, gluconico, itaconico, e gibberellico), aminoacidi (glutammico, lisina e treonina), vitamine (B12 e B2), polisaccaridi (xanthan gum, destrano, fosfomannano, pullulano, e gellano), oli (lipidi), enzimi (β -galattosidasi e poligalattoronasi) e altri composti (fruttosio-difosfato, 2,3-butandiolo, magnesio calcio acetato, lattato di ammonio, butanolo e glicerolo) (Guimarães *et al.*, 2010).

Il lattosio può essere utilizzato direttamente da microrganismi che esprimono sia i trasportatori di membrana lattosio permeasi sia l'enzima idrolitico β -galattosidasi (Grba *et al.*, 2002), in alternativa, in soluzioni pre-idrolizzate può essere utilizzato come substrato da microrganismi lattosio-negativi (Guimarães *et al.*, 2010).

L'ampio surplus di siero e scotta, il loro elevato contenuto in lattosio, la necessità di substrati a basso costo e largamente disponibili e, soprattutto, il rapido progresso della biotecnologia microbica è probabile che spingano ulteriormente verso lo sfruttamento del lattosio, del siero di latte e della scotta come substrati per la fermentazione alcolica per ottenere biocombustibili da fonti rinnovabili (Guimarães *et al.*, 2010) preferibili a quelli derivati da combustibili fossili.

1.2 La fermentazione alcolica

Nuovi processi che consentano reimpieghi per il siero di latte e la scotta possono, quindi, risultare utili sia per ridurre il costo dello smaltimento dei reflui, sia per migliorare il valore aggiunto dei processi lattiero caseari. Grazie al contenuto in lattosio di entrambe le matrici, la fermentazione alcolica è un'alternativa interessante per ottenere da questi scarti un biocombustibile: il bioetanolo. Vengono quindi, qui di seguito, analizzate le principali caratteristiche dei processi fermentativi in generale e nello specifico della fermentazione alcolica a carico del lattosio del siero di latte.

1.2.1 La fermentazione

La fermentazione alcolica è la trasformazione dei glucidi più importante, sfruttata da secoli per la produzione di vino, birra e pane (Cappelli, 2005). Può essere definita come processo grazie al quale un microrganismo converte zuccheri in etanolo. Ha come substrato glucosio e fruttosio e si può schematizzare così:



glucosio \rightarrow alcol etilico + anidride carbonica

La fermentazione alcolica è una fra le vie metaboliche più diffuse a livello microbico (Donadio e Marino, 2008) ed è presente in molti microrganismi anaerobi e anaerobi facoltativi, in particolare batteri e lieviti (Biavati e Sorlini, 2008). Il lievito *Saccharomyces cereviasae* e il batterio *Zymomonas mobilis* sono i microrganismi che producono etanolo con le più alte conversioni di zuccheri quali saccarosio, glucosio e fruttosio (Biavati e Sorlini, 2008). Le caratteristiche di un organismo produttore ideale di etanolo sono individuabili nella capacità di:

- utilizzare un'ampia gamma di fonti di carbonio;
- utilizzare fonti a basso costo e di facile reperibilità;
- produrre etanolo con alte rese e alte produttività;
- tollerare alte concentrazioni di etanolo;
- tollerare le pressioni osmotiche causate dall'elevata concentrazione di substrato iniziale;
- crescere a temperature elevate, per ridurre il rischio di contaminazioni e per facilitare il recupero del prodotto;
- flocculare facilmente, per semplificare le operazioni di separazione della biomassa (Donadio e Marino, 2008).

Un altro parametro da prendere in considerazione è il tempo di reazione: la fermentazione deve essere veloce per massimizzare la produttività del processo.

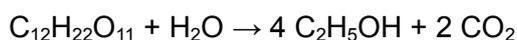
Tuttavia, una buona fermentazione deve essere fatta trovando un compromesso tra la massimizzazione del titolo di etanolo, la produttività e la riduzione al minimo della concentrazione

di zuccheri residui nell'effluente, quando lo scopo del processo è anche il trattamento dei reflui (Guimarães *et al.*, 2010).

1.2.2 La fermentazione alcolica dei prodotti lattiero caseari

La fermentazione del lattosio del siero di latte in etanolo, in particolare utilizzando lieviti, è stata spesso indicata in letteratura, a partire dal 1940 (Guimarães *et al.*, 2010).

Il contenuto relativamente elevato di lattosio presente consente la bioconversione in etanolo, secondo la reazione:



lattosio + acqua → alcol etilico + anidride carbonica

che predice una resa teorica di 0,538 g di etanolo per grammo di lattosio consumato (Sansonetti *et al.*, 2009).

La conversione del lattosio del siero di latte o di siero permeato (liquido che viene raccolto dopo l'ultrafiltrazione del siero) in etanolo combustibile è considerata non economicamente competitiva con gli attuali processi (Banat *et al.*, 1982; Grba *et al.* 2002; Ozmihici e Kargi, 2007; Guimarães *et al.*, 2010) rispetto alla fermentazione di altri substrati, come la canna da zucchero o il mais, o emergenti tecnologie di seconda generazione che utilizzano biomasse lignocellulosiche come materia prima (Guimarães *et al.*, 2010).

Il siero di latte contiene il 4-6% di lattosio, con una produzione possibile di 2,5% circa di etanolo per fermentazione diretta. Tale contenuto viene considerato non economicamente competitivo se confrontato con le rese delle biomasse sopracitate (Kargi e Ozmihici, 2006). Inoltre, più basso risulterà il contenuto di lattosio, più basso sarà titolo di etanolo ottenuto, richiedendo anche elevate quantità di energia (Banat *et al.*, 1982; Grba *et al.*, 2002) per il processo di distillazione di conseguenza troppo costoso (Guimarães *et al.*, 2010).

Guimarães consiglia perciò di avviare la fermentazione con un'elevata concentrazione di lattosio di partenza, che può essere garantito concentrando il siero di latte, ad esempio per ultrafiltrazione e/o con processi di osmosi inversa. Il processo di ultrafiltrazione è costoso (Kargi e Ozmihici, 2006; Ozmihici e Kargi, 2007) e migliora la concentrazione di lattosio solo di 5 volte (Ozmihici e Kargi, 2007). L'utilizzo di siero in polvere, invece, elimina l'ultrafiltrazione e fornisce una fonte di nutrienti concentrata migliorando l'economia di processo delle fermentazioni (Kargi e Ozmihici, 2006; Ozmihici e Kargi, 2007).

Per ottenere un titolo in etanolo di più elevato al termine della fermentazione, in alternativa, il siero grezzo può essere miscelato con substrati con alto contenuto in zuccheri come la melassa, anche se le miscele troppo ricche di zuccheri possono indurre nel lievito utilizzato una repressione da catabolita che inibisce il consumo di lattosio (Guimarães *et al.*, 2010). Oltre al lattosio, il siero di latte contiene vitamine e minerali, che possono migliorare l'attività fisiologica delle cellule di lievito

(Zafar 2005, 2006).

Tuttavia, occorre considerare il vantaggio dato dal fatto che il siero di latte è un prodotto di scarto, infatti, se utilizzato per produrre fonti di energie rinnovabili, non entra in competizione con usi alimentari come nel caso del mais (Guimarães *et al.*, 2010). Inoltre, la disponibilità di diverse soluzioni per l'abbattimento del carico inquinante del siero è preziosa (Zafar *et al.*, 2005, Guimarães *et al.*, 2010), in modo che ogni caseificio sia in grado di valutare, in base alle proprie specificità, il migliore modo di affrontare il problema ambientale. Infine, l'etanolo da siero è sicuro da bere, e quindi può trovare adeguati mercati, ad esempio in alimenti e bevande, in industria farmaceutica e cosmetica (Guimarães *et al.*, 2010).

È interessante notare che le quantità di lattosio disponibili sono piuttosto rilevanti. Se si tiene conto di una produzione annuale mondiale di 180 milioni di tonnellate di siero di latte (OECD-FAO, 2010) con il 5% di lattosio, ciò significa che sono disponibili circa 9 milioni di tonnellate di lattosio. L'eccedenza di lattosio (cioè quello che non viene utilizzato per i prodotti a base di siero di latte) negli Stati Uniti nel 2006 è stata stimata essere superiore al 55% del lattosio totale del siero di latte prodotto (Guimarães *et al.*, 2010). Pertanto, la quantità di lattosio disponibile per la produzione di etanolo può essere circa 4,5 milioni di tonnellate l'anno, che, considerando un rendimento di conversione dell'85%, potrebbe produrre circa 2,3 milioni di m³ di etanolo (Guimarães *et al.*, 2010). Il contenuto relativamente elevato di lattosio presente anche nella scotta (45-50 g·l⁻¹) effettivamente suggerisce la possibilità di bioconversione in etanolo attraverso la fermentazione alcolica, anche se nessun autore identifica la scotta come potenziale fonte per la produzione di bioetanolo con l'esclusione di Sansonetti e Saraceno, auspicando una riduzione del BOD della scotta ottenuta, per esempio, dalla fermentazione alcolica di lattosio effettuata da *Kluyveromyces marxianus*.

Al fine di ottimizzare il processo fermentativo, di assoluta importanza risulta essere la scelta del lievito il quale deve rispondere a determinate caratteristiche fisiologiche.

Infatti, per ottenere un buon utilizzo di lattosio da siero di latte è particolarmente importante scegliere un ceppo con idonee caratteristiche fisiologiche (Zafar *et al.*, 2005, Zafar e Owais, 2005). La presenza di lattosio come unico carboidrato fermentabile ne limita il suo utilizzo a fermentazioni selettive (Zafar e Owais, 2005). Sebbene i lieviti che assimilano lattosio aerobicamente siano molto diffusi, non molti ceppi sono capaci di fermentarlo in etanolo (Kargi e Ozmihci, 2006; Guimarães *et al.*, 2010): lo sono solo quei microrganismi che sono in grado di utilizzare il lattosio con l'enzima idrolitico, β -galattosidasi (Zafar e Owais, 2005) tra cui ad esempio *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, e *Candida pseudotropicalis* (Kargi e Ozmihci, 2006; Guimarães *et al.*, 2010). Mentre la maggior parte delle specie di *Saccharomyces* non possono fermentare il lattosio in etanolo a causa della mancanza di enzimi per la fermentazione del galattosio (Kargi e Ozmihci, 2006); una volta idrolizzato il lattosio in glucosio e galattosio, infatti, solo il glucosio è convertito in etanolo, perciò la resa è inferiore al 50%.

1.3 Il lievito *Kluyveromyces marxianus*

Ceppi di *K. marxianus* sono stati isolati da una grande varietà di habitat, questo è all'origine della grande diversità metabolica della specie e la conseguente vasta gamma di possibili applicazioni biotecnologiche (Fonseca *et al.*, 2008, Guimarães *et al.*, 2010). Gli habitat da cui i ceppi sono stati isolati includono: alimenti fermentati, prodotti lattiero caseari come yogurt, formaggi a pasta molle, latte mastitico, *koumiss* (una bevanda a base di latte di cavalla fermentato), ma anche birra bantu, farina di mais, foglie marce di sisal, acque di scolo di zuccherificio, e vari tipi di lesioni umane e animali (Fonseca *et al.*, 2008, Zambonelli *et al.*, 2001; Carri, 2008).

1.3.1 La tassonomia

Kluyveromyces marxianus è un lievito sporigeno (Zambonelli *et al.*, 2001) ed è stato descritto per la prima volta nel 1888 da Hansen, che lo isolò da uve e lo chiamò *Saccharomyces marxianus* (Fonseca *et al.*, 2008).

Nella monografia di Lodder e Kreger-van Rij del 1952 vengono descritti dieci ceppi di *Saccharomyces marxianus*, tra cui un particolare ceppo etichettato come *Zygosaccharomyces marxianus*, che era stato depositato presso la Schimmelcultures voor Centraalbureau (CBS) nel 1922; questo corrisponde al presente ceppo CBS 712 di *Kluyveromyces marxianus* (Fonseca *et al.*, 2008).

Il genere *Kluyveromyces* è stato creato da van derWalt nel 1956 per ospitare *K. polysporus*, specie tipo con aschi di grandi dimensioni e contenenti un gran numero di ascospore (a volte 50 o più) (Lachance, 2007; Fonseca *et al.*, 2008) (Figura 3).

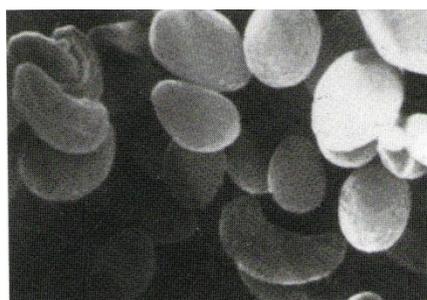


Figura 3. spore libere di *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* viste al SEM. Ingrandimento X 6000 (Tratto da Zambonelli 2001).

In *Kluyveromyces* sono state trasferite specie come *Saccharomyces fragilis* e *S. marxianus*, oltre *S. lactis* che era stato precedentemente assegnato a *Saccharomyces* (Lachance, 2007; Fonseca *et al.*, 2008). I tratti comuni del genere sono la deliquescenza degli aschi, ascospore non ornate, e la presenza di fermentazione vigorosa. La definizione di specie all'interno di questo genere è stata alquanto controversa (Lachance, 2007). Il genere *Kluyveromyces* comprendeva 18 specie tra cui

Kluyveromyces fragilis che è ritenuto strettamente correlato, ma ancora separato da *K. marxianus*, principalmente a causa dell'elevata capacità di fermentare lattosio di quest'ultimo (Fonseca *et al.*, 2008).

Fonseca riporta che nella terza edizione dello studio tassonomico "I lieviti" del 1984, il genere *Kluyveromyces* è stato suddiviso in 11 specie; mentre nella più recente edizione di questo studio di Kurtzman e Fell del 1998, il capitolo sul genere *Kluyveromyces* comprende 15 specie. Usando come criteri di classificazione l'esame della struttura genetica delle popolazioni in combinazione con la capacità d'ibridazione, le precedenti specie *Kluyveromyces bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. fragilis*, *K. wikenii* e *Candida pseudotropicalis* non potevano essere considerate distinte da *K. marxianus* (Lachance, 2007; Fonseca *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010); mentre i primi sono tutti riportati come sinonimi *K. marxianus*, *Candida pseudotropicalis* (sinonimo di *Candida kefyri*) è la forma anamorfica (asessuale) di *K. marxianus* (Guimarães *et al.*, 2010, NCBI).

Le ultime relazioni sulla tassonomia dei lieviti *Kluyveromyces*, invece di eseguire confronti di un singolo gene, impiegano l'analisi di sequenza multigeniche per chiarire la filogenesi dei diversi ceppi e per costruire alberi filogenetici dei lieviti (Lachance, 2007; Fonseca *et al.*, 2008). L'approccio sequenza-base ha avuto un profondo impatto sulla comprensione del genere *Kluyveromyces*; usando questo metodo si è dimostrato che il genere *Kluyveromyces* contiene solo sei specie (Figura 4) e la specie *K. marxianus* si propone come specie tipo (Lachance, 2007; Fonseca *et al.*, 2008).

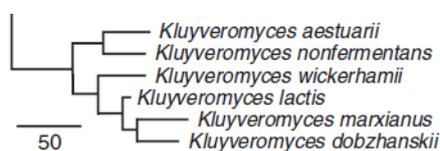


Figura 4. Collocazione filogenetica delle specie attualmente assegnati a *Kluyveromyces* (Tratto da Lachance, 2007).

1.3.2 Biochimica, metabolismo e fisiologia

Dal 1970, un certo numero di studi è stato pubblicato su aspetti biochimici e metabolici di diversi ceppi di *K. marxianus* (Fonseca *et al.*, 2008). In bibliografia *K. marxianus* si trova al centro di diversi studi che riguardano (Fonseca *et al.*, 2008):

- analisi enzimatica (fruttosio 1,6-bisfosfatasi, uridina difosfato (UDP), glucosio-4-epimerasi, fosfatasi acida, ossidasi ammina) e biochimica di enzimi che hanno interesse industriale (inulinasi, β -galattosidasi, β -glucosidasi, endopoligalatturonasi, proteine fosfatasi, carbossipeptidasi, e aminopeptidasi);
- trasporto di zuccheri (lattosio, glucosio, fruttosio, galattosio, xilosio);
- produzione di acidi organici (acido lattico e acido malico);

- studi metabolici (assenza del complesso I della catena respiratoria, regolazione dell'adenilato ciclasi da proteine Ras, caratterizzazione funzionale di Mig1p (coinvolti nella repressione di glucosio), analisi della composizione della parete cellulare);
- resistenza ai farmaci (presenza di pompe di efflusso);
- regolazione della nicotinammide adenin dinucleotide fosfato (forma ossidata) (NADP⁺) - dipendente glutammato deidrogenasi.

Il primo chiaro confronto fisiologico di *K. marxianus* con *S. cerevisiae*, è stato effettuato nel 1973 da Chassang-Douillet *et al.* con mezzi sintetici e ha dimostrando che il cosiddetto effetto glucosio (effetto Crabtree) era assente in *K. marxianus*, al contrario di *S. cerevisiae* (Fonseca *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010). È stato dimostrato che *K. marxianus* presenta un forte carattere Crabtree-negativo: l'effetto Crabtree determina la predominanza, in alcuni lieviti, del metabolismo fermentativo, ad alte concentrazioni di glucosio, sul metabolismo respiratorio, anche in presenza di ossigeno. Ad alte concentrazioni di glucosio, anche in presenza di ossigeno, il NADH, generato durante la glicolisi, è ossidato principalmente nella fermentazione piuttosto che nella respirazione (Donadio e Marino, 2008). In *K. marxianus* nessuna produzione di etanolo è stata osservata dopo un impulso di glucosio applicata alle cellule che respirano, contrariamente a quanto comunemente osservato con *S. cerevisiae*, e anche con *K. lactis* in misura minore; questo evidenzia il carattere Crabtree-negativo (Fonseca *et al.*, 2008).

K. marxianus è stato classificato come fermentativo facoltativo (Fonseca *et al.*, 2008). Durante la fermentazione la fornitura di ossigeno deve essere sufficiente a soddisfare le necessità per la biosintesi dei lipidi di membrana (steroli ed acidi grassi insaturi), senza causare la crescita eccessiva del lievito che può ridurre la resa di etanolo (Guimarães *et al.*, 2010). Bassi livelli di ossigeno favoriscono il metabolismo fermentativo, che porta ad elevate concentrazioni di etanolo (Hack e Marchant, 1998, Guimarães *et al.*, 2010). Altri studi precedenti hanno affrontato anche l'influenza dell'ossigeno sui modelli di metabolismo energetico di *K. marxianus* coltivato in lattosio sostenendo che le rese in biomassa sono state elevate con limitazione di ossigeno (Castrillo *et al.*, 1996; Castrillo e Ugalde, 1993). È importante notare che *K. marxianus* non può crescere in condizioni rigorosamente anaerobiche e che la formazione di etanolo è legata quasi esclusivamente alla limitazione dell'ossigeno (Fonseca *et al.*, 2008).

K. marxianus è caratterizzato, infatti, anche dall'effetto Pasteur: il lievito cresce visibilmente se alimento adeguatamente con ossigeno, ma la crescita rallenta in modo evidente e fermenta, sfruttando la sola glicolisi, quando l'ossigeno è presente in condizioni limitanti. Per avere quindi uno sviluppo ottimale occorre modulare la quantità di zuccheri e l'aerazione (Donadio e Marino, 2008.)

K. marxianus è stato anche definito come un lievito respiratorio: solo quantità limitate di glucosio vengono convertite in etanolo in condizioni aerobiche (Hack e Marchant, 1998) e in condizioni rigorosamente anaerobiche, *K. marxianus* non è capace di un alto tasso di crescita come *S.*

cerevisiae, ma continua a produrre etanolo (Singh *et al.*, 1998, Donadio e Marino, 2008).

La fermentazione del lattosio è possibile solo da parte di microrganismi in grado di produrre sia il trasportatore di membrana, lattosio permeasi (codificato dal gene LAC12), che l'enzima β -galattosidasi (LAC4 gene) che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio (Figura 5) (Zambonelli *et al.*, 2001, Zafar *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2010). Va rilevato che la β -galattosidasi è un enzima intracellulare e che la sua presenza non è di per sé sufficiente a conferire la capacità di idrolizzare il disaccaride: a questo fine è necessaria anche la presenza della permeasi specifica che trasporta il composto all'interno delle cellule. (Carvalho-Silva e Spencer-Martins 1990, Zambonelli *et al.*, 2001). Rech (1999) mostra nel suo lavoro che nel ceppo di *K. marxianus* CBS 712 la produzione di β -galattosidasi è simile ad un altro ceppo, il CBS 6556, e in entrambi la β -galattosidasi segue l'andamento della curva di crescita, inoltre, afferma che l'enzima prodotto dai due ceppi è stabile e la massima concentrazione β -galattosidasi è stata segnalata a 37°C, diminuendo rapidamente a temperature superiori a 40°C (Rech *et al.*, 1999).

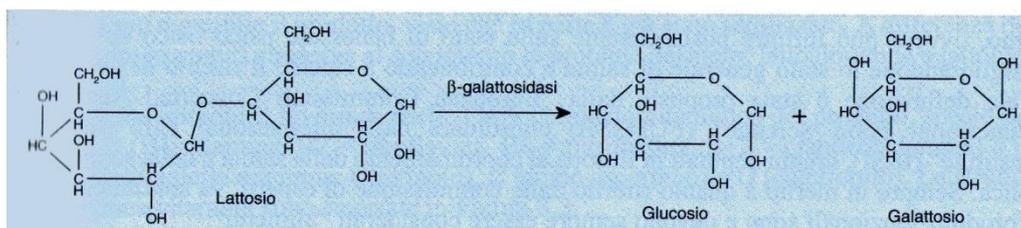


Figura 5. Idrolisi del lattosio catalizzata dall'enzima β -galattosidasi (Verga 2007).

Un aspetto importante nella fisiologia di *K. marxianus* è il fatto che i parametri di crescita, come μ_{max} (tasso di crescita specifica massima) e $Y_{x/s}$ (coefficiente di resa di biomassa per substrato consumato in un intervallo di tempo definito), sono significativamente diversi non solo per ceppi differenti all'interno della specie, ma anche per lo stesso ceppo quando questo viene studiato in laboratori diversi (Fonseca *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2008). L'ovvia conseguenza è che la diversità metabolica sia ampia e quindi, le potenziali applicazioni biotecnologiche di ceppi di *K. marxianus* siano molteplici (Fonseca *et al.*, 2008).

1.3.3 Le applicazioni biotecnologiche

Lo sviluppo di applicazioni biotecnologiche con *K. marxianus* è stato motivato da una serie di vantaggi che ha rispetto a *K. lactis*. Questi includono il fatto che può crescere su una varietà più ampia di substrati e ad alte temperature, ha tassi di crescita specifici più elevati (Fonseca *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2008). Inoltre, il fatto che diversi ceppi di *K. marxianus* hanno ottenuto lo stato di GRAS (*generally recognized as safe*), è un vantaggio in termini di processo di approvazione da parte delle agenzie di regolamentazione (Fonseca *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*,

2008).

Kluyveromyces sp. produce composti aromatici nel liquido di fermentazione come: esteri della frutta, acidi carbossilici, chetoni, alcoli, furani, alcoli monoterpenei, acetato di isoamile e il 2-fenil etanolo (2-PE), con aroma di petali di rosa, che è il più importante commercialmente parlando (Fonseca *et al.*, 2008).

K. marxianus possiede la naturale capacità di secernere enzimi tra cui gli enzimi pectolitici, tra cui le endo-poligalatturonasi (Fonseca *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2008; Serrat *et al.*, 2004). Inoltre *K. marxianus* è stato ampiamente studiato per la produzione d'inulinasi, enzima che scinde molecole di inulina in fruttosio, finalizzato alla produzione di sciroppo di fruttosio (Fonseca *et al.*, 2007, Fonseca *et al.*, 2008, Zambonelli *et al.*, 2001, Yopez Silva *et al.*, 2009).

K. marxianus è stato anche proposto come fonte di:

- oligonucleotidi utilizzati come esaltatori di sapidità nei prodotti alimentari,
- oligosaccaridi usati come prebiotici,
- oligopeptidi immuno stimolatori aggiunti ai prodotti caseari,
- alcalino-glucani insolubili,
- bioemulsificante naturale (Fonseca *et al.*, 2008).

Altre potenziali applicazioni del lievito *K. marxianus*, possono essere il suo utilizzo come lievito di birra, come agente anticolesterolemico e come un ospite per la produzione di proteine eterologhe (Fonseca *et al.*, 2007 Fonseca *et al.*, 2008). Ultimo ma non meno importante, *K. marxianus* è stato definito da diversi studi come il più adeguato per la bioconversione di lattosio del siero, in biomassa, etanolo o β -galattosidasi (Guimarães *et al.*, 2010, Carvalho-Silva e Spencer-Martins, 1990).

1.3.4 I parametri di crescita

Temperatura

Le applicazioni di microrganismi termofili, a livello industriale sono state da sempre ampiamente auspiccate, ma non ancora del tutto indagate per la produzione di bioetanolo, e quindi la ricerca relativa a questo argomento è ancora in corso (Banat *et al.*, 1998). La produzione di etanolo industriale dipende dall'attività microbica, in particolare dai lieviti e in questi processi i vantaggi relativi all'alta temperatura sono:

- risparmi energetici ottenuti attraverso una riduzione dei costi di raffreddamento; minor frequenza di arresti della produzione a causa di problemi di surriscaldamento, generalmente presenti nelle aree / stagioni con alta temperatura ambientale (Anderson *et al.*, 1986; Gough *et al.*, 1996; Banat *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Fonseca *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010);
- il possibile strippaggio continuo di etanolo come metodo di raccolta (Banat *et al.*,

1998; Fonseca *et al.*, 2008);

- riduzione significativa della probabilità di contaminazione (Banat *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Fonseca *et al.*, 2008);
- riduzione del volume di distillazione (Banat *et al.*, 1998);
- maggiore tasso di produttività e maggiore facilità con cui il prodotto può essere recuperato (Anderson *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1998; Fonseca *et al.*, 2008).

Temperature elevate riscontrate in genere in diverse regioni geografiche possono influenzare negativamente i processi industriali di fermentazione; oltre a questo, i brodi di fermentazione possono riscaldarsi a causa di reazioni esotermiche metaboliche (Banat *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1986). Di conseguenza, la temperatura del recipiente di fermentazione può innalzarsi al di sopra di 40°C, portando a produttività di etanolo ridotte. In alcune di queste industrie, questo problema di surriscaldamento viene superato parzialmente spruzzando acqua fredda sulle pareti dei vasi di fermentazione, ciò però aumenta i costi di produzione (Banat *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1986). La disponibilità di ceppi di lievito termotolleranti offre quindi il vantaggio di consentire il funzionamento anche a temperature relativamente elevate nelle fermentazioni industriali (Banat *et al.*, 1998).

Sono stati segnalati mutanti di *Saccharomyces cerevisiae* in grado di crescere a un massimo di 33 - 35°C come lieviti termotolleranti (Banat *et al.*, 1998). Altri lieviti termotolleranti appartenenti al genere *Kluyveromyces* stati segnalati produrre etanolo su supporti di lattosio da 30°C-37°C (Grba *et al.*, 2002; Rech *et al.*, 1999) fino a 40°C - 42°C (Banat *et al.*, 1992; Fonseca *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010) e da 40°C a 47°C su glucosio (Anderson *et al.*, 1986; Banat *et al.*, 1998; Hack e Marchant 1998; Guimarães *et al.*, 2010) fino ad una temperatura massima di crescita di 49°C (Banat *et al.*, 1998; Banat *et al.*, 1992) o ancora essere in grado di crescere in aerobiosi anche a 52°C sul lattosio (Banat *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2010).

Il genere *Kluyveromyces* è risultato essere più termotollerante di ceppi di *Saccharomyces* e *Candida* (Banat *et al.*, 1992; Fonseca *et al.*, 2008).

La maggior parte dei processi di fermentazione avviene a temperature mesofile (25-37°C), ma i processi termofili (45-55°C) sembrano essere più produttivi e sempre più studiati (Antoni *et al.*, 2007). La scelta della temperatura ottimale di fermentazione è molto importante in quanto temperature troppo elevate possono condurre a una maggiore sensibilità dei microrganismi alla tossicità dei solventi prodotti (etanolo) e quindi a una minore produzione di etanolo (Antoni *et al.*, 2007; Banat *et al.*, 1992).

Tolleranza alla temperatura

Le alte temperature causano una fluidità maggiore nelle membrane e i lieviti rispondono a questo cambiamento fisico adattando la composizione degli acidi grassi e steroli (Ohta *et al.*, 1988). L'aumento della temperatura porta ad un aumento nella membrana dei lieviti di acidi grassi

esterificati come acidi palmitico e palmitoleico a spese delle catene di acidi insaturi quali acido oleico, linoleico e acido linolenico (Banat *et al.*, 1998). Questo è solitamente associato ad una diminuzione della quantità di fosfolipidi di membrana per mantenere una fluidità ottimale per le attività cellulari che sono eventualmente parte di una risposta adattativa (Lloyd *et al.*, 1993; Banat *et al.*, 1998).

Oltre alle modifiche della membrana, l'aumento della temperatura di crescita di solito porta alla sintesi di proteine da shock termico (HSP), che giocano un ruolo importante nel conferire tolleranza termica ed etanolo in vari microrganismi (Banat *et al.*, 1998).

Tolleranza all'etanolo

La tolleranza nei confronti dell'etanolo è un carattere legato al tipo di cellula. L'etanolo diffonde liberamente attraverso le membrane cellulari e quindi la sua concentrazione aumenta costantemente sia all'esterno che all'interno di essa. Il danno maggiore risulta a carico della membrana cellulare, poiché vengono alterate le complesse interazioni dei sistemi lipidici e lipoproteici, rendendo la membrana più permeabile, con la conseguente fuoriuscita di materiale intracellulare e infine la morte (Donadio e Marino, 2008).

I fosfolipidi della membrana plasmatica giocano un ruolo importante nel meccanismo di tolleranza della cellula (Banat *et al.*, 1998, Donadio e Marino, 2008); l'etanolo sembra alterare il grado di polarità della membrana cellulare e del citoplasma, causando ad alta concentrazione l'interruzione della crescita (Lynd *et al.*, 1991). Questa interruzione può essere dovuta all'aumentata fluidità di membrana (Lloyd *et al.*, 1993). Altri fattori fisiologici come la composizione media e la modalità di alimentazione del substrato, l'accumulo di etanolo intracellulare, la temperatura e la pressione osmotica possono contribuire alla tolleranza all'etanolo (Banat *et al.*, 1998).

Bajpai e Margaritis (1982) hanno studiato la cinetica d'inibizione da etanolo in un ceppo di *K. marxianus* e hanno concluso che un'alta concentrazione di etanolo iniziale inibisce il tasso di crescita specifica massima (μ_{max}), ma senza effetto sulla concentrazione di etanolo finale, sulla produzione di cellule e sull'utilizzo dello zucchero. Hanno anche affermato che il livello di tolleranza di etanolo in questo ceppo è simile a quello riportato per *S. cerevisiae*, in contrasto con quanto riportato da Hack e Marchant (1998), Banat *et al.*, (1998) e Fonseca *et al.*, (2008) che sostenevano che la tolleranza all'etanolo di ceppi di *K. marxianus* è bassa rispetto a *S. cerevisiae*, e questa è stata correlata con l'attività di ATPasi della membrana plasmatica (Fonseca *et al.*, 2008).

L'entità di tali effetti sembra essere ceppo-dipendente, anche se le condizioni di fermentazione, in particolare la disponibilità di ossigeno e di altri nutrienti, possono giocare un ruolo chiave in questo senso (Guimarães *et al.*, 2010).

Diversi ceppi di lievito sono stati testati per la tolleranza all'etanolo in coltura continua e pare che concentrazioni comprese tra 6,3 e 9,4% (w/v) ne provochino l'inibizione totale (Lynd *et al.*, 1991).

pH

Il pH ideale per la crescita del lievito è di circa 5,0-6,0 (Rech *et al.*, 1999) e visto che molti processi industriali utilizzano una fase di lavaggio acido per ridurre la contaminazione batterica, il ceppo deve rimanere vitale a pH basso (Hack e Marchant 1998). Dai dati di crescita di *Kluyveromyces marxianus* ceppo CBS 712 pare che un pH di 5,5 dia come risultato un tasso maggiore di crescita iniziale (Rech *et al.*, 1999), mentre Amrane e Prigent (1998) hanno riscontrato che *K. marxianus* cresce su siero di latte con un range di pH. 2,3-5. In genere i migliori tassi di produzione di etanolo sono stati osservati tra pH 4 e 6 (Bajpai e Margaritis, 1986).

1.3.5 Le tecniche di processo per produrre etanolo

Diverse tecniche di processo sono state utilizzate per la produzione di etanolo con *K. marxianus*:

- colture batch (sistema chiuso, all'inizio della coltura vengono forniti tutti i nutrienti necessari alla crescita cellulare senza aggiunte successive);
- colture fed-batch (sistema semi-aperto, viene fornito substrato fresco con aggiunte graduali e si toglie lo stesso volume di substrato a intervalli di tempo prefissati);
- sistema in continuo (sistema aperto, in cui nuovo terreno di coltura è immesso costantemente, mentre quello che si è esaurito è eliminato);
- colture in bioreattori a membrana con riciclo,
- colture in due fasi di fermentazione,
- colture immobilizzazione con β -galattosidasi,
- colture con cellule immobilizzate in alginato di calcio, o immobilizzate in Kissiris (vetro minerale derivato dalla lava) (Banat *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2010; O'Shea e Walsh 2000; Fonseca *et al.*, 2008).

La maggior parte degli studi sulla fermentazione del lattosio da siero di latte con *Kluyveromyces marxianus*. sono stati realizzati in un reattore batch (Castrillo *et al.*, 1996; Banat *et al.*, 1998; Grba *et al.*, 2002; Zafar *et al.*, 2005; Zafar e Owais 2005; Kargi e Ozmihci 2006; Ozmihci e Kargi, 2007a) e hanno prodotto con successo apprezzabili concentrazioni di etanolo variabile fra 4 e 8% (w/v) (Banat *et al.*, 1998).

La coltivazione in condizioni batch ha, tuttavia, alcune limitazioni. Rendimenti in etanolo superiori di solito richiedono un'alta concentrazione iniziale di zuccheri e questo crea una pressione osmotica, che, combinato con elevata temperatura d'incubazione, può inibire la crescita (Banat *et al.*, 1998). L'accumulo di etanolo nel recipiente di fermentazione può anche inibire la crescita e la tolleranza della temperatura (Banat 1998).

Alcuni autori hanno anche riportato l'uso di sistemi fed-batch di fermentazione (Grba *et al.*, 2002; Ozmihci e Kargi, 2007b; Guimarães *et al.*, 2010). L'attuazione di sistemi fed-batch può aiutare ad

eludere i problemi d'inibizione da substrato sia di lattosio che per i sali (Ozmihci e Kargi, 2007b; Guimarães *et al.*, 2010), infatti, come già riportato da Banat *et al.* (1998) per superare il problema della concentrazione iniziale di zucchero si può aggiungere il substrato gradualmente dopo un determinato periodo di tempo di avvio della cultura. Questo si è rivelato particolarmente utile quando si utilizzano concentrazioni elevate di zucchero e in questo modo non sembra ridurre gli effetti inibitori di accumulo etanolo sulla cultura.

È stato ampiamente dimostrato che l'immobilizzazione di cellule microbiche in sistemi di alginato fornisce il mezzo ideale per mantenere il biocatalizzatore (Singh *et al.*, 1998; Banat *et al.*, 1998). Infatti, l'immobilizzazione facilita la progettazione di processi continui o semi-continui con i ceppi termotolleranti di *K. marxianus* (Singh *et al.*, 1998).

Banat *et al.*, (1998) ha riportato che *K. marxianus* immobilizzato è più tollerante a osmolaliti elevati e che la produttività delle cellule immobilizzate è stata meno inibita da elevata osmolalità rispetto alla produttività delle cellule libere. Inoltre altri vantaggi dell'immobilizzazione possono essere la maggiore stabilità lievito e il design semplice bioreattore (Banat *et al.*, 1998).

In studi più recenti è stato dimostrato che quando l'organismo è stato immobilizzato in alginato di calcio e coltivato su terreni contenenti glucosio e saccarosio per brevi periodi di tempo, le concentrazioni di etanolo prodotto in entrambi i sistemi, liberi e immobilizzati, erano relativamente simili. Tuttavia, quando le cellule immobilizzate e quelle libere sono state coltivate in batch, la produzione di etanolo è aumentata nel sistema immobilizzato su periodi di tempo prolungati (Singh *et al.*, 1998).

I risultati ottenuti dimostrano che l'immobilizzazione di questo organismo contribuisce in modo significativo sia ad un aumento del livello di produzione di etanolo che ad un aumento del tasso di produzione, e confermano che questo lievito, nello stato immobilizzato, può rappresentare un candidato importante per la produzione commerciale di etanolo a temperature elevate (Singh *et al.*, 1998).

1.4 Il bioetanolo

1.4.1 I biocombustibili e l'etanolo

Il termine biocombustibili descrive “l'insieme di quelle biomasse o prodotti derivanti dalle biomasse che presentano caratteristiche fisico-chimiche tali da renderli utilizzabili in processi di combustione od altra trasformazione termochimica. I biocombustibili, in funzione del loro stato, possono essere classificati in: solidi (legno, paglie, pellets, ecc.), liquidi (oli vegetali, alcoli, eteri, esteri, ecc.), gassosi (biogas da digestione anaerobica ecc.)” (Gazzetta ufficiale, 2000). Inoltre, la produzione di energia da biomasse può essere diretta (ad esempio per combustione delle stesse) oppure può richiedere come passaggio intermedio la trasformazione delle biomasse in altri biocombustibili (bioetanolo, biodiesel, bioidrogeno, biogas) (Capodicasa, 2008).

La Figura 6 mostra un *excursus* dei diversi percorsi che partono dalle energie primarie e arrivano ai carburanti finali, sottolineando il potenziale della biomassa. In generale, il carburante può essere prodotto da varie materie prime, prevede diverse fasi di produzione e utilizza prodotti intermedi. In particolare, i FAME (*fatty acid methyl ester*), i FAEE (*fatty acid ethyl ester*) e l'etanolo possono essere prodotti direttamente dalla biomassa vegetale nei primi due casi, e principalmente da zucchero, amido o, dopo il pre-trattamento, dalla cellulosa per l'etanolo (Commissione europea, 2006).

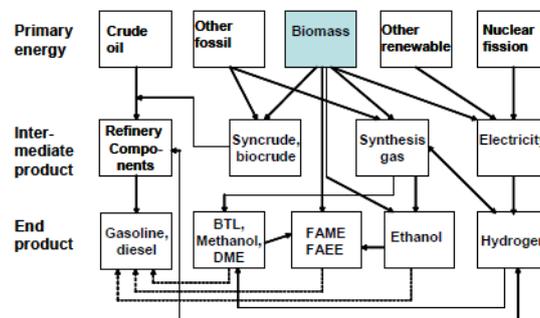


Figura 6. Catene di processo per la produzione di combustibili (Commissione europea, 2006).

La storia dell'etanolo

È noto da molto tempo che l'etanolo è forse il più antico prodotto ottenuto con la biotecnologia tradizionale (Zaldivar *et al.*, 2001), infatti, sin dall'antichità, in diverse are geografiche, sono state allestite produzioni di bevande alcoliche (Manzoni, 2006).

Per quanto riguarda l'etanolo industriale non è possibile fissare una data in cui la produzione ebbe inizio, questa fu, infatti, il risultato di uno sviluppo graduale di processi artigianali durato almeno un secolo. Già nei primi decenni dell'Ottocento in Francia era prodotto alcol ad uso industriale per fermentazione delle melasse di canna da zucchero. Non si ebbero miglioramenti significativi del processo sino alla seconda metà del secolo, quando fu introdotta la pastorizzazione e l'uso di

ceppi di lievito selezionati (Donadio e Marino, 2008).

Lo sviluppo di nuove risorse energetiche è stata una forza trainante della rivoluzione tecnologica. Già nei primi momenti del XIX secolo, gli alcoli sono stati ripetutamente segnalati come biocarburanti, anche l'invenzione dei motori ad accensione è stata fatta con i biocarburanti. Nikolaus August Otto aveva sviluppato il suo prototipo di motore a scoppio nel 1860 ad etanolo ed era stato sponsorizzato dalla fabbrica di zucchero di Eugen Langen, che era interessato alla produzione di massa di etanolo. Sicurezza e pulizia sono stati fattori che hanno contribuito a questo successo (Antoni *et al.*, 2007). Infatti, la produzione industriale vera e propria fiorì nei primi decenni del novecento, favorita da due importanti innovazioni: la sintesi dell'ammoniaca dall'azoto atmosferico, processo che permise di crescere il lievito su terreni di coltura molto economici, e lo sviluppo della distillazione continua, che consentì di ottenere alcol ad alta gradazione con ottime rese (Donadio e Marino, 2008).

Auto alimentate ad etanolo erano già state previste da Henry Ford negli anni '80 dell'Ottocento, quando progettò un modello che utilizzava etanolo a base di mais (Zaldivar *et al.*, 2001). Inoltre la sua casa automobilistica commercializzò un altro modello (il "Tin Lizzy") che si muoveva al 100% con etanolo (Antoni *et al.*, 2007). Lo stesso Henry Ford promosse l'utilizzo dell'etanolo, tanto che nel 1938 gli impianti del Kansas producevano già 18 milioni di galloni•anno⁻¹ di etanolo (circa 54.000 t•anno⁻¹) (Delbianco e Sposini, 2001).

L'etanolo è stato presto riconosciuto come un additivo antidetonante per motori a combustione interna e quindi aggiunto alla benzina già negli anni tra il 1925 e il 1945 (Antoni *et al.*, 2007).

Nonostante ciò, l'interesse americano per l'etanolo scemò dopo la seconda guerra mondiale, la benzina cominciò a dominare il mercato dei trasporti in conseguenza all'enorme disponibilità di olio e gas e a causa dell'imbattibile prezzo basso della benzina (Antoni *et al.*, 2007; Delbianco e Sposini, 2001).

I prezzi bassi persistettero per diversi decenni fino all'avvento della "crisi petrolifera", negli anni '70 (Zaldivar *et al.*, 2001) quando il prezzo del petrolio improvvisamente aumentò nel 1973 (Foda *et al.*, 2010). Questa crisi ha sottolineato l'importanza di fonti di energia alternative, tra cui l'etanolo, e ritornarono gli interessi della ricerca sulla conversione di prodotti dell'agricoltura in carburanti e prodotti chimici (Foda *et al.*, 2010). Come risposta alla crisi si svilupparono industrie di etanolo in molti paesi (Hack e Marchant, 1998) e si diede vita a iniziative come il Programma Nazionale Alcol in Brasile e alla fine del decennio, diverse compagnie petrolifere misero in commercio benzina contenente il 10% di etanolo, il cosiddetto *gasohol* (Zaldivar *et al.*, 2001; Delbianco e Sposini, 2001; Antoni *et al.*, 2007).

Durante gli ultimi decenni, tuttavia, l'eccessivo consumo di combustibili fossili, in particolare nelle grandi aree urbane, ha contribuito a generare elevati livelli d'inquinamento, come passo per risolvere questo problema negli ultimi anni, l'aggiunta di etanolo alla benzina, che riduce le

emissioni di carbonio, degli idrocarburi incombusti e del monossido, è stata ampiamente applicata (Zaldivar *et al.*, 2001).

Le proprietà e le applicazioni dell'etanolo

Il bioetanolo o etanolo o alcool etilico è un alcool caratterizzato da un elevato contenuto energetico (Tabella 1). L'etanolo appartiene al gruppo organico degli alcoli, molecole caratterizzate da un gruppo funzionale ossidrilico –OH, e presenta la formula C_2H_6O o CH_3CH_2OH (Figura 7) (Hart, 1983).

Si presenta come un liquido (a 1013 mbar a 20°C) incolore, altamente infiammabile, con odore e sapore caratteristici; i vapori formano miscele esplosive con l'aria, è miscibile con acqua ed è altamente volatile (IFA-GESTIS, 2012). Ha un punto di fusione di -114 °C e un punto di ebollizione pari a 78°C, risulta meno denso dell'acqua e il suo valore di pH risulta essere 7,0 a 20°C con una concentrazione di $10\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (IFA-GESTIS, 2012).

Tabella 1. Proprietà chimiche e fisiche dell'etanolo.

Proprietà	Bioetanolo
Peso molecolare [$\text{kg}\cdot\text{kmol}^{-1}$]	46,07
Densità [$\text{kg}\cdot\text{l}^{-1}$] a 15°C	0,80 - 0,82
Contenuto di ossigeno [% in peso]	34,8
Solubilità in acqua [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	100
Potere calorifico inferiore [$\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$] a 15°C	26,4
Potere calorifico inferiore [$\text{MJ}\cdot\text{l}^{-1}$] a 15°C	21,2
Calore di evaporazione [$\text{kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$]	225
Numero di ottani (RON)	109
Numero di ottano (MON)	92
Numero di cetano	11
Stechiometrico aria / carburante [$\text{kg aria}\cdot\text{kg combustibile}^{-1}$]	9,0
Conducibilità [$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$] a 25°C	$1,35\cdot 10^{-7}$
Tensione di vapore Reid [kPa] a 15°C	16,5

Elaborazione dati (EUBIA, 2007; IFA-GESTIS, 2012)

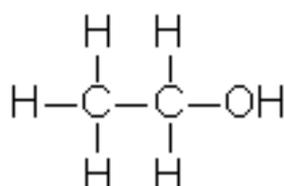


Figura 7. Formula chimica dell'etanolo.

L'etanolo, con il suo alto rapporto (C+H)/O, mantiene la maggior parte del contenuto energetico originale in combustione (Antoni *et al.*, 2007).

L'etanolo non deve essere rettificato (ovvero sottoporre l'alcol ad una nuova distillazione) per ottenere un'alta purezza se deve essere utilizzato come combustibile. L'azeotropo (= bollire immutato) è di 95,57%wt di etanolo con 4,43% in peso d'acqua, può essere utilizzato per l'accensione delle auto. Questo è noto in Brasile come AEHC (*álcool etílico hidratado combustível*). Tuttavia, il contenuto d'acqua superiore provoca problemi nelle miscele etanolo-benzina perché porta a una separazione di fase tra l'acqua e la benzina (Antoni *et al.*, 2007).

Il numero di ottano dell'etanolo è superiore a quello della benzina, di conseguenza etanolo ha caratteristiche antidetonanti migliori. Questa migliore qualità del carburante può essere sfruttata se il rapporto di compressione del motore viene regolata di conseguenza, ciò aumenta l'efficienza del carburante. L'ossigeno contenuto nell'etanolo comporta anche una maggiore efficienza, che si traduce in un processo di combustione più pulita a temperature relativamente basse (EUBIA, 2007).

La pressione di vapore Reid, una misura per la volatilità del carburante, è molto bassa per l'etanolo, questo indica una lenta evaporazione, basse emissioni nell'aria e una riduzione del rischio esplosioni. Tuttavia, la bassa pressione di vapore, insieme al suo punto di ebollizione, sono svantaggiosi per quanto riguarda l'avviamento del motore a bassa temperatura ambiente. Senza aiuti, i motori che utilizzano l'etanolo non possono essere avviati a temperature inferiori a 20°C. La difficoltà di avviamento a freddo è il problema più importante per quanto riguarda l'applicazione di alcoli come combustibili per autotrazione (EUBIA, 2007).

L'etanolo può essere utilizzato sia come carburante per il trasporto sostituendo la benzina, sia come combustibile per la produzione di energia dalla combustione termica, ma anche utilizzato per le celle a combustibile per reazione termochimica e in impianti di cogenerazione (EUBIA, 2007).

L'etanolo è utilizzato in motori a *spark-ignition* (accensione comandata) grazie al suo alto numero di ottano, anche se è generalmente poco pratico usarlo in questi motori a causa del problema dell'avvio a freddo. Inoltre a causa della sua scarsa capacità di accensione (basso numero di cetano), è meno adatto per motori diesel (EUBIA, 2007). La cosa migliore è la miscelazione di etanolo con una piccola parte di un combustibile come la benzina. Le miscele più note sono (in volume):

- E5G a E26G (etanolo 5-26%, 95-74% benzina),
- E85G (85% etanolo, 15% benzina),
- E15D (15% etanolo, 85% benzina)
- E95D (etanolo al 95%, 5% di acqua, con accensione miglioratore) (EUBIA, 2007).

Il bioetanolo è stato ampiamente testato in veicoli *flex-fuel* (FFV *flexible fuel vehicles*) come E85G (Commissione europea, 2006; EUBIA, 2007; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Infatti, diverse case automobilistiche stanno offrendo modelli FFV (Ford, Saab, Volvo, Chevrolet, Opel e GM) (Antoni *et al.*, 2007).

L'introduzione della miscela E85 in Europa è iniziata in Svezia intorno al 2000. Negli anni

successivi le infrastrutture legate all'E85 si sono estese anche ad altri paesi dell'UE come la Germania, la Francia e l'Irlanda. La Figura 8 mostra la densità d'infrastrutture E85 in Europa ad aprile 2007 (EUBIA, 2007).

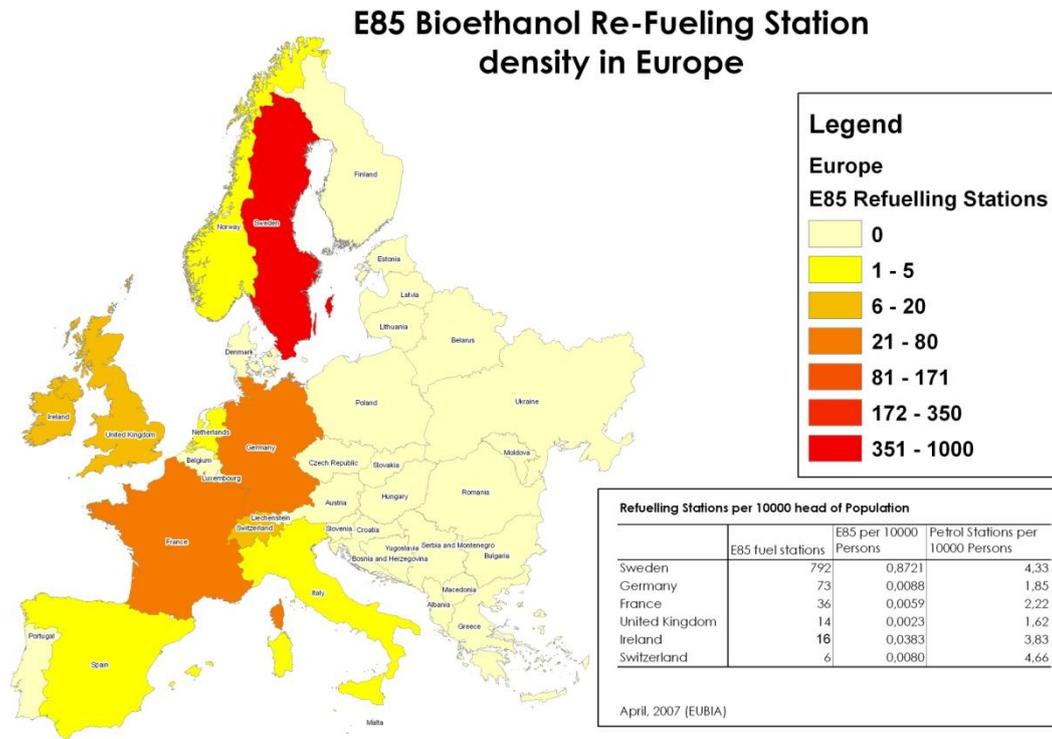


Figura 8. Mappa della distribuzione delle stazioni di rifornimento di bioetanolo in Europa (EUBIA, 2007).

L'uso più frequente di etanolo in Europa attualmente è, tuttavia, tramite conversione in derivati come EtilTerButilEtere (ETBE) (esterificazione di etanolo e isobutene, un sottoprodotto dei processi di raffineria) un derivato alto-ottanico, anche se possono avere alcuni svantaggi, come la contaminazione potenziale di acque sotterranee. Il suo uso può anche essere limitato dalla disponibilità di isobutene l'intermedio petrolchimico (Delbianco e Sposini, 2001; Commissione europea, 2006; Soetaert e Vandamme, 2006). L'ETBE è utilizzato anche in miscele al 10-15% con benzina per migliorare il suo numero di ottani e ridurre le emissioni. Miscele di benzina con 22% di etanolo (E22G) possono essere utilizzate in motori a scoppio senza alcun problema operativo (EUBIA, 2007). Infatti, aggiungendo etanolo o bio-ETBE aumenta il contenuto di ossigeno nel carburante, portando ad una migliore combustione (Soetaert e Vandamme, 2006).

Il bioetanolo soddisfa perciò diversi criteri richiesti per i moderni combustibili:

- a pressione e temperatura ambiente è in stato liquido,
- risulta essere adatto ad essere stoccato, distribuito, trasportato e utilizzato in condizioni di sicurezza,

- presenta alta efficienza energetica nei motori a combustione,
- può essere applicato come carburante in mezzi di trasporto, anche senza apportare modifiche significative ai motori e alle infrastrutture di distribuzione (Antoni *et al.*, 2007).

L'etanolo ha anche molte altre applicazioni in farmaceutica e nel settore alimentare sotto forma di materie prime (Zafar *et al.*, 2005; Zafar e Owais, 2005), nell'industria chimica come solvente e soprattutto come precursore di tre altri importanti composti chimici; etilene, acetaldeide e acido acetico (Donadio e Marino, 2008).

Oltre a ciò Donadio afferma che “l'incombente crisi energetica ha fatto focalizzare l'interesse del mondo della ricerca verso l'ottimizzazione della produzione di etanolo da zuccheri fermentabili, introducendo il neologismo di BIOETANOLO”. Infatti, è emerso che l'etanolo è una delle più valide opzioni nell'arena delle fonti di energia non convenzionali (Zafar *et al.*, 2005). La produzione di sostanze chimiche e combustibili da materiale vegetale di produzione locale supporta l'indipendenza politica dai paesi produttori di petrolio attraverso la diversificazione e una minore dipendenza da poche fonti energetiche essenziali, una produzione di energia CO₂ neutrale e un surplus di prodotto nazionale lordo e potere economico tenuti all'interno del paese. Questo è fondamentale per tutte quelle aree agricole svantaggiate (Antoni *et al.*, 2007).

1.4.2 Le materie prime e i processi produttivi per la produzione di etanolo

La maggior parte, circa il 70-80%, dell'etanolo prodotto a livello mondiale è ottenuto per fermentazione (Manzoni, 2006; Zafar *et al.*, 2005; Zafar e Owais, 2005) il restante 30% per via chimica a partire da etilene e solo in piccola parte viene ottenuto da gas naturale e carbone (Capodicasa, 2008; Manzoni, 2006).

Ai fini della produzione di etanolo mediante un processo di fermentazione portata avanti da microrganismi le fonti di energia per alimentarli sono molto importanti, in particolar modo le fonti di carbonio di maggiore importanza sono quelle costituite da polimeri del glucosio: amido e cellulosa (Antoni *et al.*, 2007; Soetaert e Vandamme, 2006; Donadio e Marino, 2008).

La fermentazione del lievito convenzionale produce 0,51 kg di etanolo da 1 kg di qualsiasi zucchero C₆ come glucosio, mannosio e saccarosio. Tuttavia, non tutte le materie prime contengono zuccheri semplici. Amido e lignocellulosa sono polimeri, e l'idrolisi è necessaria per rompere i legami tra monomeri e produrre zuccheri semplici C₆ per la fermentazione (Figura 9) (EUBIA, 2007).

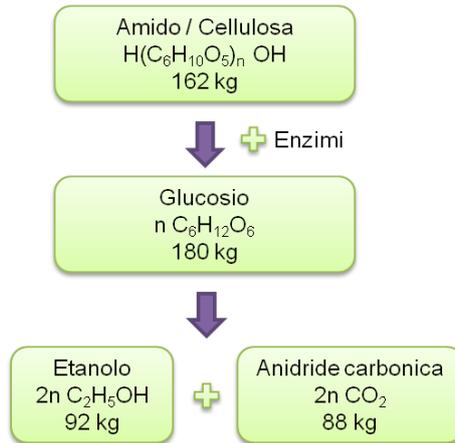


Figura 9. Idrolisi di amido e cellulosa seguita da fermentazione di glucosio in etanolo (EUBIA, 2007).

La fermentazione può riguardare diversi prodotti agricoli ricchi di carboidrati e zuccheri quali i cereali (mais, sorgo, frumento, orzo, riso, segale), le colture zuccherine (barbabetola e canna da zucchero), frutta, patate o substrati più difficili come i rifiuti organici, dall'agro-industria (melassi, siero, vinacce) o rifiuti domestici come residui vegetali, o i rifiuti del giardino o ancora materiali cellulosici come la paglia, la baggasa, o la carta straccia, inoltre si possono includere brevi colture energetiche di rotazione (ad esempio salice, pioppo, miscanto ed eucalipto), residui forestali o boschi (Delbianco e Sposini 2001; Zafar *et al.*, 2005, Soetaert e Vandamme, 2006; Kargi e Ozmihci, 2006; EUBIA, 2007; Donadio e Marino 2008).

A questo proposito ci si riferisce a bioetanolo di prima generazione, quando gli zuccheri fermentabili sono derivati da saccarosio o amido e a bioetanolo di *seconda generazione*, quando ci si propone di ottenere questo importante e strategico prodotto da materiali cellulosici (Figura 10) (Donadio e Marino, 2008).



Figura 10. Materie prime per la produzione di bioetanolo di prima e seconda generazione(EUBIA, 2007).

Il processo fermentativo può essere allestito impiegando diversi substrati, quali esosi (glucosio e fruttosio) e disaccaridi (maltosio, saccarosio) (Manzoni, 2006).

L'attività fermentativa di un lievito è influenzata, oltre che da una buona aerazione, anche dalla fonte di carbonio disponibile. La fermentazione è massima, quando sono disponibili monosaccaridi e disaccaridi. Tra i primi i più importanti sono senz'altro glucosio e fruttosio, metabolizzati in genere con velocità simile; il galattosio non è utilizzato da tutti i lieviti. I disaccaridi (saccarosio, lattosio e maltosio) sono disponibili per la fermentazione solo se le cellule di lieviti possiedono nel proprio corredo metabolico gli enzimi idrolitici necessari per scindere i disaccaridi nei due monosaccaridi costitutivi (Gigliotti e Verga, 2007).

Considerando che tutti i materiali vegetali (grano, steli e foglie) sono composti principalmente da zuccheri, quasi tutte le piante possono servire come materia prima per la produzione di etanolo. La scelta della materia prima dipende da quale cresce meglio nelle condizioni climatiche, di paesaggio e di suolo, nonché il tenore di zucchero e facilità di lavorazione dei vari impianti disponibili. Il risultato è una vasta gamma di materie prime per produrre etanolo, e quindi di processi di produzione (EUBIA, 2007).

Zuccheri semplici

Zuccheri semplici in particolare saccarosio, sono i substrati tradizionalmente impiegati per produrre bioetanolo (Biavati e Sorlini, 2008) che richiedono un processo minimo (Foda *et al.*, 2010), ma con la necessità di collocare gli impianti di processo vicino alla fonte del substrato fermentabile per compensare i costi di trasporto (Anderson *et al.*, 1986). Nei processi su larga scala, il substrato fermentabile è fornito in molti casi, in forma grezza, come di residui di processi agro-industriali (Biavati e Sorlini, 2008). In particolare trova largo impiego il melasso di barbabietola (utilizzato in USA e in Europa) o di canna da zucchero (utilizzato in Brasile) (Donadio e Marino, 2008; Biavati e Sorlini, 2008); il cui contenuto totale di zuccheri residui può ammontare al 50-60% (w / v), di cui il 60% è saccarosio (Gough *et al.*, 1996). I melassi sono le acque madri di cristallizzazione del saccarosio ottenuto da barbabietola o da canna da zucchero e contengono soprattutto saccarosio e, in misura minore, glucosio, fruttosio e raffinose, in funzione della coltura vegetale (Biavati e Sorlini, 2008) e costituiscono una fonte di carbonio a costo contenuto (Donadio e Marino, 2008), tuttavia i processi di lavorazione danno luogo a composti sia promotori della crescita che a composti che possono risultare inibitori del processo fermentativo come ad esempio idrossimetilfurfurale e alcoli (etanolo, eptanolo) (Donadio e Marino 2008; Gough *et al.*, 1996).

Amido

L'amido è composto da due omopolisaccaridi (amilosio e amilopectina) aventi come unità monomerica α -D-glucosio. È necessario che l'amido venga idrolizzato a glucosio perché possa essere trasformato in etanolo, infatti, *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* non possiedono gli enzimi necessari in grado di degradare l'amido (Biavati e Sorlini, 2008; Donadio e Marino, 2008).

L'amido presente nei cereali e nelle patate subisce normalmente un pretrattamento fisico per

rendere i polimeri passibili di un trattamento chimico o enzimatico che provoca l'idrolisi fino a zuccheri fermentabili.

Il primo passo in questo processo di conversione comprende la fresatura della matrice in modo che rilasci l'amido, una fase di liquefazione (per rendere l'amido solubile) ed una fase d'idrolisi (per produrre glucosio) (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; EUBIA, 2007). Durante la fermentazione, l'etanolo che viene prodotto, si scioglie in acqua e si forma CO₂. Attraverso una serie di passaggi di distillazione e disidratazione, la concentrazione di etanolo può essere aumentata (EUBIA, 2007).

In funzione della disponibilità, legata all'area geografica, può essere utilizzato amido ottenuto da colture diverse quali mais, avena, frumento, patata, orzo, manioca, tapioca (Biavati e Sorlini, 2008; Quaglierini *et al.*, 1995). Negli USA è ormai ampiamente utilizzato, anche grazie a forti sostegni governativi, l'amido di mais (Donadio e Marino, 2008) mentre in Francia viene utilizzato il frumento e in Cina la patata dolce (Biavati e Sorlini, 2008).

Sono necessarie circa 3 tonnellate di cereali per la produzione di 1 tonnellata di etanolo. Le colture di barbabietole da zucchero sono cresciute nella maggior parte dei paesi dell'UE-25, e sostanzialmente producono più etanolo per ettaro rispetto al grano come si può vedere nella Tabella 2 (EUBIA, 2007).

Tabella 2. Produzione di bioetanolo nei maggiori produttori dell'UE-25 e dell'Italia in litri per ettaro e tonnellate equivalenti di petrolio (TEP) per ettaro per grano comune e barbabietola da zuccheri (EUBIA, 2007).

	Grano comune		Barbabietola da zucchero	
	l•ha ¹	TEP•ha ¹	l•ha ¹	TEP•ha ¹
Austria	1792	0,92	6677	3,42
Belgio	2847	1,46	6970	3,57
Francia	2554	1,31	7980	4,09
Irlanda	2996	1,53	4710	2,41
Italia	1637	0,84	4346	2,23
Olanda	2839	1,45	6472	3,31

Materiali lignocellulosici

Le fonti di carbonio più interessanti sia da un punto di vista economico che strategico, sono costituite dai materiali lignocellulosici (Donadio e Marino, 2008). Infatti, sia in Europa che nel mondo si sta ponendo sempre di più l'attenzione a questi materiali: lignina e materie prime ricche in cellulosa come alberi, o foreste gestite in maniera sostenibile, colture energetiche a rapida crescita come il miscanto, residui di colture agricole e forestali (EUBIA, 2007; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006) (es. paglia, paglia del mais), residui dell'industria del legno, e pasta di legno o di carta (Commissione europea, 2006).

La biomassa lignocellulosica contiene cellulosa (40-60% del peso secco) ed emicellulosa (20-40%

del peso secco) che possono essere convertiti in zuccheri. La frazione rimanente, la lignina (10-25% del peso secco) polimero aromatico complesso, non può essere fermentato perché è resistente alla degradazione biologica (EUBIA, 2007; Capodicasa, 2008). Gli studi si concentrano dunque sui pre-trattamenti per l'ottenimento di molecole fermentescibili e sull'ingegnerizzazione di ceppi in grado di utilizzare un ampio spettro di substrati, comprendente anche, ad esempio, i pentosi come xilosio e arabinosio (Zaldivar *et al.*, 2001; Soetaert e Vandamme, 2006) che costituiscono tra il 5 e il 20% (o più) delle biomasse lignocellulosiche, ma anche esosi (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Antoni *et al.*, 2007).

La complessità di questi "biocarburanti di seconda generazione" è maggiore rispetto a quelle delle materie prime tradizionali. I processi produttivi sono al momento più costosi a causa della trasformazione aggiunta e degli enzimi più costosi coinvolti nella produzione (EUBIA, 2007).

I primi passi nella conversione della biomassa in etanolo sono la macinazione e il pretrattamento (Figura 11).

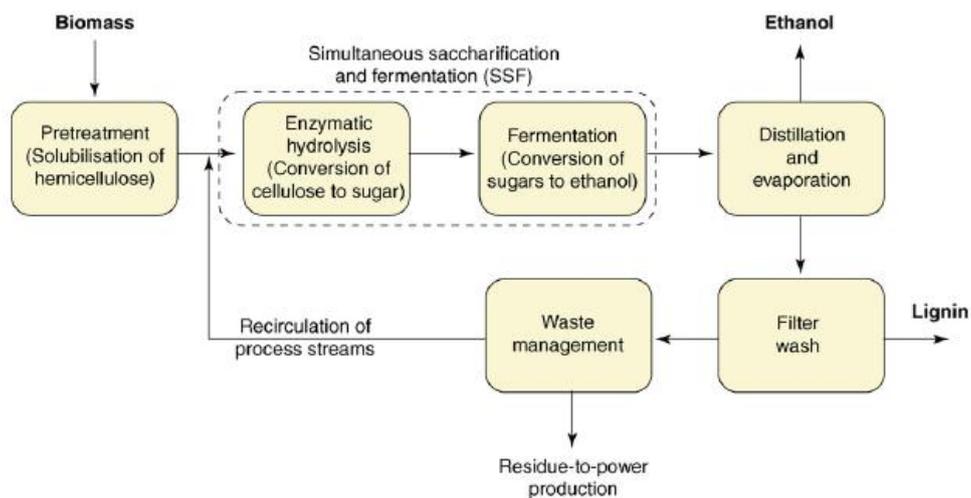


Figura 11. Diagramma di flusso della conversione della biomassa in etanolo (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

L'emicellulosa e la cellulosa sono idrolizzati con enzimi o acidi per rilasciare zuccheri monomerici. Il pretrattamento mira ad aumentare la dimensione dei pori e a ridurre la cristallinità della cellulosa, ed è necessario per esporre le fibre di cellulosa agli enzimi o almeno renderla più accessibile. Un pre-trattamento efficace può sostanzialmente ridurre i requisiti di qualità degli enzimi, che costituiscono una gran parte dei costi di produzione (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Non c'è però un metodo generale valido per tutte le matrici, poiché diversi tipi di materie prime richiedono diversi pretrattamenti (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Gli zuccheri liberati dal pretrattamento e dalla fase d'idrolisi enzimatica sono fermentati da batteri, lieviti o funghi filamentosi, l'idrolisi enzimatica e la fermentazione possono anche essere eseguite in una fase combinata: una simultanea saccarificazione e fermentazione (SSF).

Dopo la fermentazione, l'alcol è generalmente ottenuto per semplice distillazione dal liquido di fermentazione, risultando un prodotto molto puro. Per la disidratazione dell'etanolo sono disponibili varie tecnologie, come l'uso di setacci molecolari e di separazione della membrana (Soetaert e Vandamme, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; EUBIA, 2007). Mentre la lignina, parte principale della biomassa solida residua, può essere utilizzata per la produzione di energia elettrica e calore (EUBIA, 2007; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

I vantaggi della produzione di etanolo a partire dalla biomassa lignocellulosica sono diversi. La biomassa lignocellulosica è più abbondante e meno costosa delle colture alimentari, soprattutto quando si tratta di rifiuti con bassissimo valore economico o addirittura negativo. Inoltre, ha un saldo netto di energia superiore, che la rende più attraente da un punto di vista ambientale. Tuttavia, questi tipi di biomassa sono più difficili da convertire in zuccheri causa della loro struttura molecolare relativamente inaccessibile (EUBIA, 2007). Sono necessarie da 2 a 4 tonnellate di peso secco di materiale legnoso o erboso per la produzione di 1 tonnellata di etanolo. Con un contenuto di zuccheri totali del 60-70% (40% di glucosio come la cellulosa e il 25% xilosio come emicellulosa), la paglia di grano è in grado di produrre circa 230 kg di etanolo per tonnellata di materiale secco (EUBIA, 2007).

Il passaggio alla produzione di etanolo da materiali lignocellulosici richiede ricerca e sviluppo nei settori (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Antoni *et al.*, 2007; Commissione europea, 2006):

- l'utilizzo efficiente di cellulosa ed emicellulosa (pianta intera) come substrato;
- migliorare l'idrolisi enzimatica con enzimi efficienti e ridurre i costi di produzione di enzimi;
- lo sviluppo di nuovi ceppi per la fermentazione, ad esempio ceppi con temperatura di fermentazione superiore o con tolleranza ad un'alta concentrazione di etanolo, o più tolleranti nei confronti degli inibitori;
- impianti adatti ad ogni area climatica;
- riduzione del numero di fasi di processo e della domanda di energia;
- riutilizzo di flussi di processo per eliminare l'uso di acqua e ridurre la quantità di rifiuti;
- fermentazione simultanea di pentosi ed esosi;
- processi innovativi di frazionamento e purificazione.

La produzione di etanolo da siero

Tra le materie prime poco costose, altamente disponibili e che richiedono un processo minimo per la produzione di etanolo c'è il siero di latte, effluente dell'industria lattiero casearia (Kargi e Ozmihci, 2006; Antoni *et al.*, 2007; Foda *et al.*, 2010). Inoltre la scelta di questa matrice risulta essere una delle opzioni più interessanti per controllare l'inquinamento provocato dal siero (Zafar e Owais, 2005). Come matrice, oltre alla base di lattosio, il siero contiene vitamine e minerali che migliorano l'attività fisiologica delle cellule di lievito (Grba *et al.*, 2002).

L'uso di siero di latte grezzo come mezzo di coltura non è stato esplorato in modo completo (Zafar e Owais, 2005). Anche se molti processi industriali sono stati eseguiti in tutto il mondo utilizzando sia *Streptococcus fragilis* come nel processo industriale Dansk Gaerings sia *Kluyveromyces fragilis* nel processo Milbrew (Antoni *et al.*, 2007). Ci sono alcuni processi industriali per la produzione di etanolo dal siero di latte, che sono stati fatti in alcuni paesi; in particolare il siero permeato (liquido che viene raccolto dopo l'ultrafiltrazione del siero per la separazione delle proteine) è stato fermentato per decenni in Nuova Zelanda, ma anche in Irlanda, negli Stati Uniti e in Danimarca (Antoni *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010).

I più importanti impianti costruiti per la produzione di etanolo da siero di latte sono principalmente due: l'impianto del Gruppo Carbery in Irlanda e gli quelli dell'Anchor Ethanol in Nuova Zelanda (Guimarães *et al.*, 2010).

Il Gruppo Carbery, in Irlanda, ha messo in opera un impianto su scala industriale per la produzione di etanolo da siero di latte nel 1978. L'operazione è stata destinata alla produzione di etanolo potabile, ma dal 2005, l'azienda ha anche fornito etanolo a un operatore petrolifero in Irlanda per le miscele E85 ed E5. Il processo di Carbery fu poi adottato da impianti in Nuova Zelanda e negli Stati Uniti. Il siero di latte permeato viene fatto fermentare in modalità batch da 12 a 20 h, a seconda della concentrazione iniziale e dell'attività del lievito. Il lievito è recuperato a fine fermentazione e riutilizzato più volte prima di essere eliminato. Il titolo di etanolo a fine fermentazione è tipicamente nel range 2,5-4,2% (v / v) per ciascuna fermentazione, e viene utilizzato un processo di distillazione continua. Carbery produce circa 11 mila tonnellate di etanolo all'anno (Guimarães *et al.*, 2010).

In Nuova Zelanda, l'Anchor Ethanol, gestisce tre impianti di produzione di etanolo da circa 17 milioni di litri di etanolo all'anno. Anchor produce otto gradi diversi di etanolo, da etanolo potabile per bevande a alcool anidro per i combustibili. La materia prima è siero di latte deproteinato, ottenuto dalla produzione di caseina o dalla produzione di proteine di latte, che viene concentrata dal 4% a 8% di lattosio per osmosi inversa prima della fermentazione. Il concentrato viene fatto fermentare per circa 24 ore con *Kluyveromyces* spp., per conseguire un titolo di etanolo di circa il 4%; viene successivamente distillato e ad esso viene rimossa l'acqua al fine di ottenere diversi gradi di etanolo (Guimarães *et al.*, 2010).

1.4.3 Il mercato, l'economia e le politiche

Il mercato dell'etanolo nel mondo

Il bioetanolo e il biodiesel sono i soli biocarburanti prodotti in tutto il mondo in quantità notevoli (Antoni 2007). Il bioetanolo è probabilmente il più usato carburante alternativo automobilistico del mondo, principalmente grazie alla strategia del Brasile di produrre alcool dalla canna da zucchero, ma anche per il suo uso in Nord America come esaltatore di ottani della benzina (EUBIA, 2007).

La produzione mondiale di bioetanolo del 2005 è stata stimata in 38 miliardi di litri (Figura 12), l'80 % dei quali usati come carburanti. La produzione è concentrata soprattutto in Brasile e negli USA che assieme producono il 90% del totale (Soertart e Vandamme, 2006; Donadio e Marino 2008). La Cina e l'Europa, la cui produzione è significativamente in espansione, contribuiscono con l'8% (Donadio e Marino 2008). Inoltre, nella Tabella 3 si possono vedere i dieci più importanti produttori di bioetanolo, che insieme, sono responsabili di oltre il 91% della produzione mondiale (Figura 12) (Antoni *et al.*, 2007).

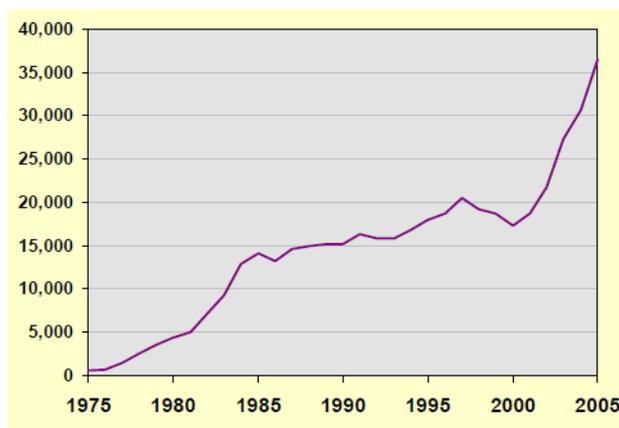


Figura 12. Produzione di etanolo mondiale dal 1975 al 2005 (milioni di litri) (Hunt, 2005).

Tabella 3. Produzione di bioetanolo in diversi paesi espressa in 10^6 m³ degli anni 2004 e 2006 (Antoni *et al.*, 2007).

	2004	2006
Brasile	15,09	16,99
USA	13,37	18,37
Cina	3,65	3,85
India	1,75	1,90
Francia	0,83	0,95
Russia	0,75	0,65
Sud Africa	0,42	0,39
UK	0,40	0,23
Arabia Saudita	0,30	0,20
Spagna	0,30	0,46
Tailandia	0,28	0,35
Germania	0,27	0,76
Altri	3,34	3,55
Totale	40,75	48,70

A livello mondiale, nel 2007 sono stati prodotti 52 miliardi di litri di etanolo, tre volte di più che nel 2000. I maggiori produttori del mondo di etanolo sono gli USA (27 miliardi di litri) ed il Brasile (19 miliardi di litri). L'Unione Europea e la Cina hanno prodotto 2 miliardi di litri ciascuno (FAO, 2008;

EUBIA, 2007), mentre nel 2011 l'Europa ha raddoppiato la sua produzione, al contrario della produzione della Cina, che è rimasta invariata (Tabella 4).

Tabella 4. Produzione mondiale di etanolo carburante 2010 - 2011 (milioni di galloni e di litri). Elaborazione dati da RFA, 2012.

Continente	2011 milioni di galloni	2010 milioni di galloni	2011 milioni di litri	2010 milioni di litri
Nord e Centro America	14401,34	13720,99	54515	51940
Sud America	5771,90	7121,76	21849	26959
Brasile	5573,24	6921,54	21097	26201
Europa	1167,64	1208,58	4420	4575
Asia	889,70	785,91	3368	2975
Cina	554,76	541,55	2100	2050
Canada	462,30	356,63	1750	1350
Australia	87,20	66,04	330	250
Africa	38,31	43,59	145	165
Oceania		66,04	0	250
Totale	28946,39	30832,63	109574	116714

In Brasile, per limitare l'importazione di petrolio, il governo ha lanciato un programma di produzione di etanolo dalla canna da zucchero e nel 2005 ne sono stati prodotti 14,3 miliardi di litri (Donadio e Marino, 2008).

Il Brasile è stato il leader mondiale (e primario utente) di produzione di etanolo combustibile per più di 25 anni. Tutte le stazioni di rifornimento in Brasile vendono etanolo puro (95%) (E95), corrispondenti a circa il 60% dell'etanolo prodotto, e il restante 40% viene venduto sottoforma di miscela al 25% di etanolo (E25) (Commissione europea, 2006; EUBIA, 2007).

Negli anni ottanta è iniziata, negli Stati Uniti, una significativa produzione di etanolo dall'amido del granturco, e, sotto la pressione delle organizzazioni di agricoltori e degli ambienti ecologisti, sono state varate normative che impongono l'uso di benzine miscelate con prodotti ossigenati. Le automobili usano benzine con il 10% di etanolo e in diversi stati molti veicoli pubblici usano etanolo puro (Donadio e Marino, 2008).

La crescita del mercato degli Stati Uniti è una tendenza relativamente recente, ma la loro capacità produttiva dell'etanolo è aumentata da 4 miliardi di litri nel 1996 a 14 miliardi di litri nel 2004 (Commissione europea, 2006), rendendoli ad oggi il produttore mondiale di etanolo più potente e il secondo più grande consumatore e produttore di etanolo al mondo (Antoni *et al.*, 2007) (Figura 13).

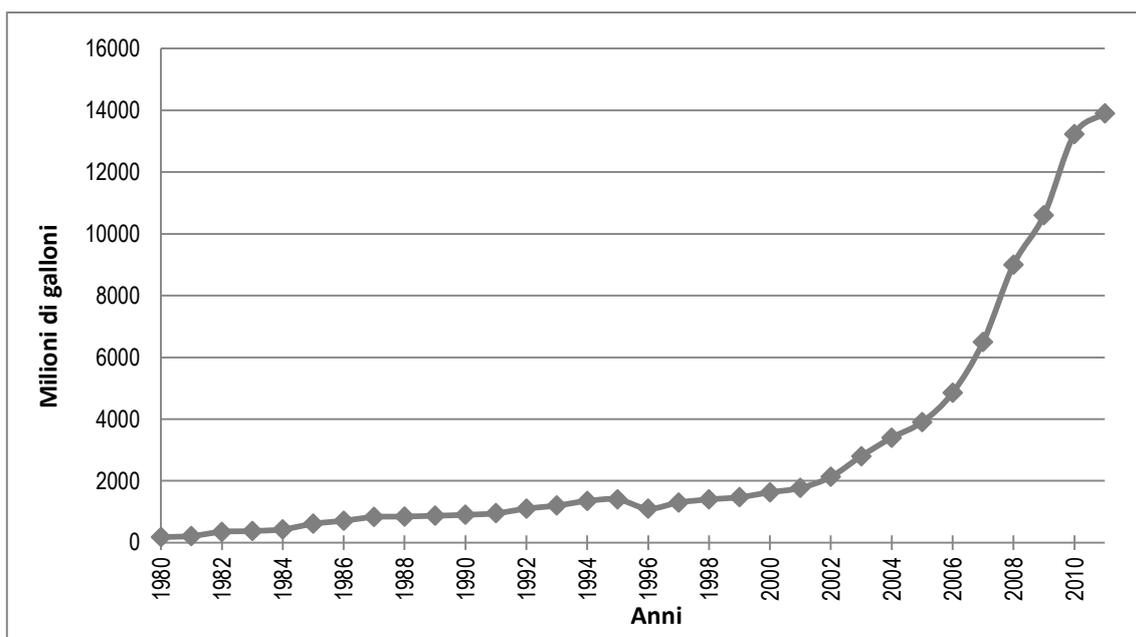


Figura 13. Storico della produzione di etanolo degli Stati Uniti dal 1980 al 2011. (Elaborazione dati RFA, 2012)

Altri paesi produttori e/o utilizzatori di etanolo sono Australia, Canada, Cina, Colombia, Repubblica Dominicana, Francia, Germania, India, Giamaica, Malawi, Polonia, Sud Africa, Spagna, Svezia, Tailandia e Zambia (Commissione europea, 2006).

In mercato dell'etanolo nell'Unione Europea

La produzione di bioetanolo in Europa nel 2003 è stata pari a 309.500 tonnellate (Figura 14).

La Spagna è stata il primo produttore europeo con 180.000 tonnellate; questo successo può essere spiegato con il fatto che questo paese non riscuote l'imposta sull'etanolo. Dopo la Spagna, il secondo produttore è stato la Francia (EUBIA, 2007).

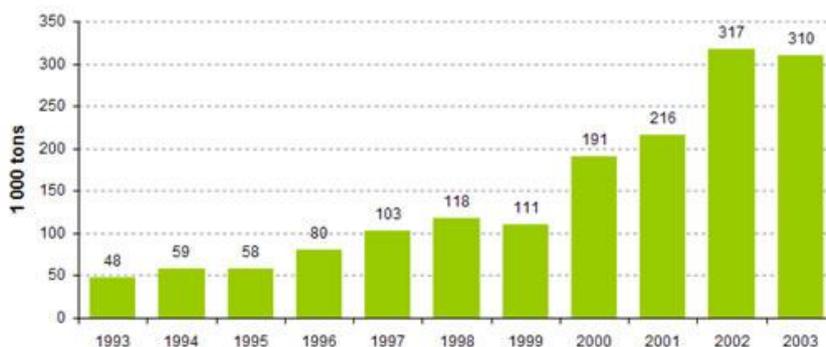


Figura 14. Evoluzione della produzione di bioetanolo nell'Unione Europea a 15 (EUBIA, 2007).

L'etanolo viene prodotto principalmente dal grano, e in misura minore dalla barbabietola da zucchero, e nel 2004 sono stati i maggiori produttori Francia, Spagna e Svezia, con un totale di quasi 500.000 tonnellate (Tabella 5).

Nel 2004, la produzione di bioetanolo nell'UE utilizzò 1,2 MMT di cereali su una produzione totale di oltre 289 MMT di grano e 1 MMT di barbabietole da zucchero su una produzione totale di 123,5 MMT (Schnepf, 2006).

Nel 2006 la produzione è stata pari a 1.592 milioni di litri, e la Germania è risultata essere il primo produttore con 431 milioni di litri; a seguire si trovano la Spagna con 396 milioni di litri e al terzo posto la Francia con 293 milioni di litri (Tabella 5).

Tabella 5. Produzione di bioetanolo in Europa dal 2004 al 2006 (milioni di litri) (EUBIA, 2007)

Paese	2004	2005	2006
Germania	25	165	431
Spagna	254	303	396
Francia	101	144	293
Polonia	48	64	161
Svezia	71	153	140
Italia	0	8	78
Ungheria	0	35	34
Lituania	0	8	18
Olanda	14	8	15
Repubblica Ceca	0	0	15
Latvia	12	12	12
Finlandia	3	13	0
Totale	528	913	1592

Il paese europeo più dedicato all'utilizzo dell'etanolo è la Svezia, che si è concentrata sulla produzione di etanolo da canna da zucchero e cascami di legno. La E85 per le vetture è venduta in 140 stazioni di servizio pubbliche in tutto il paese e già, nel 2005, la Svezia aveva raggiunto il suo obiettivo per il 2009 (Antoni *et al.*, 2007).

Nel 2010 L'Europa ha prodotto 4.268 milioni di litri, i primi paesi produttori sono rimasti Francia, Germania e Spagna (Tabella 6).

Tabella 6. Produzione di bioetanolo nei paesi dell'Unione Europea per gli anni 2010 e 2011* (milioni di litri) (EurObserv'er, 2012). (* Stima)

Paese	2010	2011*
Francia	1050,00	1007,00
Germania	761,00	770,00
Spagna	471,50	462,80
Belgio	315,00	400,00
Regno Unito	320,00	320,00
Olanda	100,00	275,00
Svezia	205,00	200,00
Austria	197,00	195,00
Ungheria	186,00	173,00
Polonia	200,00	167,00
Slovacchia	127,00	130,00
Repubblica Ceca	120,00	110,00
Romania	66,94	65,00
Italia	60,00	60,00
Lituania	49,36	18,00
Bulgaria	0,00	10,00
Finlandia	10,00	10,00
Irlanda	10,00	10,00
Latvia	19,20	5,00
Danimarca	n.a.	5,00
Unione europea	4 268,00	4 392,80

La politica dell'Unione Europea

Vari obiettivi politici, tra cui la riduzione delle emissioni di gas serra, la diversificazione delle fonti di approvvigionamento e dello sviluppare a lungo termine sostituti per il petrolio, oltre ad una diversificazione del reddito e l'occupazione nelle zone rurali, hanno spinto l'Unione Europea (UE) a promuovere la produzione e l'uso di biocarburanti (Schnepf, 2006).

Nel 2003, la Comunità Europea aveva fissato l'obiettivo di derivare dai biocarburanti almeno il 2% dei carburanti per il trasporto all'interno della Comunità entro la fine del 2005, per poi far crescere la quota di biocarburanti dello 0,75% ogni anno fino al 31 dicembre 2010, avendo come obiettivo intermedio il raggiungimento del 5,75% (Schnepf, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006), per poi raggiungere l'obiettivo di sostituire il 20% dei carburanti tradizionali con carburanti alternativi entro il 2020 (Schnepf, 2006; Capodicasa, 2008).

Tuttavia, l'obiettivo biocarburanti non era obbligatorio nei singoli Stati membri che erano anche liberi di stabilire standard più elevati e, di conseguenza, il grado di partecipazione è stato molto vario. Dato che gli obiettivi non erano obbligatori, non vi era alcuna penalità per la non conformità (Schnepf, 2006). Nonostante le diverse politiche statali ed europee tra cui un'esenzione fiscale fino

a 100 % sui biocarburanti (Antoni *et al.*, 2007) volte a sostenere la produzione di biocarburanti, l'obiettivo UE sui biocarburanti del 2% entro il 2005 non è stato raggiunto. Al contrario, il livello raggiunto era solo dell'1,4% dei carburanti per autotrazione (Schnepf, 2006).

Entro il 2020 l'UE si è prefissata di aumentare almeno al 10% la quota di energie rinnovabili nel settore dei trasporti (Antoni *et al.*, 2007; Commissione europea, 2011).

I biocarburanti utilizzati per raggiungere tale obiettivo devono soddisfare specifici requisiti di sostenibilità. Pertanto i biocarburanti non possono essere originati da prodotti di aree ad elevata biodiversità, come aree protette, oppure di aree ad alta concentrazione di carbonio, come foreste e praterie (Commissione europea, 2011).

L'economia dell'etanolo: i costi e i sussidi

La fermentazione degli zuccheri in etanolo è una tecnologia ormai matura, che viene applicata commercialmente su larga scala, ma c'è ancora qualche possibilità di miglioramento tecnologico che può ridurre significativamente i costi delle produzioni attuali. Questi costi sono in gran parte determinati dai prezzi delle materie prime, che possono rappresentare tra il 55 e l'80% del prezzo finale dell'etanolo, mentre i costi relativi all'impianto incidono solo per il 10-15% (Manzoni, 2006; Schnepf 2006; EUBIA, 2007). Per questo motivo l'utilizzazione di materiali di scarto offre vantaggi dovuti all'approvvigionamento di materiali a basso costo (Kargi e Ozmihici, 2006).

In media, i costi di approvvigionamento di biomasse combustibili nell'UE-15 variano da 1,6 €•GJ¹ (residui solidi industriali) a 5,4 €•GJ¹ (colture energetiche) (Tabella 7) e i costi delle colture energetiche sono vicini a quelli della biomassa importata (6 €•GJ¹) (EUBIA, 2007).

Tabella 7. Costi medi di approvvigionamento di biomasse negoziabili e colture per i carburanti da trasporto (€•GJ¹e €•TEP¹) nell'EU-15 (EUBIA, 2007).

Commerciabilità	€•GJ¹	€•TEP¹
Forestali sottoprodotti	2,4	100
Prodotti combustibili del legno	4,3	180
Residui agricoli secchi	3,0	126
Residui industriali solidi	1,6	67
Colture energetiche solide	5,4	226
Biocarburanti importati	6,0	251
Trasporto carburanti		
Bioetanolo	29	≈ 1200

Secondo EUBIA,, i costi di produzione nel 2007 per l'etanolo derivato da colture zuccherine o amidacee era di circa 28 €•GJ¹ che corrisponde a circa 0,60 €•l¹, o 1165-1184 €•TEP¹ (Tabella 8).

Tabella 8. Costi di produzione di bioetanolo nell'Europa a 25 paesi compresa Bulgaria e Romania (EUBIA, 2007).

Materia prima/Costo netto	Grano			Barbabetola		
	€•l ¹	€•GJ ¹	€•TEP ¹	€•l ¹	€•GJ ¹	€•TEP ¹
- Feedstock	0,40	0,40	18,9	0,26	12,3	513
- Co-prodotto di credito	0,15	0,15	7,1	0,03	1,4	59
Totale parziale dei costi delle materie prime	0,25	0,25	11,8	0,23	10,9	454
Costi di conversione	0,28	0,28	13,3	0,22	10,4	434
Costi di fusione (compresa l'adattamento di benzina)	0,05	0,05	2,4	0,05	2,4	99
Costi di distribuzione	0,01	0,01	0,5	0,10	4,7	197
Totale costo ai distributori di benzina	0,59	0,59	27,9	0,60	28,4	1184

E' da sottolineare che i co-prodotti di credito riducono i costi di produzione dell'etanolo. Nel caso di etanolo da frumento, il co-prodotto viene essiccato (*DDGS dried distillers grains with solubles*), e utilizzato nella mangimistica, mentre il sottoprodotto di etanolo da barbabietola da zucchero è la polpa di barbabietola (Delbianco e Sposini 2001; EUBIA, 2007).

Tuttavia, gli alti costi di produzione di biocarburanti prodotti nell'UE rispetto ai combustibili fossili rimane uno dei principali ostacoli al mercato, in particolare per bioetanolo. Secondo la CE, il bioetanolo diventa competitivo con il petrolio se questo ha un prezzo al barile di circa 90€ (Schnepf, 2006; Commissione europea, 2006). Nel mese di ottobre del 2012, un barile di petrolio è stato quotato a 89,49\$ (prezzo spot FOB EIA, 2012).

In particolare, il costo stimato dell'etanolo da materiale cellulosico varia ampiamente tra le indagini, con i costi di produzione nell'intervallo 0,28-1,0 \$•l¹ etanolo. Il costo delle materie prime, che varia notevolmente da 22 a 61\$ per tonnellata di sostanza secca, e i costi del capitale dipendenti della capacità dell'impianto, contribuiscono maggiormente al costo totale di produzione. Un altro fattore principale di costo è l'idrolisi, in particolare il processo enzimatico (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Il passaggio alla produzione dell'etanolo da materiali lignocellulosici, perché questa sia competitiva su larga scala, richiede un'ulteriore riduzione del costo di produzione. Un approccio è l'integrazione della produzione di etanolo con una produzione combinata di calore e di energia elettrica (Figura 15) (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Questo è stato stimato ridurre i costi della produzione di etanolo fino al 20 per cento per le condizioni della Svezia ed è la principale strategia perseguita (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

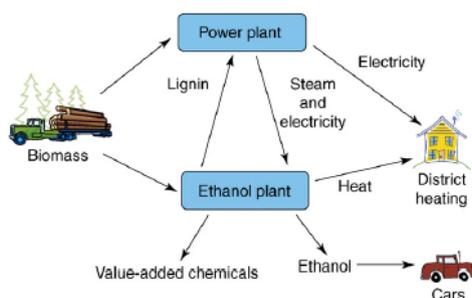


Figura 15. Bioraffineria: integrazione di un impianto di cogenerazione di calore ed energia con la produzione di etanolo (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Il costo delle materie prime può essere ridotto utilizzando l'intero raccolto per prodotti e co-prodotti così come un'alta resa di etanolo richiede un'idrolisi completa sia di cellulosa che di emicellulosa, seguita da efficienti fermentazioni di tutti gli zuccheri presenti nella biomassa. Nel lungo periodo, la tecnologia del bioetanolo costituirà la base per la produzione sostenibile di prodotti chimici di base e dei materiali in bioraffinerie future (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Alcuni biocarburanti sono attualmente ai margini della redditività economica, ma l'introduzione commerciale ha bisogno di ulteriori sussidi fino a quando non viene raggiunta la redditività. Più paesi, riconoscendo i benefici di riduzione d'idrocarburi, consentono agevolazioni fiscali e finanziamenti di origine governativa, legate alla caratteristica "rinnovabile" di questa fonte energetica (Delbianco e Sposini, 2001; Antoni *et al.*, 2007).

L'esenzione fiscale è uno strumento efficace per promuovere i biocarburanti, ed è stato sostituito in Germania da una legge che costringe l'aggiunta di biocarburanti ai carburanti convenzionali. Questo deve essere confrontato con la tassazione di 0,4857 €•l¹ su gasolio fossile. L'esenzione fiscale per il bioetanolo deve valere ancora perché il mercato non è del tutto considerato maturo (Antoni *et al.*, 2007).

L'esenzione fiscale non è stata attuata nel Regno Unito, che consente di altri incentivi per i biocarburanti. Al contrario, la Spagna e la Francia hanno fatto sforzi per promuovere i biocarburanti e produrre il bioetanolo (Antoni *et al.*, 2007).

1.4.4 La competizione alimentare e la questione ambientale

L'industria del bioetanolo in Brasile, è stata criticata come pericolosa per l'ambiente, in quanto una grande superficie è stata usata per le monoculture. Una discussione simile è stata innescata in Nord America e in Europa dove la produzione di amido per biocarburanti compete per la terra con l'industria alimentare e per problemi ambientali (Antoni *et al.*, 2007). Il problema principale è la diminuzione del granoturco destinato alla produzione diretta o indiretta dei generi alimentari con

l'inevitabile aumento dei prezzi al consumo di cereali, carne e latticini (Donadio e Marino, 2008). Occorre, inoltre, considerare che l'impiego estensivo di amido e di cereali, come fonte di carboidrati per la produzione di bioetanolo, comporta un ingente prelievo di acqua a fini irrigui e sottrae prodotti cerealicoli dall'uso tradizionale nell'alimentazione umana e animale (Donadio e Marino, 2008). I primi effetti sono stati osservati in Messico, causando un prezzo dell'amido troppo alto da pagare.

Molto complesso è il discorso legato ai vantaggi ecologici legati all'utilizzo del bioetanolo: Donadio sostiene che sono minimi, dato che l'energia prodotta appare circa uguale a quella spesa per la produzione e anche il risparmio delle emissioni di CO₂ non sembra sostanziale (Donadio e Marino, 2008) (Figura 16). Altri, come Nigro, sostengono che l'impatto ambientale dell'impiego del bioetanolo è minore rispetto a quello esercitato dai combustibili fossili, in termini di emissione in atmosfera di composti inquinanti (particolato, monossido di carbonio, anidride solforosa) e di gas serra, soprattutto per il fatto che tale composto presenta la caratteristica d'essere molto ossigenato. In particolare, il risparmio nelle emissioni di anidride carbonica, considerando anche la fase produttiva, è del 15-60%, a seconda della materia prima usata.

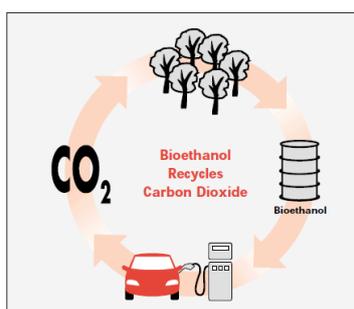


Figura 16. Bioetanolo e ciclo del carbonio (Delbianco e Sposini, 2001).

Se è condivisibile l'affermazione che lo sfruttamento delle masse vegetali, in particolare forestali, può contribuire a un miglioramento dell'ambiente tramite un maggior assorbimento dell'anidride carbonica presente in atmosfera, non è assolutamente facile quantificare questo effetto che può essere valutato solo attraverso uno studio che tenga conto del bilancio energetico complessivo (fase agricola, fase della trasformazione industriale, fase del consumo finale) (Delbianco e Sposini, 2001).

Delbianco e Sposini sostengono anche che i bio-combustibili, di contro:

- “sono di origine vegetale e quindi non contribuiscono all'emissione di anidride carbonica nell'atmosfera;
- non contengono zolfo;
- contengono nella loro molecola ossigeno consentendo una significativa riduzione delle emissioni di ossido di carbonio e di composti incombusti;

Introduzione

- evitano l'emissione di altre sostanze nocive associate alla combustione di combustibili fossili;
- sono totalmente "biodegradabili".

In conclusione, per ridurre al minimo tali effetti negativi, bisogna mirare ad un alto rendimento di biocarburanti (Antoni *et al.*, 2007) o dall'altra parte puntare all'utilizzo di substrati non alimentari quali la cellulosa o di scarti che non competono per la terra come i reflui dell'industria lattiero casearia.

2. Obiettivo della Tesi

Il siero di latte, prodotto in quantità significative come scarto dell'industria casearia, è una matrice organica ricca di nutrienti, fra cui il lattosio, disaccaride da cui è possibile ottenere per fermentazione bioetanolo. La scotta, refluò che residua dopo la produzione di ricotta, pur contenendo ancora lattosio, è caratterizzata dall'essere una matrice molto povera, e perciò non viene riutilizzata in alcun modo ed è considerata, quindi, solo uno scarto industriale.

Lo scopo di questa ricerca è lo sfruttamento degli effluenti prodotti dall'industria lattiero-casearia (siero e scotta) per la produzione di bioetanolo, al fine di convertire tali reflui in fonti rinnovabili.

Ad oggi la produzione di bioetanolo da siero di latte è considerata non competitiva rispetto alla fermentazione di altre matrici, come la canna da zucchero o il mais, a causa delle minori rese. Occorre tuttavia, considerare il vantaggio dato dal fatto che il siero di latte e la scotta sono scarti, e quindi, se utilizzati per produrre energia rinnovabile, non entrano in competizione alimentare come accade per altri prodotti.

Ai fini di ottimizzare le rese di processo è quindi indispensabile approfondire la conoscenza della fisiologia di *K. marxianus*, un lievito lattosio-fermentante dotato di interessanti caratteristiche fisiologiche nella fermentazione alcolica specificamente sulla matrice siero di latte e in particolar modo su scotta, di cui esistono solo poche ricerche, e valutare le cinetiche di produzione di etanolo prendendo in esame diverse tecnologie di gestione della fermentazione.

Nell'ottica degli obiettivi prefissati sono state testate modalità di gestione delle fermentazioni differenti per raggiungere le migliori rese di etanolo e prestazioni di processo. Tenendo conto sia della fisiologia del lievito *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*, scelto come il più idoneo alle matrici siero e scotta, sia della necessità di ridurre al minimo i costi, il lavoro si è focalizzato sullo studio dei seguenti fattori:

- (I) Attitudine alla fermentazione di siero e scotta; in particolare si è valutata la possibilità di arricchire la scotta, disponibile in grandi quantità, ma povera in elementi nutritivi, mescolandola con aliquote di siero.
- (II) Apporto controllato di ossigeno, per mediare l'ottimizzazione della resa di fermentazione con la creazione delle condizioni ottimali per la moltiplicazione cellulare.
- (III) Effetto di temperature differenti, per valutare la possibilità di migliorare le *performances* di fermentazione sfruttando la termotolleranza del lievito scelto.
- (IV) Fermentazioni in fase dispersa o con biomassa inclusa in alginato di calcio.
- (V) Fermentazione in batch o semicontinue.
- (VI) Produzione di etanolo da refluò di scotta pre-fermentata per la produzione di polioidrossialcanoati.

La ricerca svolta è parte del progetto BIOMOLENER, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, il cui obiettivo è il **“Recupero di scarti derivanti da attività agrozootecniche ed agroindustriali per la produzione di biomolecole ad elevato valore aggiunto e biocombustibili”**. Con questo progetto si intende elaborare un modello di bioraffineria per aziende lattiero casearie, basato su un sistema integrato di riutilizzo dei principali scarti derivanti da questa attività. L’obiettivo è di valorizzare questi scarti mediante l’estrazione o la produzione di biomolecole (proteine, acido lattico, bioplastiche) e di biocombustibili (bioetanolo, biodiesel, bioidrogeno, biometano). Il risultato atteso è il miglioramento del valore aggiunto dei processi agro-industriali e della loro qualità ambientale, mediante la riduzione dell’impatto ambientale e dei costi dello smaltimento dei reflui. Un altro aspetto è il miglioramento del bilancio energetico dovuto alla produzione di bioenergie potenzialmente riutilizzabili in azienda o a livello consortile senza investimento di superfici agricole dedicate, evitando così di utilizzare produzioni di possibile destinazione alimentare.

3. Materiali e Metodi

3.1 Le matrici

Per l'approvvigionamento delle matrici è stata individuata l'Azienda Cascina Fontanacervo di Villastellone (Torino). Presso tale azienda vengono allevate vacche da latte di razza Frisona ed un piccolo numero di vacche di razza Jersey. Il latte viene lavorato direttamente in azienda per la produzione di latte fresco, yogurt, formaggi (stracchino e toma) e ricotta.

Il siero di latte e la scotta sono stati prelevati nel caseificio subito dopo la produzione di stracchino e di toma nel caso del siero o di ricotta nel caso della scotta, e conservati a 4°C fino al momento dell'uso e per non più di tre giorni; per la conservazione più a lungo termine sono stati mantenuti a -25°C.

Un altro substrato di crescita, testato preliminarmente è stato il siero di latte deproteinato che viene ottenuto dal siero di latte sottoposto a calore, con un ciclo di 20 minuti a 121°C, e le proteine denaturate così ottenute vengono eliminate e viene tenuta come matrice solo il liquido limpido.

Dal momento che l'obiettivo principale del lavoro era la messa a punto di processi di fermentazione a costo minimo, gli altri substrati non sono stati sterilizzati.

3.2 Microrganismo e condizioni di crescita

Tutte le fermentazioni sono state effettuate con il lievito *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ceppo CBS 712.

La coltura madre, ottenuta sospendendo il liofilizzato, è stata mantenuta su piastre YEPD (glucosio 40 g•l⁻¹, peptone 5 g•l⁻¹, estratto di lievito 5 g•l⁻¹, agar 15 g•l⁻¹) sterilizzato a 110°C per 15 minuti (0,5 Atm); tutte le piastre sono state poi conservate a 4°C.

Le precolture sono state coltivate in beute da 300 ml con 150 ml di substrato di crescita in agitazione a 150 rpm per tre giorni nelle condizioni della successiva fermentazione: il substrato di crescita era, quindi, siero deproteinato, siero, scotta o miscela di scotta e siero (1:1); la temperatura d'incubazione era 28°C, 37°C, 40°C o temperatura ambiente.

La crescita del lievito è stata analizzata per determinazione diretta della concentrazione di cellule mediante conteggio con camera conta globuli di Bürker, prelevando direttamente dal fermentatore un'aliquota di 5 ml di substrato e diluendo opportunamente, ad intervalli durante tutta la fermentazione.

3.3 Analisi chimiche

Durante le fermentazioni sono state rilevate le concentrazioni di etanolo, lattosio e galattosio mediante saggio enzimatico (Megazyme K-ETOH 04/09 e K-LACGAR 12/05) prelevando un'aliquota di 5 ml di substrato direttamente dal fermentatore; aliquota necessaria per tutte le analisi enzimatiche, apportando le opportune diluizioni secondo la tolleranza dei singoli kit.

3.3.1 Etanolo

Per l'analisi dell'etanolo, la preparazione del campione ha previsto il prelievo di 1 ml di campione da aggiungere a 2 ml di acido perclorico 1M, e successivamente la centrifugazione a 11.000 rpm per 4 minuti. Il surnatante è stato prelevato e neutralizzato con KOH 2M fino a un pH compreso tra 9 e 10. Questo viene portato a volume in matraccio secondo la diluizione necessaria, dipendente dalla quantità di etanolo presunta (da 1:10 a 1:500), e poi lasciato in frigo per una notte. Si è, quindi, proceduto con l'analisi spettrofotometrica, secondo le indicazioni del kit, con letture a 340 nm in cuvette di plastica di lato 1 cm e volume 3 ml.

Le concentrazioni di etanolo sono state analizzate a intervalli periodici (di circa 24 ore) nel caso di ciascuna fermentazione.

3.3.2 Lattosio e Galattosio

Per l'analisi del lattosio e del galattosio è stato utilizzato 1 ml di campione tal quale, facendo le opportune diluizioni (da 1:1 a 1:50) in base al contenuto stimato; si è quindi proceduto con l'analisi spettrofotometrica, secondo le indicazioni del kit, con letture a 340 nm in cuvette di plastica di lato 1 cm e volume 3 ml.

Le concentrazioni di lattosio e galattosio sono state analizzate all'inizio e alla fine di ogni fermentazione.

3.4 Sistemi di fermentazione

3.4.1 Fermentazioni batch e semicontinue in bioreattore

Le fermentazioni batch e semicontinue sono state effettuate in un bioreattore BIOSTAT® A plus 11 Sartorius (Figura 17) gestito dal *software* PC-panel μ DCU Version 6.34. L'acquisizione e la gestione dei dati ottenuti sono state effettuate con il *software* MFCS/DA Version 2.61. Per ogni fermentazione il vessel e le relative sonde per il monitoraggio sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 15 minuti.

In ogni prova il vessel è stato riempito con 800 ml di terreno colturale e agitato a 400 rpm. L'ossigeno disciolto e il pH sono stati monitorati in continuo rispettivamente con OXIFERM™ FDA 160 O₂ Sensor (Hamilton) e elettrodo pH EASYFERM PLUS K8 160 (Hamilton). In ogni fermentazione sono stati aggiunti 400 µl di Silicon antifoam (Aldrich 83590) per evitare la formazione di schiuma all'interno del vessel.

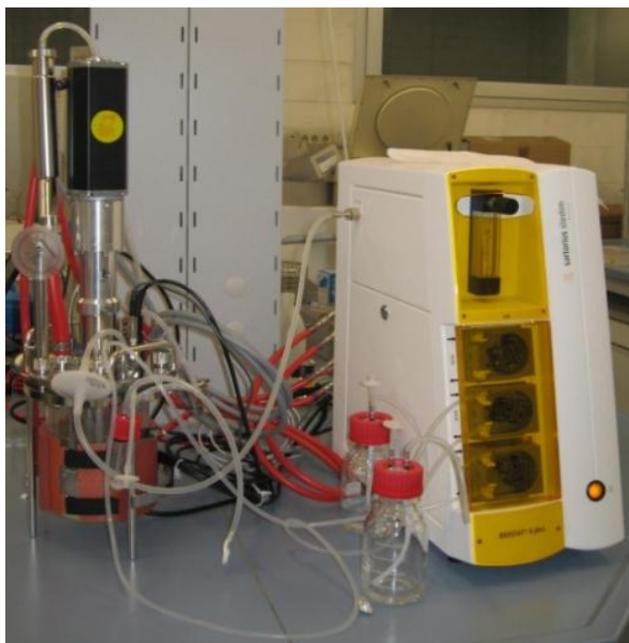


Figura 17. Bioreattore BIOSTAT® A plus 1l Sartorius (foto F. Zoppellari).

Nelle fermentazioni aerobiche il terreno di coltura è stato aerato in continuo con 1 ml·l⁻¹·min⁻¹ di aria sterile. Nelle fermentazioni anaerobiche il terreno di crescita è stato portato a saturazione con aria solo all'inizio della fermentazione; durante la fermentazione, l'ossigeno viene consumato dal metabolismo cellulare, e si instaura una condizione di anaerobiosi, verificata mediante monitoraggio della concentrazione di ossigeno in accordo con quanto detto da Hack e Marchant (1994), Banat *et al.*, (1996) e Banat *et al.*, (1998) (Figura 18).

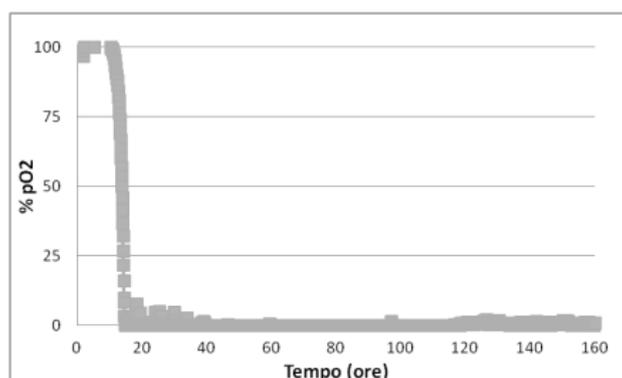


Figura 18. Concentrazione di ossigeno rilevata nel substrato di crescita durante la

fermentazione anaerobica di siero di latte a 37°C.

Nelle fermentazioni semicontinue, ogni tre giorni circa un terzo del volume del substrato di fermentazione viene prelevato e sostituito con terreno fresco.

3.4.2 Fermentazioni con cellule incluse in alginato di calcio

Le fermentazioni con cellule di *K. marxianus* intrappolate in alginato di calcio sono state effettuate in una colonna di vetro (Figura 19 e Figura 20) con diametro interno di 30 mm, altezza utile 300 mm, dotata di rubinetto in PTFE preceduto da un setto poroso che permette il prelievo del liquido senza far fuoriuscire le sferule di alginato. Inoltre, la colonna presenta due attacchi del diametro di 8 mm: un attacco superiore con setto poroso e un attacco inferiore, a cui viene collegato un tubo in silicone per permettere il ricircolo del liquido.

La preparazione delle cellule incluse in alginato prevede di partire dalla coltura in liquido. 150 ml di inoculo di *K. marxianus* (circa $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$), proveniente da una precoltura da siero di latte o da scotta, secondo la matrice che sarebbe stata utilizzata in seguito, viene centrifugato per 10 minuti a 6000 rpm. Il surnatante viene, quindi, risospeso con una soluzione di peptone (5 g \cdot l $^{-1}$) sterile. A questo viene aggiunto 1 g di sodio alginato e la sospensione ottenuta viene fatta sgocciolare in 100 ml di soluzione di CaCl₂ 2% in lieve agitazione, aiutandosi con la soluzione di peptone (quantità di peptone utilizzata in totale 20 ml). Le sferule formatesi, vengono trasferite dalla soluzione di CaCl₂ 2% ad una soluzione di CaCl₂ 0,5% e lasciate a solidificare per circa un'ora.

La colonna, precedentemente sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti, viene riempita con le cellule incluse in sferule di alginato (Figura 21). Vengono poi aggiunti circa 125 ml di siero di latte o di scotta e 75 ml di CaCl₂ 0,5% per evitare la dissoluzione delle sferule. Il ricircolo del substrato viene effettuato in continuo da una pompa peristaltica esterna, quella del fermentatore, dall'alto verso il basso. Le fermentazioni sono state condotte a temperatura ambiente (circa 23°C).

Nel caso delle fermentazioni in semicontinuo, ogni tre giorni 45 ml di substrato di fermentazione vengono prelevati e sostituiti con terreno fresco.

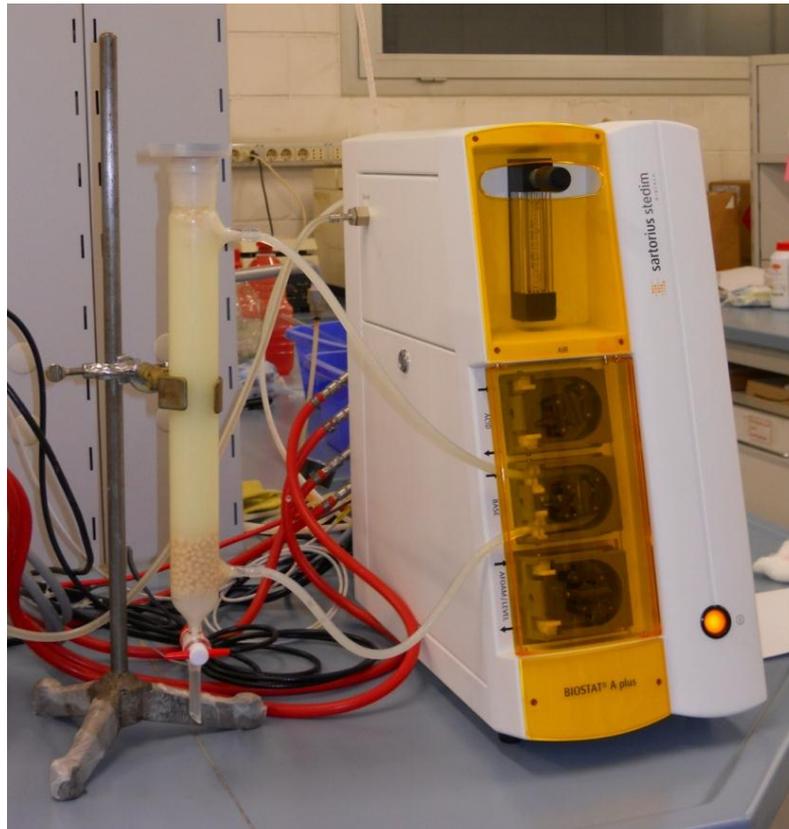


Figura 19. Colonna in vetro con cellule immobilizzate in alginato di calcio e immerse in soluzione di siero di latte e di CaCl_2 0,5% (foto F. Zoppellari).



Figura 20. Particolare della colonna in vetro con cellule immobilizzate in alginato di calcio (foto F. Zoppellari).



Figura 21. Particolare delle sferule di alginato di calcio contenenti le cellule di *K. marxianus* (foto F. Zoppellari).

3.5 Condizioni di fermentazioni

Diversi parametri fisiologici e tecnologie di gestione di fermentazione sono stati analizzati e confrontati come segue.

(I) Attitudine alla fermentazione di siero e scotta.

Siero e scotta sono stati esaminati come substrati di fermentazione quattro differenti matrici: siero deproteinato, siero di latte non diluito, scotta non diluita, e una miscela di scotta e siero di latte 1:1. La miscela è stata testata in considerazione del fatto che la scotta ha un contenuto residuo in proteine pressoché nullo ed è, quindi, nutrizionalmente più povera rispetto al siero; si è voluto perciò valutare l'opportunità di migliorare la capacità moltiplicativa e fermentativa delle cellule di lievito nella scotta aggiungendo un'aliquota di siero.

Le fermentazioni sono state condotte in batch in bioreattore (3.4.1) in aerobiosi a 37°C, per sette giorni, con un inoculo starter di $1 \cdot 10^6$ cellule \cdot ml⁻¹.

(II) Apporto controllato di ossigeno: aerobiosi e anaerobiosi.

Il dosaggio del fattore ossigeno è di fondamentale importanza, poiché, come già detto, *K. marxianus* non tollera un'anaerobiosi stretta; se da un lato l'aria è indispensabile per la moltiplicazione ed il metabolismo cellulare, dall'altro è necessario indurre anaerobiosi per favorire il metabolismo fermentativo rispetto a quello respiratorio e produrre quindi etanolo. È pertanto necessario indagare il comportamento del lievito sia in aerobiosi che in anaerobiosi, per rendere possibile la crescita cellulare e contemporaneamente massimizzare la resa in etanolo. Sono state, quindi, confrontate le precedenti fermentazioni (I) con fermentazioni in anaerobiosi.

Le fermentazioni anaerobiche, in seguito ai risultati precedenti, hanno interessato tre differenti matrici: siero di latte, scotta, e la miscela di scotta e siero di latte 1:1. Sono state condotte in batch in bioreattore a 37°C, per sette giorni, con un inoculo starter di $1 \cdot 10^6$ cellule \cdot ml⁻¹, in condizioni di anaerobiosi indotta, così come descritta nel paragrafo 3.4.1.

(III) Effetto di temperature differenti.

Visto che le applicazioni di microrganismi termofili a livello industriale sono state da sempre ampiamente auspiccate (Banat *et al.*, 1998), si è indagato il comportamento del lievito a diverse temperature. Le fermentazioni, a seguito dei risultati delle precedenti (II), sono state effettuate in anaerobiosi, le matrici utilizzate sono state siero e scotta. Le fermentazioni in batch vengono condotte in bioreattore per sette giorni.

Sono state scelte le temperature di 28°C e 40°C (Grba *et al.*, 2002; Rech *et al.*, 1999; Banat *et al.*, 1992; Fonseca *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010).

Dalle prime prove è risultato che a 40°C con un inoculo di $1 \cdot 10^6$ cellule \cdot ml⁻¹ la moltiplicazione

cellulare di *K. marxianus* risultava essere inibita, pertanto nelle successive fermentazioni sono stati utilizzati inoculi di $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

(IV) Fermentazioni con biomassa inclusa in alginato e in fase dispersa.

Dato che è stato ampiamente dimostrato che l'immobilizzazione di cellule microbiche in sistemi di alginato può migliorare l'efficienza del processo fermentativo e facilitare la gestione di processi continui o semicontinui con i ceppi termotolleranti di *K. marxianus* (Singh *et al.*, 1998, Banat *et al.*, 1998) si è testato la fermentazione con cellule incluse in alginato (3.4.2) sia in batch che in fermentazioni semicontinue.

Le prime prove in batch sono state condotte in colonne di vetro per 140 ore per il siero e per 100 ore per la scotta. A queste sono seguite le fermentazioni semicontinue che sono state effettuate sia con siero sia con scotta per circa 480 ore. In tutte le prove sono state monitorate le concentrazioni di etanolo durante la fermentazione, e di lattosio e galattosio all'inizio e alla fine della fermentazione.

Le fermentazioni semicontinue in fase dispersa sono state condotte in bioreattore (vedere paragrafo 3.4.1) a 28°C sia per siero sia per scotta. Per il siero di latte un terzo del volume del mezzo di fermentazione è stato prelevato e sostituito con terreno fresco a 72, 186 e 335 ore di fermentazione, mentre le sostituzioni per la scotta sono avvenute a 142, 241, 311 e 406 ore.

(V) Produzione di etanolo su refluo di una fermentazione di scotta già precedentemente utilizzato per la produzione di PHA.

Per indagare ulteriormente le potenzialità di questo lievito, con l'obiettivo di valorizzare gli scarti e di sfruttare al massimo le matrici, si è condotta una fermentazione in batch con una matrice derivante da una precedente fermentazione operata da un consorzio batterico per la produzione di poliidrossialcanoati (PHA). I PHA sono polimeri poliesteri termoplastici sintetizzati da vari generi di batteri (*Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, etc...) attraverso la fermentazione di zuccheri o lipidi.

La matrice di partenza è stata, quindi, il surnatante prelevato alla 96^{ma} ora dalla fermentazione di scotta.

La fermentazione è stata condotta in bioreattore (vedere paragrafo 3.4.1) a 28°C in anaerobiosi con un inoculo di $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$. In questa fermentazione, diversamente dalle altre, sono stati aggiunti 3 ml di Silicon antifoam (Aldrich 83590) per evitare la formazione di schiuma all'interno del vessel, che in questo caso era rilevante.

4. Risultati

4.1 Caratterizzazione matrici

Le concentrazioni medie di lattosio e galattosio riscontrate all'inizio delle fermentazioni di siero e di scotta sono riportate in Tabella 9. Sono stati presi in considerazione i valori iniziali determinati in tutte le fermentazioni effettuate nei tre anni di ricerca.

Tabella 9. Concentrazioni medie di lattosio e galattosio determinate in tutte le fermentazioni.

	Lattosio		Galattosio	
	g·l ⁻¹	dev. st.	g·l ⁻¹	dev. st.
Siero	37,29	9,75	4,60	5,79
Scotta	34,21	5,13	1,06	1,57

Il lattosio presenta un valore leggermente maggiore nel siero, anche se non sono così evidenti differenze con la scotta. Per il siero si riscontrano valori di lattosio simili a quanto riportato in letteratura (4-5%) (Domingues *et al.*,2000; Gigliotti e Verga, 2007, Foda *et al.*,2010; Ozmihici e Kargi, 2007; Grba *et al.*,2002; Kargi e Ozmihci, 2006; Guimarães *et al.*,2010). Le deviazioni standard sono risultate molto elevate.

L'alta variabilità di composizione è dovuta sia alla variabilità dei processi di caseificazione sia alla diversità di alimentazione delle vacche nelle varie stagioni, e, quindi, alla diversa composizione del latte che influenza, perciò, i reflui. In ogni caso, non si è ritenuto economicamente sostenibile ricorrere alla modifica iniziale delle matrici, in quanto, questo non sarebbe facilmente realizzabile in un'ipotesi di *scale up*.

4.2 Fermentazioni in aerobiosi

4.2.1 Produzione di etanolo

Per quanto riguarda la produzione di etanolo (Figura 22) si è osservato un andamento simile nel siero, nella scotta e nella miscela di scotta e siero. È stato osservato un picco nella produzione di etanolo nelle prime 30-50 ore, seguito da una diminuzione, fino al completo esaurimento dell'etanolo presente, probabilmente indotto dal metabolismo ossidativo a carico dell'etanolo.

In particolare, si è rilevato un picco nel siero corrispondente ad una produzione di etanolo di $6,22 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 24 ore, mantenuto per una ventina di ore, prima di esaurirsi completamente dopo il terzo giorno.

Nella scotta il picco è stato rilevato intorno dalla 30^{ma} alla 51^{ma} con un massimo di $1,68 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, poi esauritosi anche in questo caso dopo il terzo giorno.

Nella miscela di scotta e siero il picco di maggior concentrazione è stato alla 51^{ma} ora con $5,36 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, anche in questo caso, come nei precedenti, dopo il terzo giorno non si osservava più la presenza di etanolo.

Diverso è stato il comportamento osservato nella matrice siero deproteinato che ha avuto una produzione quasi nulla di etanolo, con un valore massimo solo di $0,17 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ alla 65^{ma} ora.

In conclusione, la produzione massima di etanolo è stata osservata nel siero di latte, più bassa in scotta, nulla con il siero deproteinato. La miscela di scotta e siero ha mostrato una produzione di etanolo intermedia tra siero e scotta in termini quantitativi, ma più lenta rispetto al siero di latte.

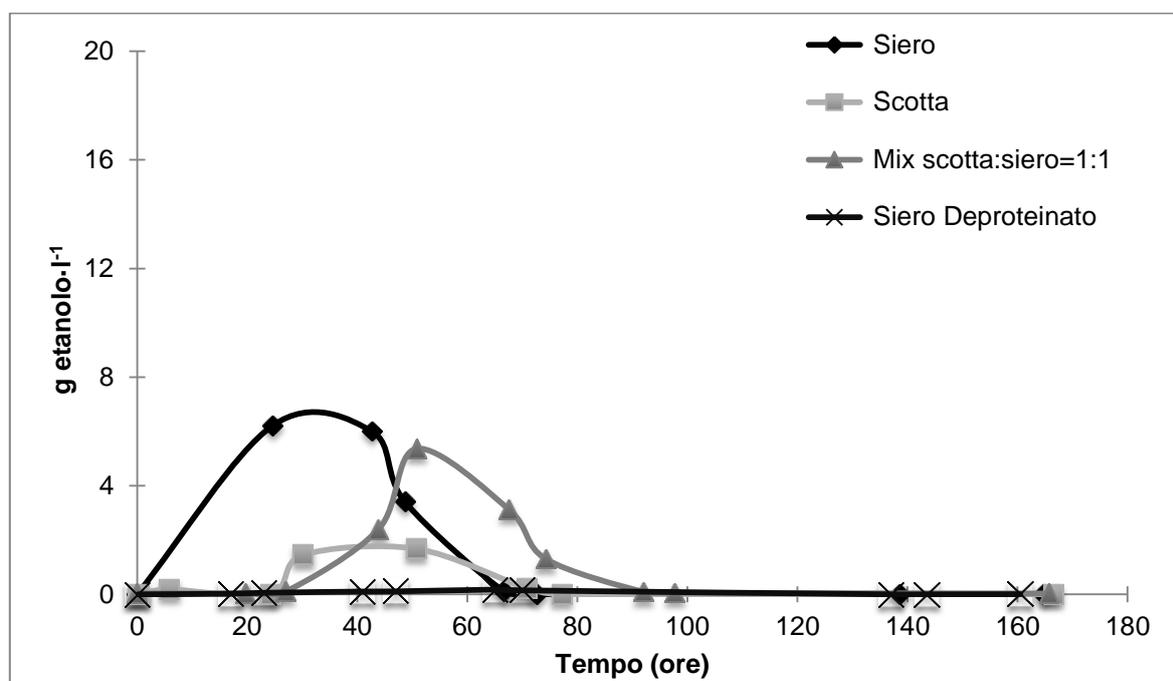


Figura 22. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione aerobica di siero di latte, scotta, mix e siero deproteinato. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, immissione di aria sterile $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$, inoculo $1\cdot 10^6 \text{ cellule}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2.2 Curva di crescita del lievito

In Figura 23 viene mostrato l'andamento nel tempo della crescita cellulare di *K. marxianus* nei quattro substrati fermentati.

La crescita di *K. marxianus* nel siero mostra una fase esponenziale molto breve, di circa 20 ore, con una crescita massima di $6 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$ a 139 ore.

La crescita di *K. marxianus* in scotta mostra una fase esponenziale di circa 48 ore con una crescita massima cellulare vicina a $1 \cdot 10^9$ cellule \cdot ml $^{-1}$ a fine fermentazione.

Nel mix la crescita cellulare mostra un andamento pressoché identico alla scotta, una fase di latenza che dura circa 48 ore e una crescita cellulare massima con valori superiori a $1 \cdot 10^9$ cellule \cdot ml $^{-1}$ a fine fermentazione.

Il siero deproteinato ha, invece, una fase esponenziale molto più lunga, fin verso l'80^{ma} ora, anche se la concentrazione cellulare finale, in fase stazionaria, è di $5,8 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$, simile a quella riscontrata in siero.

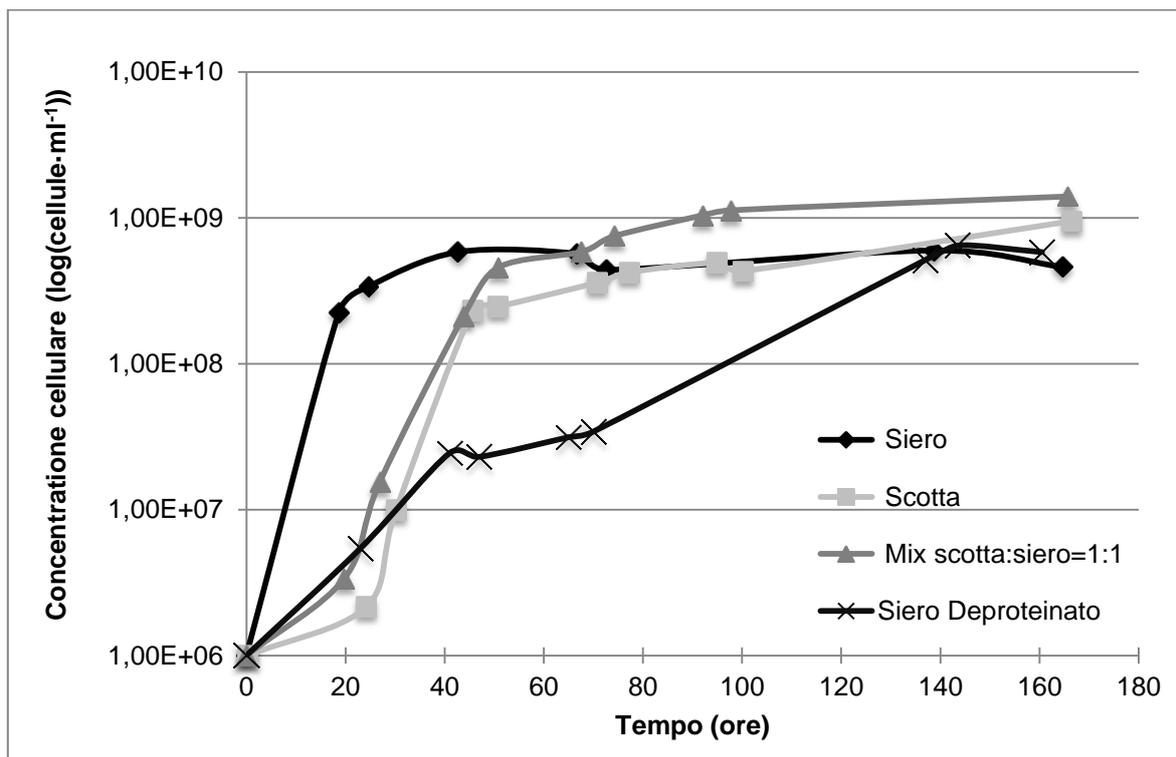


Figura 23. Concentrazione cellulare del lievito *K. marxianus* nella fermentazione aerobica del siero, scotta, mix e siero deproteinato a 37°C.

4.2.3 Andamento del pH

Per quanto riguarda l'andamento del pH (Figura 24) si possono notare due comportamenti simili: il primo riguarda il siero deproteinato e il siero e il secondo riguarda la scotta e il mix.

Per il siero e il siero deproteinato si parte da un pH della matrice intorno a 5,5 e alla fine della fermentazione il pH arriva intorno a 6,5.

La scotta e il mix partono da una matrice leggermente più acida rispetto alle altre due, intorno a 5, e il pH arriva a fine fermentazione a 8 per il mix e 8,5 per la scotta.

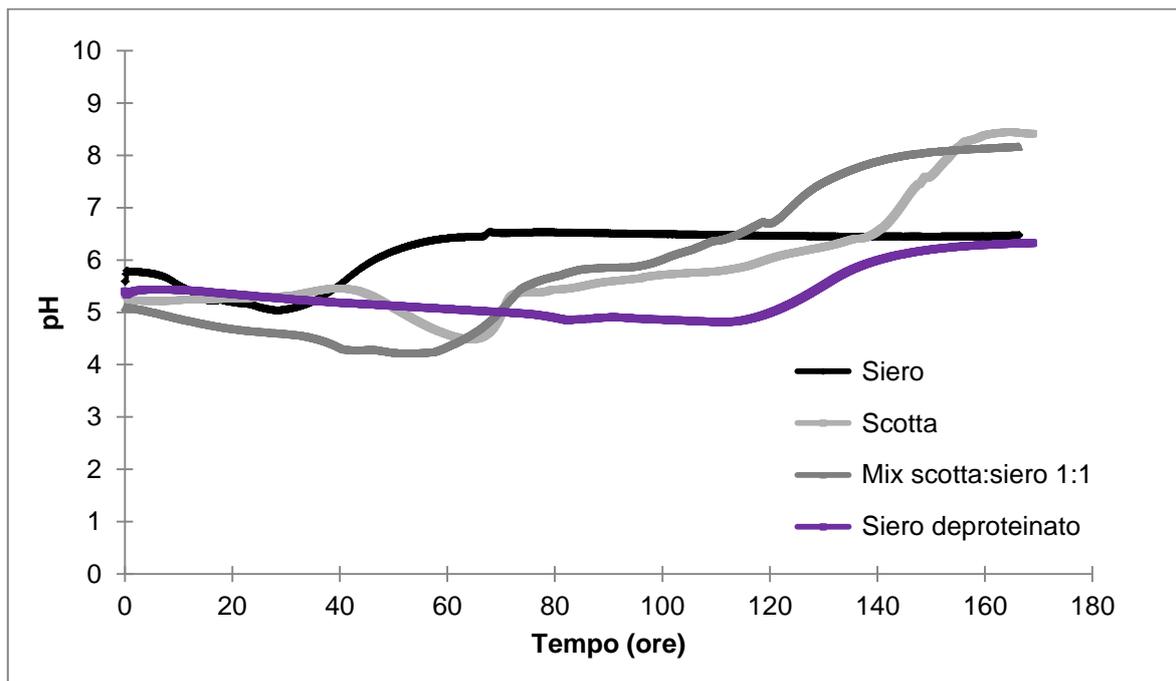


Figura 24. Andamento del pH in siero, scotta, mix e siero deproteinato. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, immissione di aria sterile 1 ml•l⁻¹, inoculo 1•10⁶ cellule•ml⁻¹.

4.2.4 Consumo di ossigeno

Per quanto riguarda l'andamento dell'ossigeno disciolto nel corso della fermentazione, questo risulta essere molto vario all'interno delle quattro matrici (Figura 25).

Si può, però, riscontrare un comportamento simile per la scotta e per il mix. Si nota una riduzione quasi totale dell'ossigeno presente nelle matrici, nonostante l'insufflazione di aria costante tra la 40^{ma} e l'80^{ma} ora, per poi ritornare, a fine fermentazione ad una concentrazione di ossigeno intorno al 90%.

Per il siero la riduzione dell'ossigeno presente fino all'assenza completa si ha prima della 20^{ma} ora situazione che perdura fin verso alla 70^{ma} ora; successivamente, anche in questo caso, la percentuale di ossigeno risale fino a ritornare a livelli intorno al 100%.

Risultati

Diverso comportamento si osserva per il siero deproteinato, che riduce solo del 50% il suo quantitativo di ossigeno; inoltre, questo avviene per un periodo ristretto, una ventina di ore, tra l'80^{ma} ora fino alla 100^{ma}.

Il momento in cui la fermentazione diventa anaerobica corrisponde al periodo in cui avviene la produzione di etanolo. A un maggior consumo di ossigeno corrisponde una maggiore produzione di etanolo.

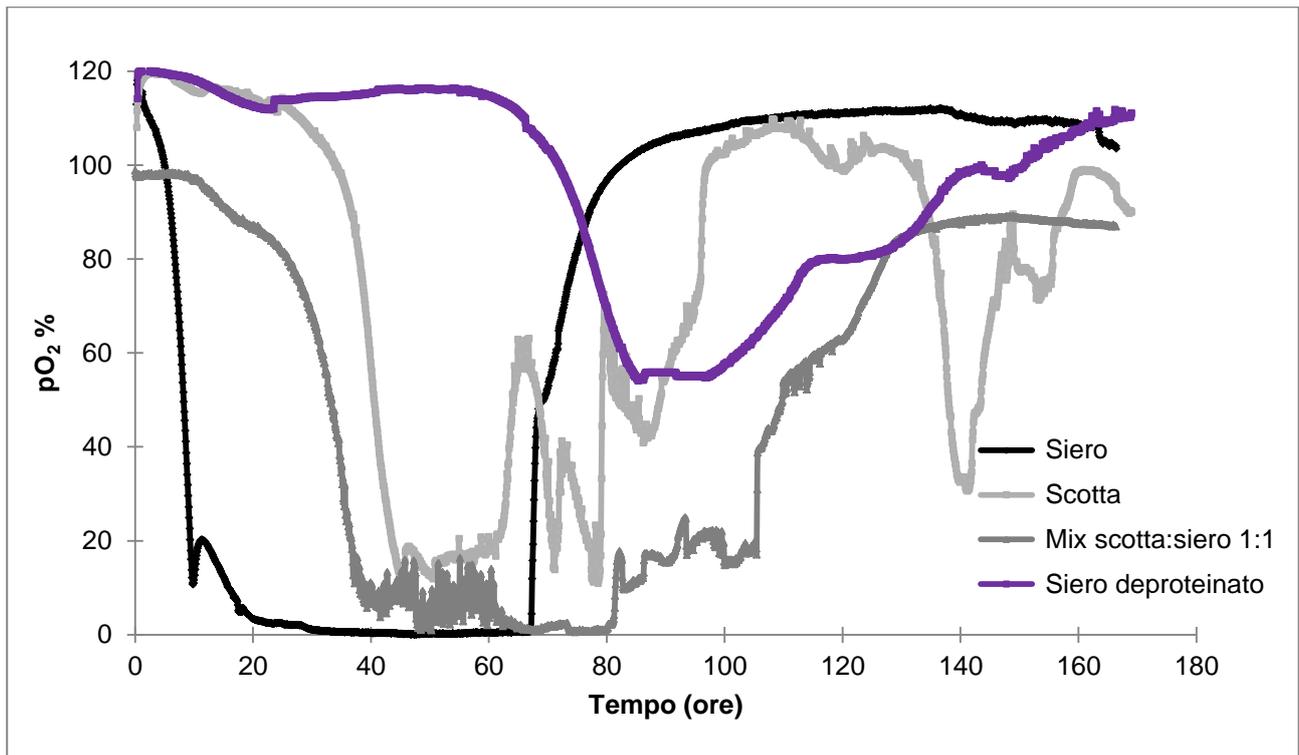


Figura 25. Andamento della concentrazione di ossigeno disciolto in siero, scotta, mix e siero deproteinato. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, immissione di aria sterile 1 ml·l⁻¹, inoculo 1·10⁶ cellule·ml⁻¹.

4.3 Fermentazioni in anaerobiosi

Le matrici prese in considerazione sono state tre: siero di latte, scotta, e la miscela di scotta e siero di latte (1:1).

4.3.1 Produzione di etanolo

Gli andamenti delle fermentazioni nelle prove condotte in anaerobiosi (Figura 26) sono risultati molto diversi rispetto alle prove condotte in aerobiosi (Figura 22): non si è, difatti, osservata alcuna diminuzione della concentrazione di etanolo successiva al punto di massima produzione; raggiunta a fine della fermentazione.

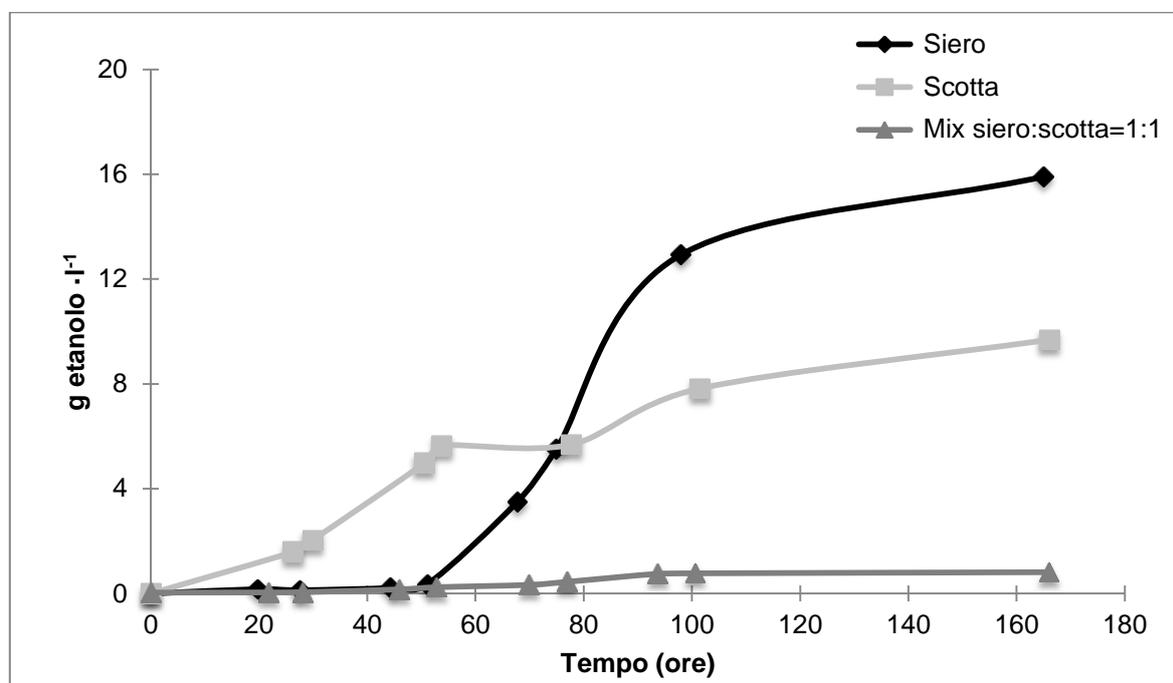


Figura 26. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione anaerobica di siero di latte, scotta e mix. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^6$ cellule ml^{-1} .

Per quanto riguarda la produzione di etanolo in anaerobiosi (Figura 26), si è osservato un andamento della formazione di etanolo similare in siero e in scotta.

Nelle fermentazioni anaerobiche le concentrazioni di etanolo sono fortemente superiori rispetto all'aerobiosi. Il siero ha prodotto una concentrazione finale in etanolo di $15,90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, più che raddoppiata rispetto all'aerobiosi ($6,22 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a 24 ore).

Anche la scotta ha mostrato una concentrazione massima superiore ($9,68 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) rispetto alle condizioni aerobiche ($1,68 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ alla 51^{ma}), anche se inferiore a quella del siero di latte. La massima concentrazione di etanolo nella scotta si è raggiunta all'incirca allo stesso tempo, ovvero a fine

fermentazione.

La miscela di scotta e siero ha prodotto quantità esigue di etanolo.

Tutto questo indica che, il processo fermentativo che conduce alla produzione di etanolo, per il siero e la scotta, è favorito in condizioni di anaerobiosi. In termini di tempo, in caso di fermentazione aerobica, è indispensabile definire con precisione il momento in cui la fermentazione dovrebbe essere interrotta per ottenere la massima resa in etanolo, mentre nella fermentazione anaerobica occorrono tempi più lunghi, ma si ottengono produzioni maggiori.

4.3.2 Curva di crescita del lievito

In Figura 27 viene mostrato l'andamento nel tempo della crescita cellulare di *K. marxianus* nei tre substrati in anaerobiosi.

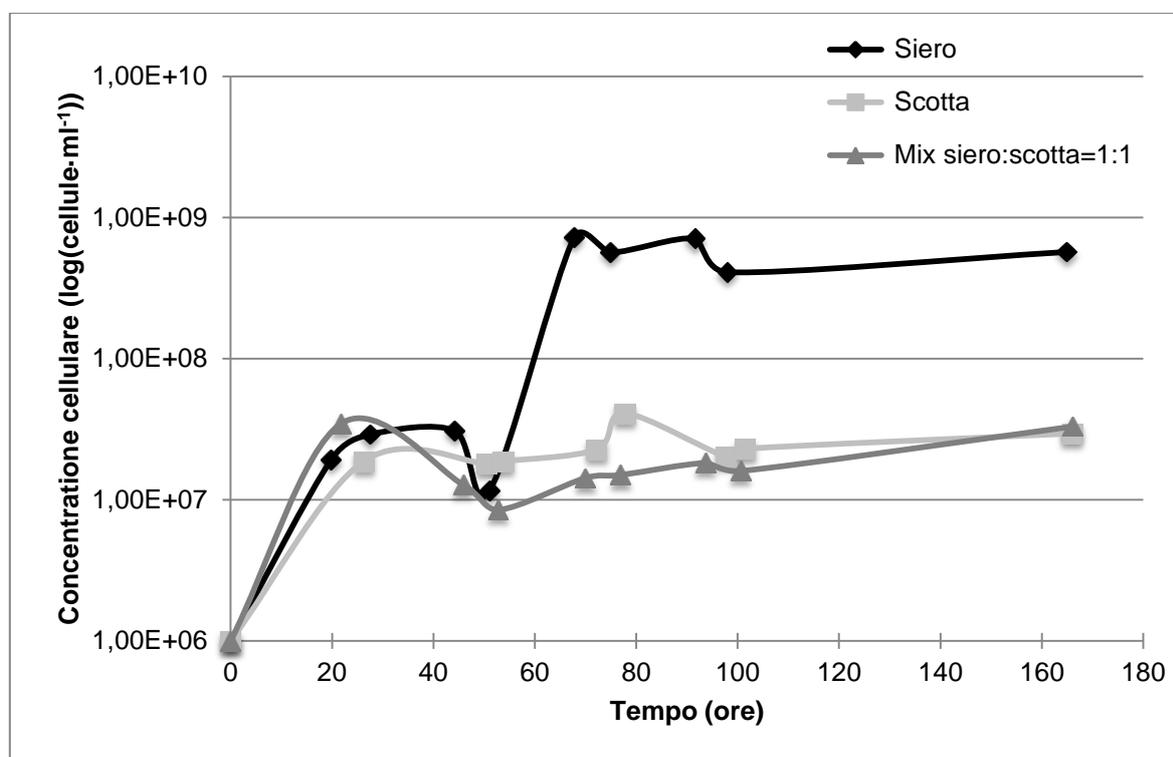


Figura 27. Concentrazione cellulare del lievito nella fermentazione anaerobica di siero, scotta e mix a 37°C. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^6$ cellule ml⁻¹.

La crescita di *K. marxianus* in siero sembra di tipo a doppio sigmoide, con una fase esponenziale di circa 20 ore seguita da un arresto di moltiplicazione di circa 20 ore, a cui segue una seconda fase esponenziale con la quale si raggiunge la concentrazione di $7 \cdot 10^8$ cellule·ml⁻¹.

La seconda fase esponenziale non è stata osservata in scotta, in cui la massima concentrazione cellulare è rimasta pari a $1 \cdot 10^7$ cellule·ml⁻¹.

La miscela di scotta e di siero mostra un andamento pressoché identico alla scotta.

Le fermentazioni anaerobiche hanno, perciò, indotto una minore crescita cellulare rispetto alle fermentazioni aerobiche che, infatti, dopo una breve fase esponenziale del lievito raggiungevano una concentrazione cellulare di circa $1 \cdot 10^9$ cellule ml^{-1} in fase stazionaria in tutti i substrati di fermentazione (Figura 23).

Quindi le condizioni di anaerobiosi pur avendo causato una riduzione della biomassa prodotta, più evidente in scotta, hanno favorito una maggior produzione di etanolo. Dove si è prodotta più biomassa si è anche prodotto più etanolo.

4.3.3 Andamento del pH

Per quanto riguarda l'andamento del pH in anaerobiosi (Figura 28) si ha un andamento simile in tutte e tre le matrici.

Il siero parte da un pH 5 e arriva a valori poco superiori a 3,5 dopo le prime 100 ore.

La scotta parte da un pH di 5,5 e arriva a 4 intorno alle 60 ore.

Il mix segue il comportamento del siero partendo da pH 5 e arrivando a valori vicini a 3,5 intorno alle 80 ore.

Il comportamento riscontrato nelle fermentazioni anaerobiche è inverso rispetto all'aerobiosi. Infatti, il pH in condizioni anaerobiche a fine fermentazione è più basso di quello iniziale, mentre in condizioni aerobiche il pH a fine fermentazione aumenta anche fino a 8,5 (Figura 24).

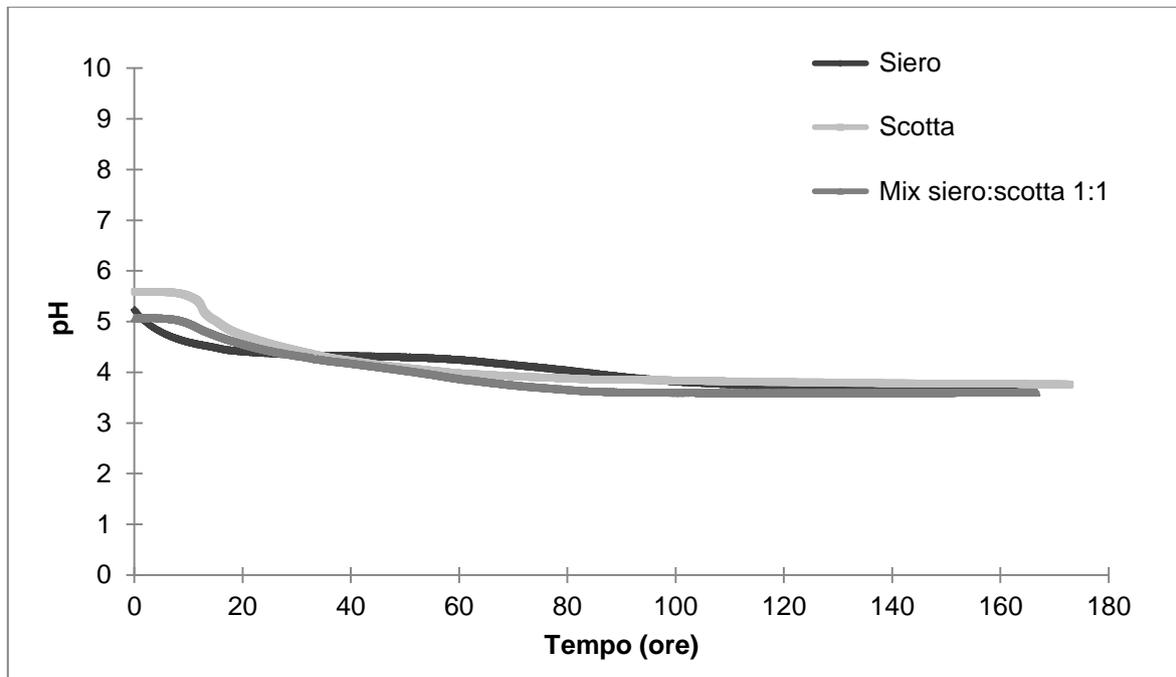


Figura 28. Andamento del pH nel siero, nella scotta e nel mix in anaerobiosi. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^6$ cellule $\cdot \text{ml}^{-1}$.

4.3.4 Consumo di ossigeno

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione di ossigeno disciolto nel caso delle fermentazioni in anaerobiosi, questo risulta essere simile per le tre matrici (Figura 29).

Nel siero, l'ossigeno presente si esaurisce completamente dopo circa quindici ore, rimanendo vicino a zero per tutta la durata della fermentazione.

Per la scotta, l'andamento è identico al siero, ma l'ossigeno presente si esaurisce completamente, rimanendo vicino a zero per tutta la durata della fermentazione già dalla decima ora.

Nel mix, la fase che porta all'esaurimento dell'ossigeno dura invece quasi quaranta ore.

Mentre in aerobiosi (Figura 25) si nota una riduzione quasi totale dell'ossigeno presente nelle matrici, nonostante l'insufflazione di aria costante, per poi ritornare, a fine fermentazione, ad una concentrazione di ossigeno intorno all'80-100%; per quanto riguarda l'anaerobiosi (Figura 29) si può notare che tutto l'ossigeno di cui era saturo la matrice inizialmente viene sempre consumato totalmente, e l'ossigeno disciolto rimane a zero per tutta la durata della prova.

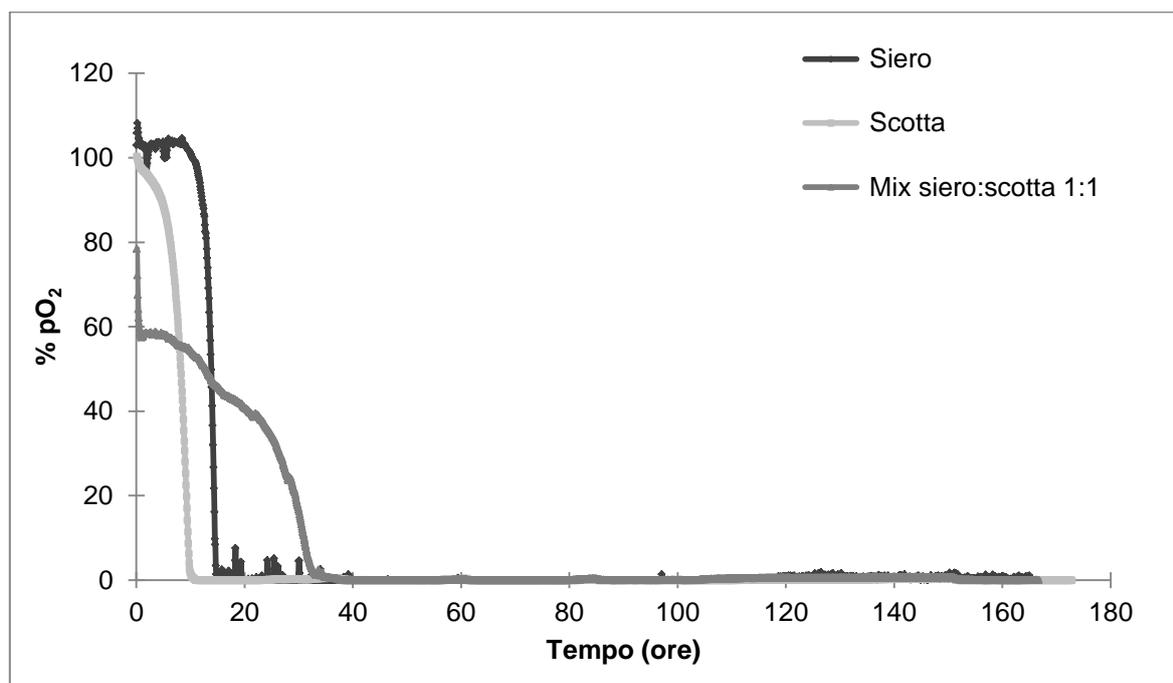


Figura 29. Andamento della concentrazione di ossigeno disciolto nel siero, nella scotta e nel mix in anaerobiosi. Condizioni di fermentazione: temperatura 37°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^6$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

4.3.5 Concentrazioni di lattosio e galattosio e resa in etanolo

In Tabella 10 vengono riportate la resa, la produzione massima ottenuta di etanolo e le concentrazioni di lattosio e di galattosio all'inizio e alla fine della fermentazione.

In generale, i valori di lattosio iniziale sono maggiori nel siero e nel mix, mentre la scotta presenta

un tenore in lattosio inferiore (in media $33,18 \pm 0,76 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ rispetto a $44,33 \pm 2,80 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ di siero e mix). Il contenuto di galattosio iniziale risulta essere molto vario.

Per quanto riguarda le rese si può notare che in aerobiosi sono molto basse, come la concentrazione di etanolo prodotto.

Le massime rese e le più alte concentrazioni in etanolo si sono ottenute con le fermentazioni anaerobiche di siero e di scotta. La migliore resa si ottiene con la scotta con una resa di 0,54, seguita dal siero con un valore di 0,36.

Il lattosio residuo è praticamente nullo nelle fermentazioni in aerobiosi, mentre in anaerobiosi il siero presenta tracce di questo elemento. Il mix e la scotta hanno notevoli residui di lattosio a fine fermentazione, rispettivamente $31,35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ e $15,47 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Il galattosio residuo risulta essere in sostanza nullo in aerobiosi e nella scotta in anaerobiosi, mentre ne rimangono tracce nel siero e nel mix in anaerobiosi.

Tabella 10. Fermentazioni aerobiche e anaerobiche effettuate a 37°C: resa in etanolo, concentrazione massima di etanolo e concentrazioni all'inizio e alla fine della fermentazione di lattosio e di galattosio.

	Resa ^a	Produzione di etanolo ^b	Lattosio ^c		Galattosio ^c	
			Iniziale	Finale	Iniziale	Finale
Siero in aerobiosi	0,14	6,22	43,94	0,90	1,28	0,40
Mix in aerobiosi	0,10	5,36	47,98	0,00	5,91	0,00
Scotta in aerobiosi	0,04	1,68	33,72	0,04	4,16	0,00
Siero in anaerobiosi	0,36	15,90	44,21	2,40	3,87	1,19
Mix in anaerobiosi	0,06	0,81	41,16	31,35	5,72	2,60
Scotta in anaerobiosi	0,54	9,68	32,64	15,47	1,18	0,33

^a resa: massima concentrazione di etanolo / (lattosio + galattosio)_i - (lattosio + galattosio)_f

^b produzione di etanolo: concentrazione massima di etanolo rilevata durante la fermentazione ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

^c lattosio e galattosio concentrazione: $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

L'anaerobiosi conduce, quindi, ad un processo fermentativo lento, ma con una resa e una produzione maggiori di quello anaerobico, senza, comunque, per questo andare ad esaurire le risorse zuccherine delle matrici.

4.4 Effetto di temperature differenti

Si è indagato il comportamento del lievito a diverse temperature: 40°C e 28°C.

Le fermentazioni, a seguito dei risultati delle precedenti (§ 4.2 e § 4.3), sono state effettuate solo in anaerobiosi e le matrici utilizzate sono state siero e scotta; in quanto la miscela di scotta e di siero non aveva prodotto etanolo.

4.4.1 Produzione di etanolo

Per valutare gli eventuali effetti sulle rese in etanolo e sulla tolleranza di *K. marxianus*, come primo step, sono state eseguite prove alla temperatura di 40°C.

Per quanto riguarda la fermentazione anaerobica del siero (Figura 30), la maggior temperatura ha indotto un anticipo della produzione di etanolo, rispetto alle fermentazioni precedenti a 37°C; dalle 48 ore della fermentazione a 37°C si è passati alle 20 ore a 40°C.

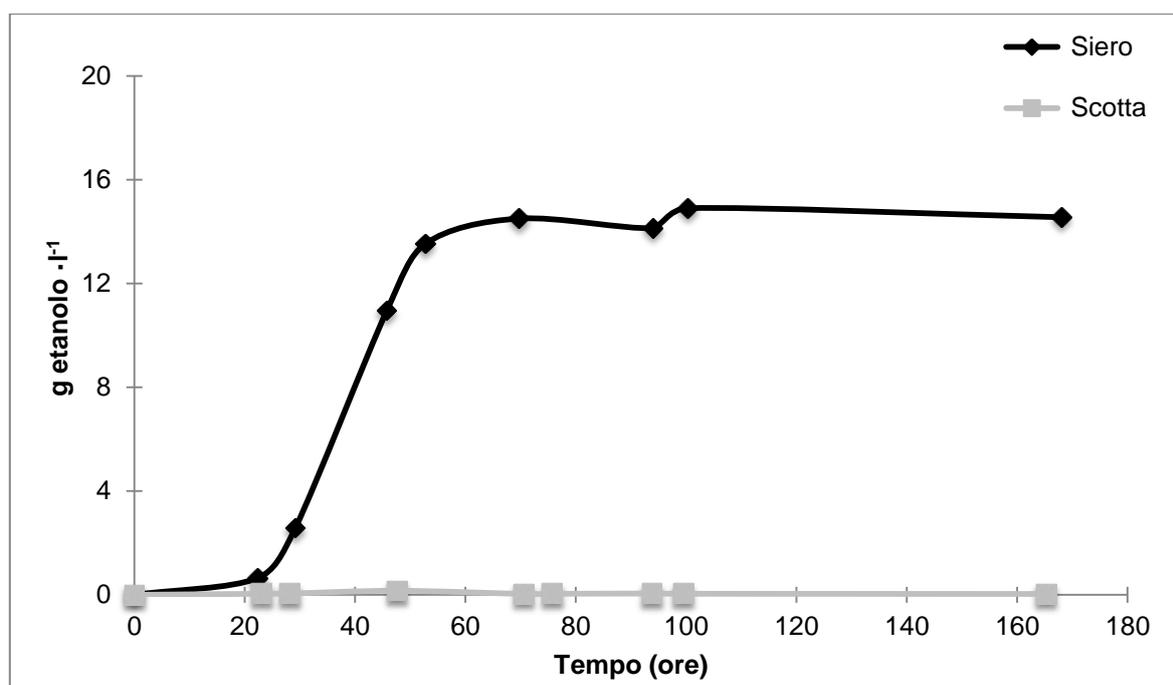


Figura 30. Produzione di etanolo nelle fermentazioni anaerobiche di siero di latte e di scotta. Condizioni di fermentazione: temperatura 40°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule ml⁻¹.

La concentrazione di etanolo è aumentata rapidamente raggiungendo un massimo di 14,51 g·l⁻¹ al terzo giorno, concentrazione che è rimasta pressoché costante fino al termine della fermentazione. La massima produzione (14,91 g·l⁻¹) è stata raggiunta a 100 ore. La concentrazione di etanolo a 40°C, anche se risulta essere leggermente inferiore a quella ottenuta a 37°C, viene raggiunta in

meno tempo e viene mantenuta fino alla fine della fermentazione.

L'effetto della maggior temperatura nella scotta è stato, invece, di tipo inibente, probabilmente a causa delle maggiori difficoltà di adattamento delle cellule di lievito in una matrice non favorevole dal punto di vista nutrizionale, e di conseguenza, la scotta non ha prodotto etanolo.

Testando la temperatura di 28°C, la concentrazione massima di etanolo raggiunta con il siero è pari a 17,04 g·l⁻¹ (Figura 31); tale concentrazione è superiore a quella ottenuta a 40°C, ed è anche maggiore di quella ottenuta nelle fermentazioni a 37°C precedentemente descritte (vedere § 4.3.1). L'andamento della produzione risulta particolare: la produzione di etanolo inizia subito, nelle prime 24 ore, e dopo tre giorni supera i 12 g·l⁻¹, poi la produzione sembra arrestarsi per un giorno. Al quarto giorno si raggiunge la concentrazione massima con una leggera riduzione a fine fermentazione.

La fermentazione della scotta ha mostrato un andamento simile al siero fino al terzo giorno. La produzione è poi ancora aumentata raggiungendo la concentrazione massima osservata di 14,99 g·l⁻¹ al quarto giorno (Figura 31). Nel caso della scotta, dopo il raggiungimento della concentrazione massima si è notato un decremento notevole del contenuto di etanolo alla fine della fermentazione.

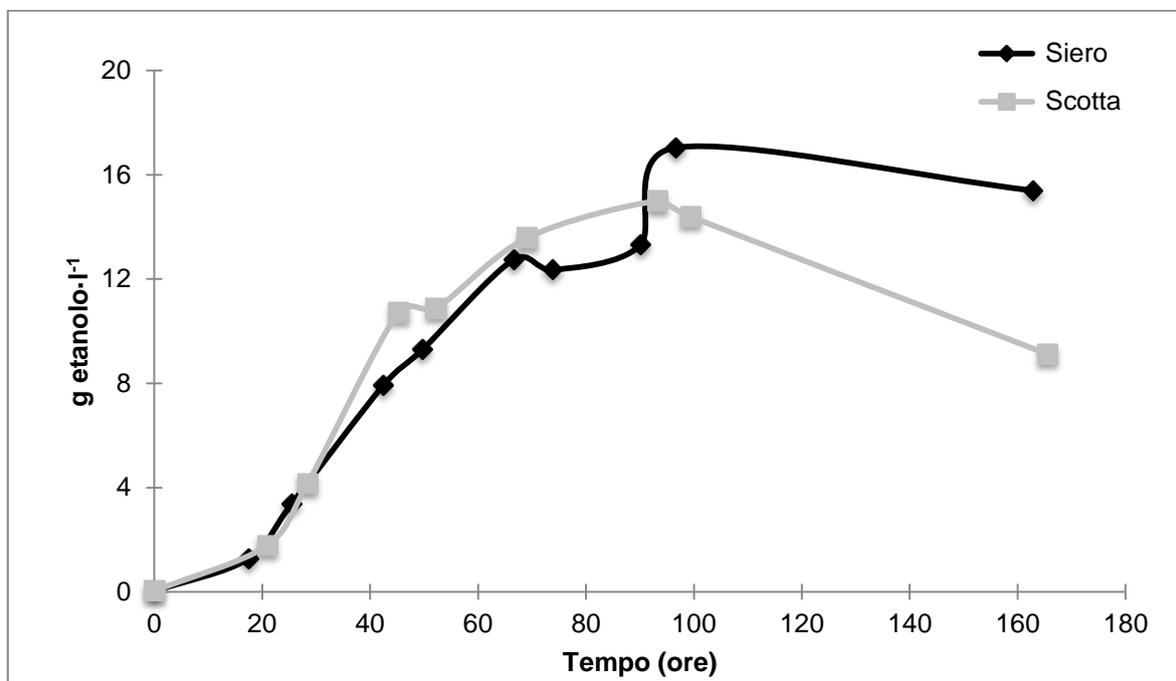


Figura 31. Produzione di etanolo nelle fermentazioni anaerobiche di siero di latte e di scotta. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, avviamento inoculo 1·10⁸ cellule ml⁻¹.

4.4.2 Curva di crescita del lievito

Sono state condotte una serie di fermentazioni a 40°C con inoculo iniziale pari a $1 \cdot 10^6$ cellule \cdot ml $^{-1}$. In tutte, la moltiplicazione cellulare di *K. marxianus* è risultata completamente inibita. Pertanto nelle successive fermentazioni a 40°C sono stati utilizzati inoculi ad alta concentrazione di biomassa ($1 \cdot 10^8$ cellule ml $^{-1}$).

Dopo una fase iniziale di decrescita, la concentrazione cellulare del lievito durante tutta la fermentazione si è attestata intorno a valori di $4 \cdot 10^7$ cellule \cdot ml $^{-1}$ (Figura 32).

Nella scotta, partendo da un inoculo di $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$, si nota che la concentrazione diminuisce fino a valori di $1 \cdot 10^7$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

Si può, perciò, notare che la sopravvivenza del lievito in siero è risultata leggermente migliore che in scotta a 40°C.

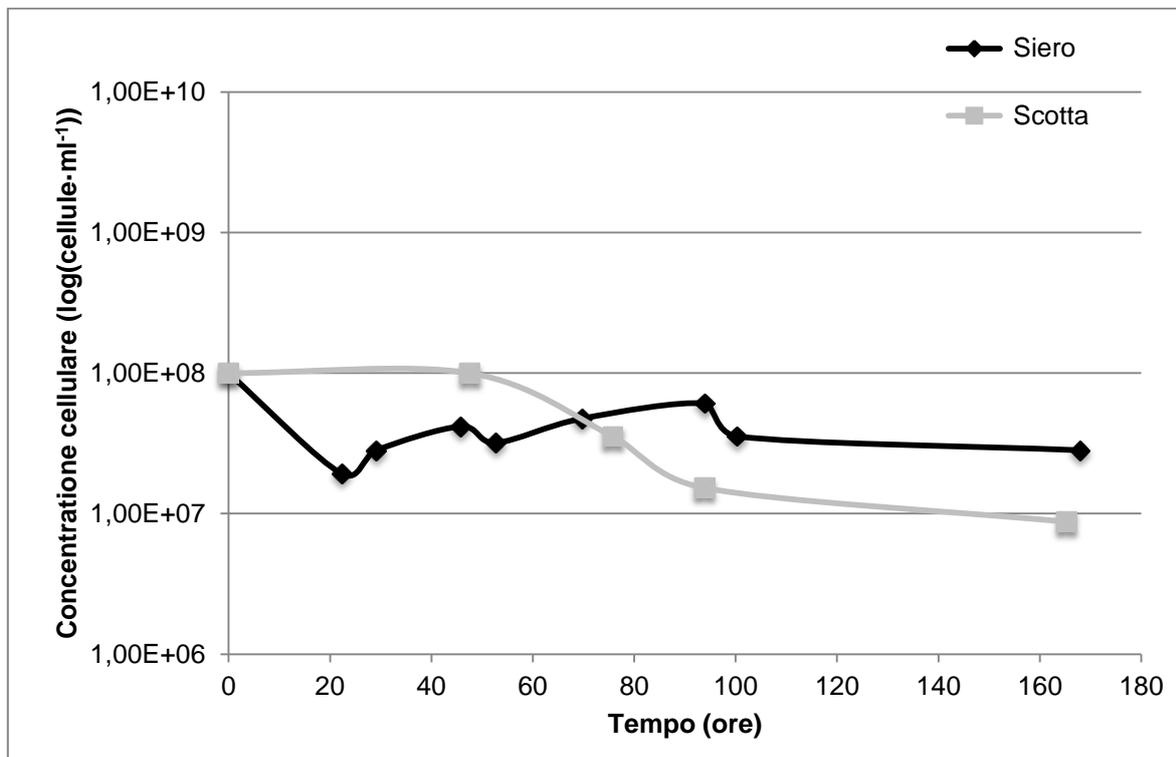


Figura 32. Concentrazione cellulare del lievito nella fermentazione anaerobica di siero e di scotta a 40°C. Condizioni di fermentazione: temperatura 40°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

Per ottenere la confrontabilità dei dati, anche nelle fermentazioni a 28°C è stato utilizzato un inoculo iniziale pari a $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

Nelle fermentazioni a 28°C (Figura 33), l'andamento della concentrazione cellulare è piuttosto stazionario e pressoché uguale in entrambe le matrici.

Nel siero la concentrazione cellulare rimane per buona parte della fermentazione sopra valori di

Risultati

$1,22 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$, e con un valore massimo di $1,81 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$ dopo tre giorni dall'inoculo. La scotta ha avuto un andamento simile al siero, ma con valori superiori a $2 \cdot 10^8$ cellule ml $^{-1}$ per quasi tutta la fermentazione.

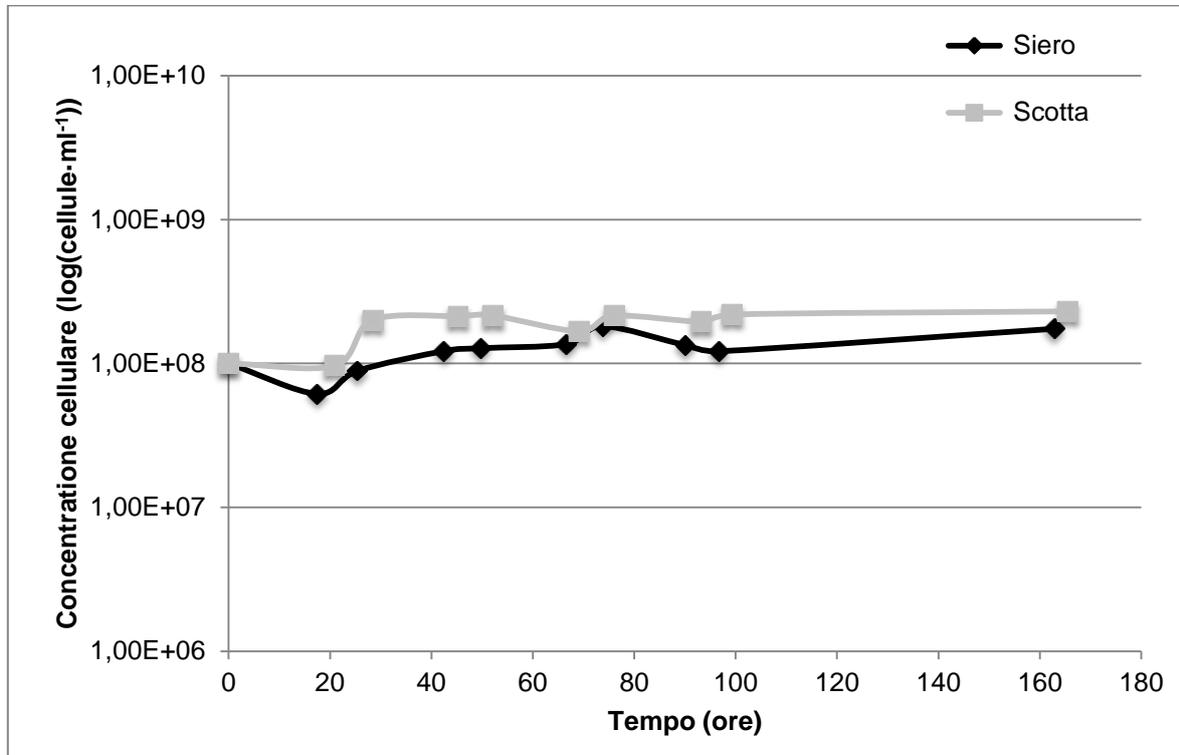


Figura 33. Concentrazione cellulare del lievito nella fermentazione anaerobica di siero e di scotta a 28°C. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

L'andamento della moltiplicazione cellulare del lievito subisce pertanto l'influenza della temperatura.

4.4.3 Andamento del pH

Per quanto riguarda l'andamento del pH nelle diverse fermentazioni a 40°C (Figura 34) e a 28°C (Figura 35) si può notare un andamento simile.

Nelle fermentazioni a 40°C il siero parte da pH 7 e arriva a pH 4 dopo circa dieci ore.

La scotta parte da pH vicino a 6, per poi arrivare a pH 4,5 dopo 20 - 40 ore.

Nelle fermentazioni a 28°C il siero parte da pH 7,5 e arriva a un pH intorno a 4 dopo circa 20 ore.

La scotta parte da pH poco inferiore a 6, per attestarsi a pH 5.

Si può, quindi, affermare che nel caso dell'andamento del pH delle fermentazioni a 40°C e 28°C l'andamento sia pressoché uguale sia nei valori di pH che nelle tempistiche.

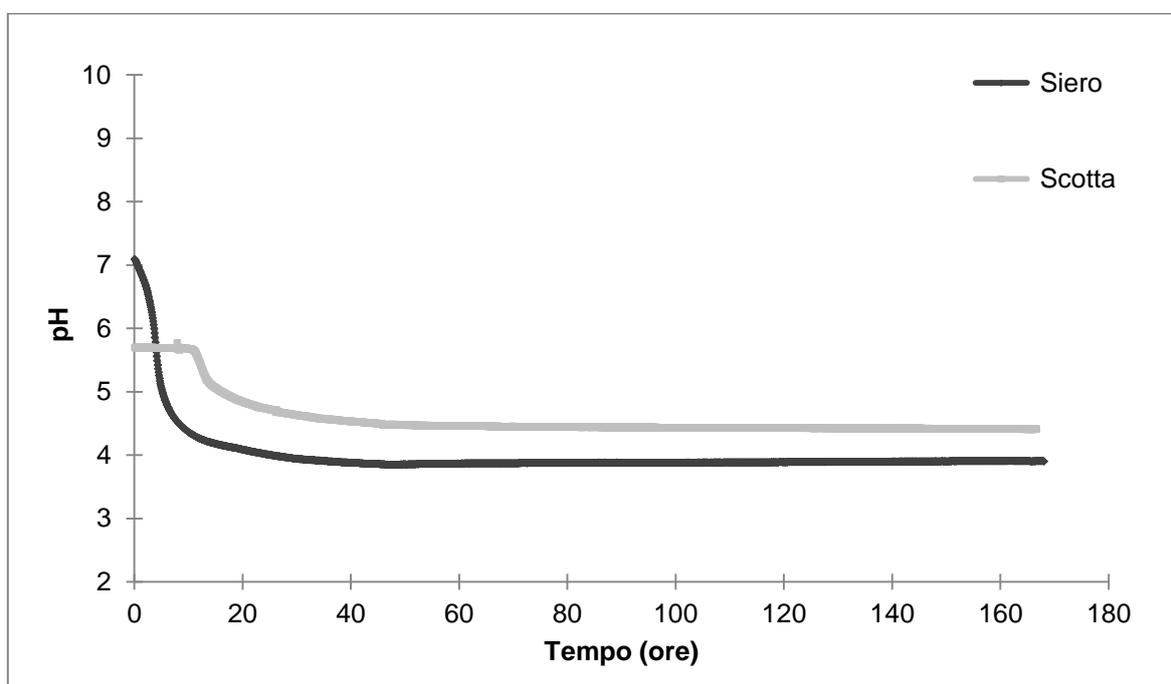


Figura 34. Andamento del pH nel siero e nella scotta in anaerobiosi. Condizioni di fermentazione: temperatura 40°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

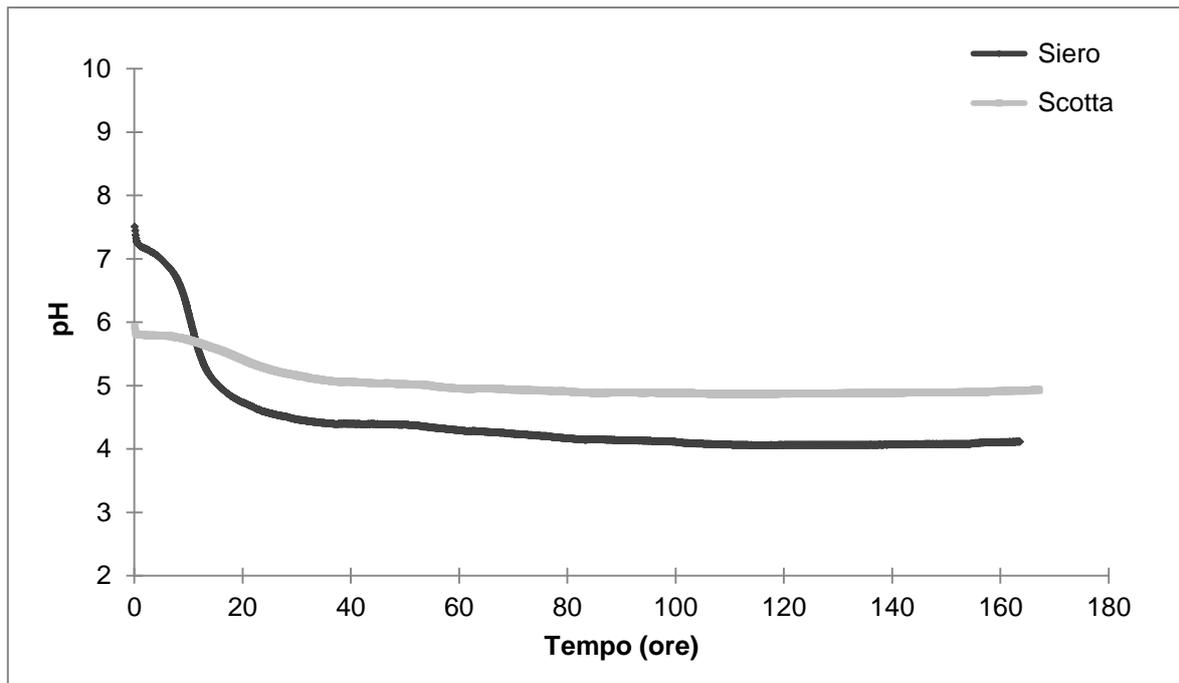


Figura 35. Andamento del pH nel siero e nella scotta in anaerobiosi. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

4.4.4 Concentrazione di ossigeno

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione di ossigeno disciolto a 40°C (Figura 36) si può notare che nel siero, dopo poche ore, viene consumato tutto l'ossigeno di cui era saturata la matrice inizialmente.

Nella scotta, invece, non s'instaura la condizione di anaerobiosi; questo può aver influito sulla mancata produzione di etanolo.

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione di ossigeno disciolto a 28°C (Figura 37) si può notare che entrambe le matrici, siero e scotta, hanno lo stesso comportamento: dopo una decina di ore tutto l'ossigeno di cui era saturata la matrice inizialmente viene consumato.

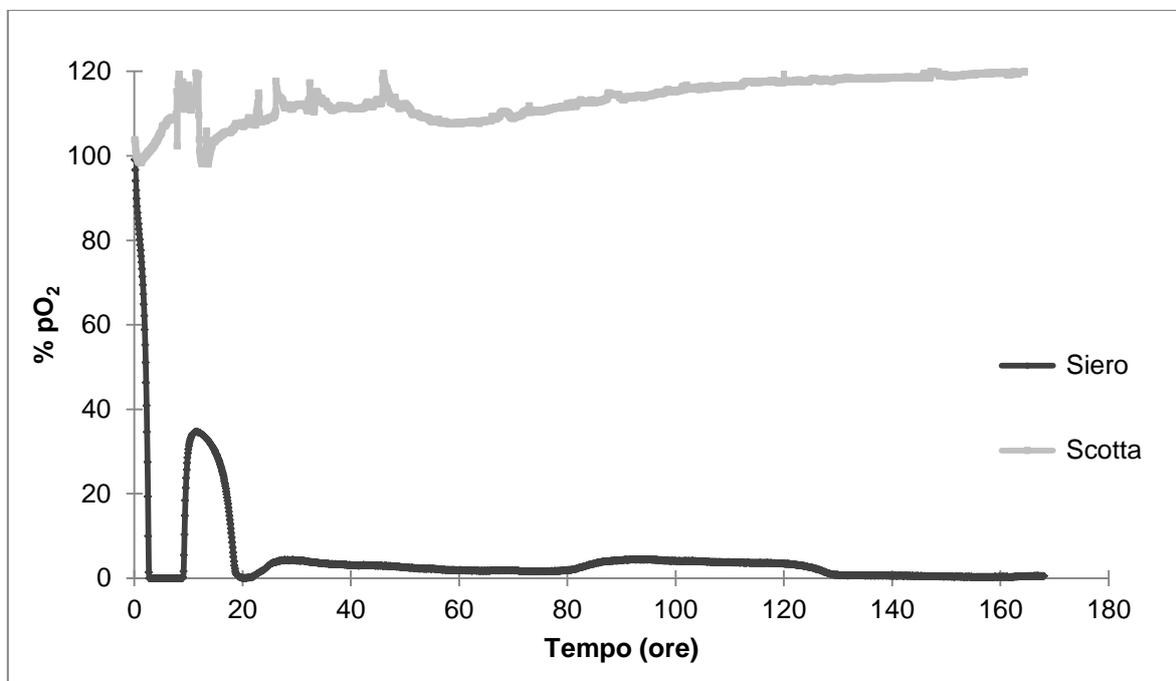


Figura 36. Andamento della concentrazione di ossigeno disciolto nel siero e nella scotta in anaerobiosi. Condizioni di fermentazione: temperatura 40°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml⁻¹.

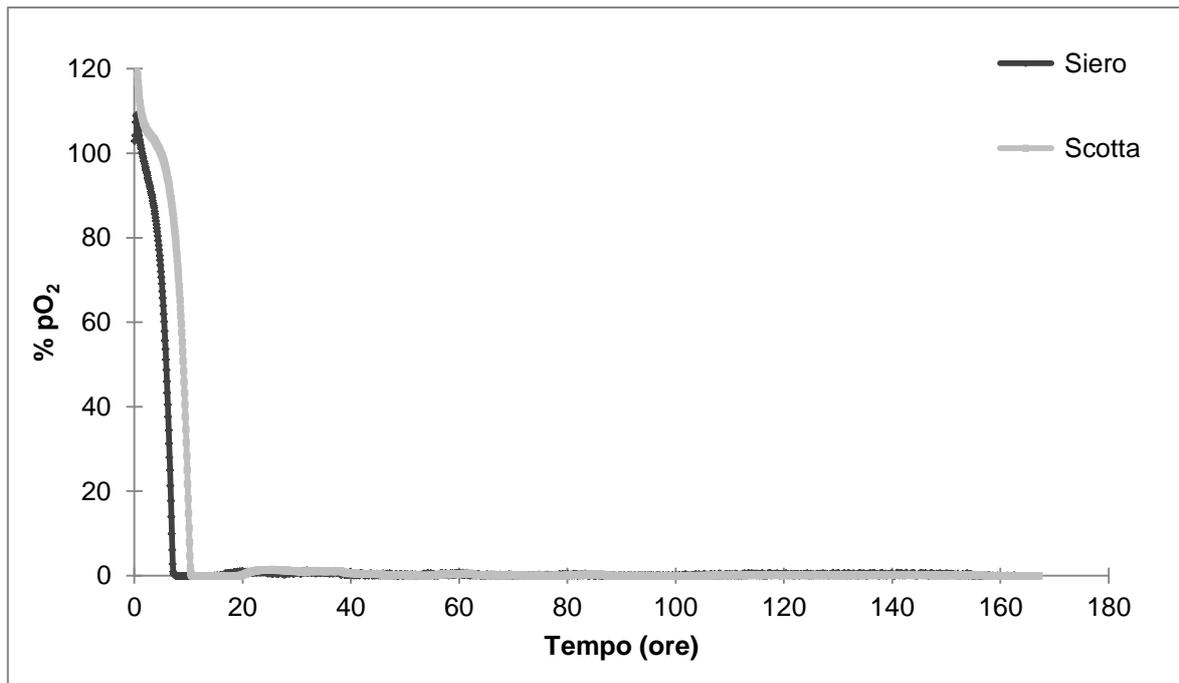


Figura 37. Andamento della concentrazione di ossigeno disciolto nel siero e nella scotta in anaerobiosi. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml⁻¹.

4.4.5 Concentrazioni di lattosio e galattosio e resa in etanolo

In Tabella 11 vengono riportate le concentrazioni di lattosio e di galattosio all'inizio e alla fine della fermentazione e la resa in etanolo con la produzione massima ottenuta di etanolo delle fermentazioni anaerobiche a 40°C e 28°C.

Per quanto riguarda le rese, si evidenzia l'influenza dell'alta temperatura. In particolare, le rese maggiori si sono riscontrate per la scotta a 28°C con un tasso di 0,54, seguite da siero a 28°C e in coda dal siero a 40°C; la scotta a 40°C ha, invece, resa nulla.

La più alta produzione di etanolo è stata rilevata a 28°C per il siero con la concentrazione massima di etanolo di 17,04 g·l⁻¹; a seguire la scotta a 28°C con 15,00 g·l⁻¹.

I residui massimi finali di lattosio sono stati rilevati nella fermentazione anaerobica di scotta; in particolare, i maggiori residui si sono notati a 40°C (28,66 g·l⁻¹), e a seguire a 28°C (11,38 g·l⁻¹). Il lattosio è stato, invece, completamente consumato nel siero a 28°C.

Tracce di galattosio sono state trovate in tutte le fermentazioni, con maggior rilevanza nel siero.

In generale, i residui zuccherini a fine fermentazione sono risultati nettamente maggiori in scotta rispetto al siero.

Tabella 11. Fermentazioni anaerobiche in batch a diverse temperature: resa di etanolo, concentrazione massima di etanolo e concentrazioni all'inizio e alla fine della fermentazione di lattosio e di galattosio.

	Resa ^a	Produzione di etanolo ^b	Lattosio ^c		Galattosio ^c	
			Iniziale	Finale	Iniziale	Finale
Siero 40°C	0,32	14,91	43,68	9,26	15,67	4,23
Scotta 40°C	0,04	0,25	34,62	28,66	0,33	0,23
Siero 28°C	0,37	17,04	43,55	0,00	5,60	3,54
Scotta 28°C	0,54	15,00	39,27	11,38	0,12	0,13

^a resa: massima concentrazione di etanolo / (lattosio + galattosio)_i - (lattosio + galattosio)_f

^b produzione di etanolo: concentrazione massima di etanolo rilevata durante la fermentazione (g·l⁻¹)

^c lattosio e galattosio concentrazione: g·l⁻¹

4.5 Fermentazioni con biomassa inclusa in alginato di calcio

Sono state effettuate fermentazioni con cellule incluse in alginato di calcio, condotte con due differenti tecnologie: in batch e semicontinue. Queste sono state poste a confronto con le fermentazioni condotte in fase dispersa.

4.5.1 Fermentazioni con cellule incluse in alginato: in batch e in semicontinuo

Produzione di etanolo

La prima prova, che è servita come indagine dell'andamento della fermentazione con cellule incluse in alginato, è stata realizzata in batch.

Per quanto riguarda il siero (Figura 38), si può notare una produzione di etanolo già dalle prime ore di fermentazione superando i valori di $13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dopo 48 ore e raggiungendo una produzione massima di etanolo di $14,34 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 90 ore. La concentrazione di etanolo si è mantenuta intorno ai $14 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ per circa 48 ore, per poi diminuire a fine prova.

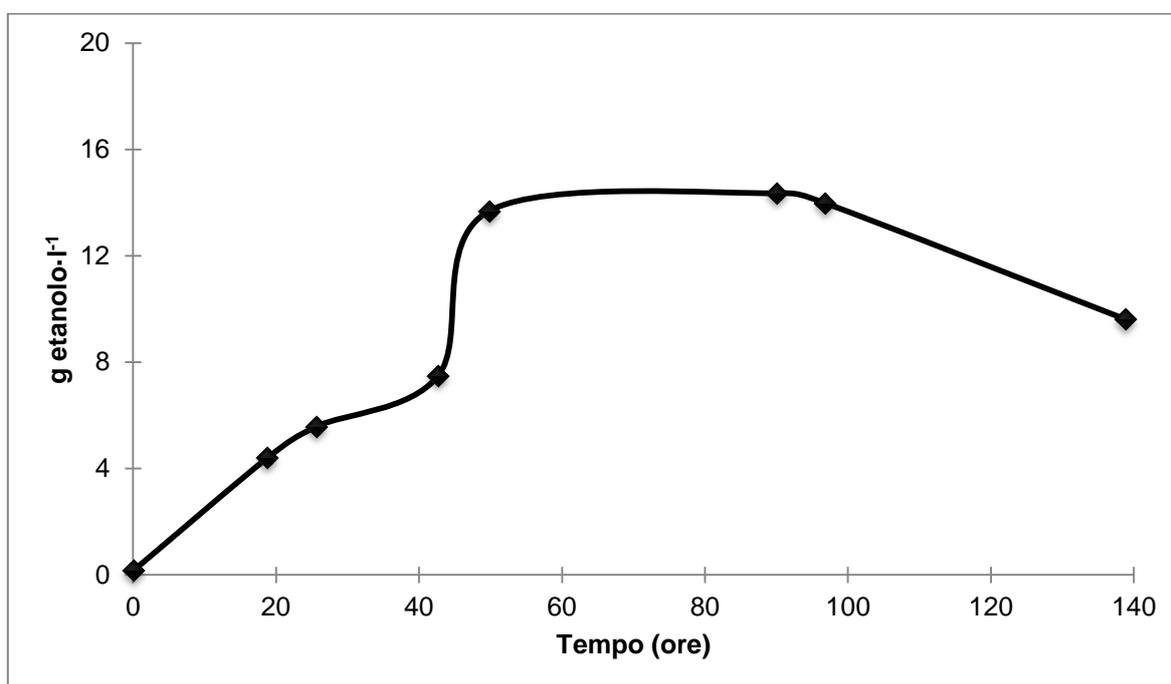


Figura 38. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione in batch con cellule incluse in alginato in siero di latte. Condizioni di fermentazione: temperatura ambiente, ricircolo esterno *bottom-up* del medium in continuo.

Per quanto riguarda la scotta (Figura 39), si può notare anche in questo caso, come nel siero, una produzione di etanolo già dalle prime ore di fermentazione, raggiungendo una produzione massima di etanolo di $11,57 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ottenuta alla 48^{ma} ora. A seguito di questo picco, la concentrazione di etanolo diminuisce.

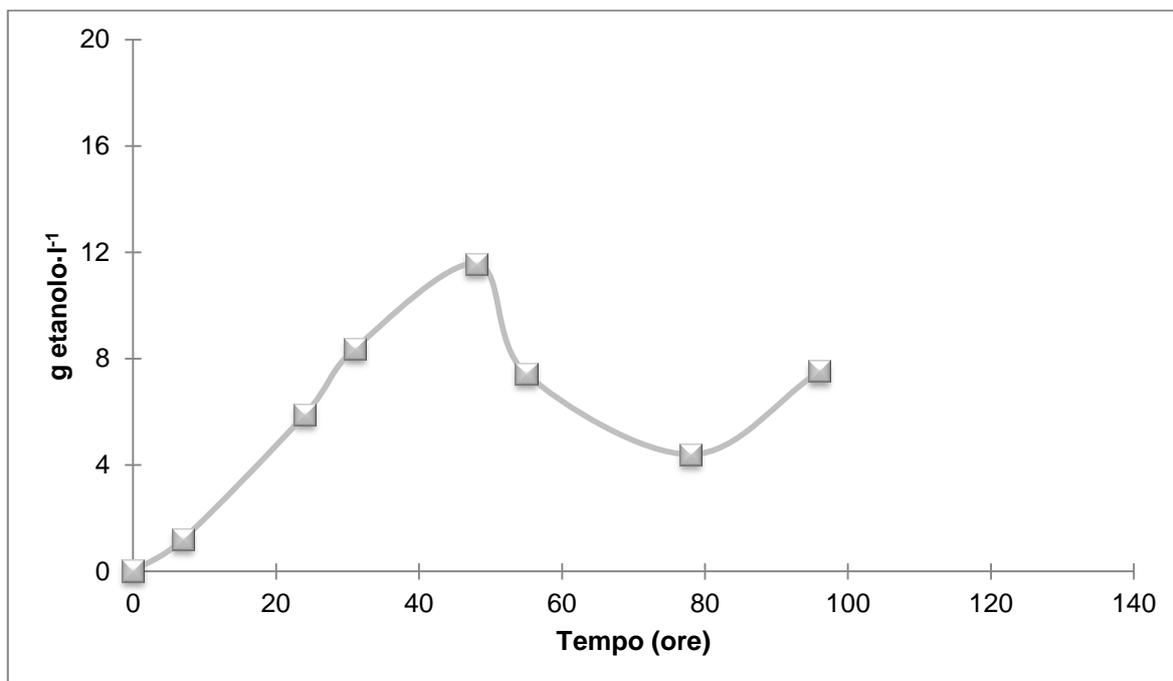


Figura 39. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione in batch con cellule incluse in alginato in scotta. Condizioni di fermentazione: temperatura ambiente, ricircolo esterno *bottom-up* del medium in continuo.

Per quanto riguarda le fermentazioni semicontinue, si può notare che esse hanno dato luogo ad un aumento della produzione di etanolo rispetto alle fermentazioni in batch e alle fermentazioni in fase dispersa, sia in siero che in scotta (Figura 40 e Figura 41).

Nella matrice siero (Figura 40) la produzione di etanolo inizia già nelle prime ore e si raggiungono produzioni di etanolo molto elevate, raggiungendo valori maggiori di $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dopo i primi tre giorni. In seguito la produzione tende ad essere stazionaria, per poi aumentare nuovamente dopo l'immissione di nuova matrice. A fine fermentazione, dalla 383^{ma} ora, si raggiungono le concentrazioni massime superiori a $19 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

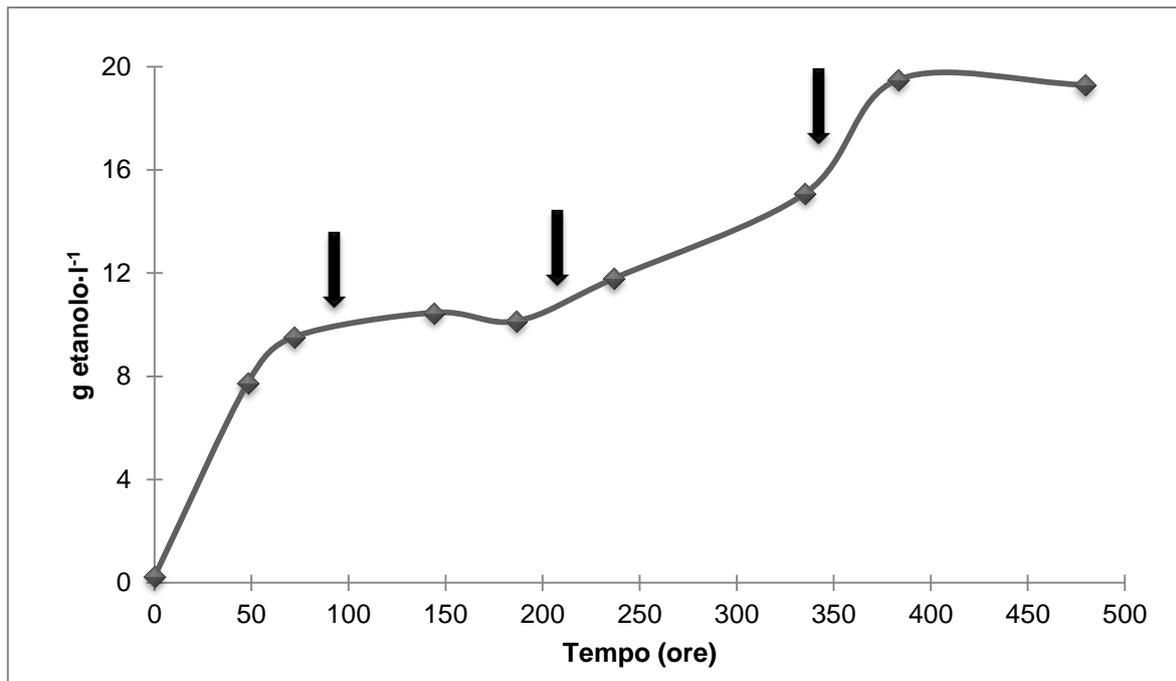


Figura 40. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione semicontinua con cellule incluse in siero di latte. Condizioni di fermentazione: temperatura ambiente, ricircolo esterno *bottom-up* del medium in continuo.

Anche nella matrice scotta (Figura 41) la produzione di etanolo inizia già nelle prime ore e si raggiungono produzioni di etanolo molto elevate, raggiungendo valori maggiori di $9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ dopo i primi due giorni. La produzione di etanolo è seguita anche in questo caso da un rallentamento della stessa fino ad un decremento, compensato dall'aggiunta di substrato fresco che ha portato la produzione di etanolo a valori maggiori di $14 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; tali valori vengono mantenuti costanti per circa tre giorni, per poi a fine fermentazione ridursi leggermente.

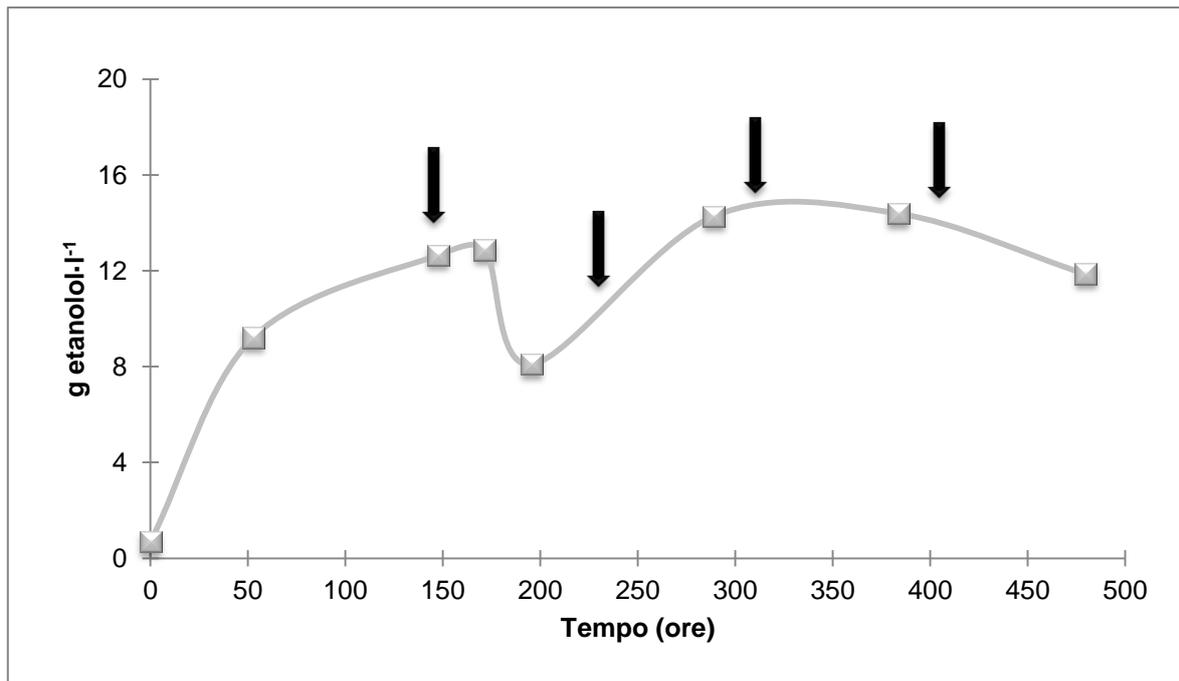


Figura 41. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione semicontinua con cellule incluse in alginato in scotta. Condizioni di fermentazione: temperatura ambiente, ricircolo esterno *bottom-up* del medium in continuo.

Il processo in semicontinuo che aggiunge matrice fresca, e perciò nuovi nutrienti e nuovi zuccheri, ha permesso di ottenere migliori risultati rispetto alla fermentazione in batch.

Concentrazioni di lattosio e galattosio e resa in etanolo

In Tabella 12 vengono riportate le concentrazioni di lattosio e di galattosio all'inizio e alla fine della fermentazione e la resa in etanolo con la produzione massima ottenuta nelle fermentazioni con cellule incluse in alginato di calcio sia in batch che in semicontinuo.

Le rese migliori sono quelle che hanno come matrice il siero con una resa di 0,46, mentre in scotta la resa migliore si ha nelle fermentazioni semicontinue, con una resa di 0,36.

La più alta produzione di etanolo è stata rilevata nel siero con fermentazione semicontinua, con una concentrazione massima di etanolo che è stata di 19,50 g•l⁻¹, a seguire la scotta in fermentazione semicontinua con 14,39 g•l⁻¹ di etanolo.

I residui zuccherini finali sono, in tutte e quattro le fermentazioni, quasi nulli.

Tabella 12. Fermentazioni con cellule incluse in alginato di calcio: resa, concentrazione massima di etanolo e concentrazioni all'inizio e alla fine della fermentazione di lattosio e di galattosio.

	Resa ^a	Produzione di etanolo ^b	Lattosio ^c		Galattosio ^c	
			Iniziale	Finale	Iniziale	Finale
Siero con cellule incluse, fermentazione in batch	0,46	14,36	25,90	0,09	5,60	0,02
Scotta con cellule incluse, fermentazione in batch	0,30	11,58	39,24	0,05	0,08	0,01
Siero con cellule incluse, fermentazione semicontinua	0,46	19,50	42,38	0,53	0,42	0,00
Scotta con cellule incluse, fermentazione semicontinua	0,36	14,39	40,38	0,02	0,22	0,00

^a resa: massima concentrazione di etanolo / (lattosio + galattosio)_i - (lattosio + galattosio)_f

^b produzione di etanolo: concentrazione massima di etanolo rilevata durante la fermentazione (g•l⁻¹)

^c lattosio e galattosio concentrazione: g•l⁻¹

4.5.2 Fermentazioni semicontinue: con cellule incluse in alginato e in fase dispersa

Le fermentazioni semicontinue con cellule incluse in alginato di calcio sono state confrontate con fermentazioni semicontinue in fase dispersa.

Produzione di etanolo

Nella fermentazione in fase dispersa della matrice siero (Figura 42) la produzione di etanolo inizia già nelle prime ore e si raggiungono valori molto elevati, maggiori a $11 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dopo i primi due giorni. In seguito la produzione tende ad aumentare più lentamente per raggiungere dopo 10 giorni valori superiori a $18 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La produzione massima si raggiunge dopo il 13^{mo} giorno (330 ore) con $19,32 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, dopo di che segue una fase caratterizzata da un calo; dopo l'immissione di matrice fresca si ha nuovamente un aumento della produzione di etanolo tornando a valori poco superiori a $18 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

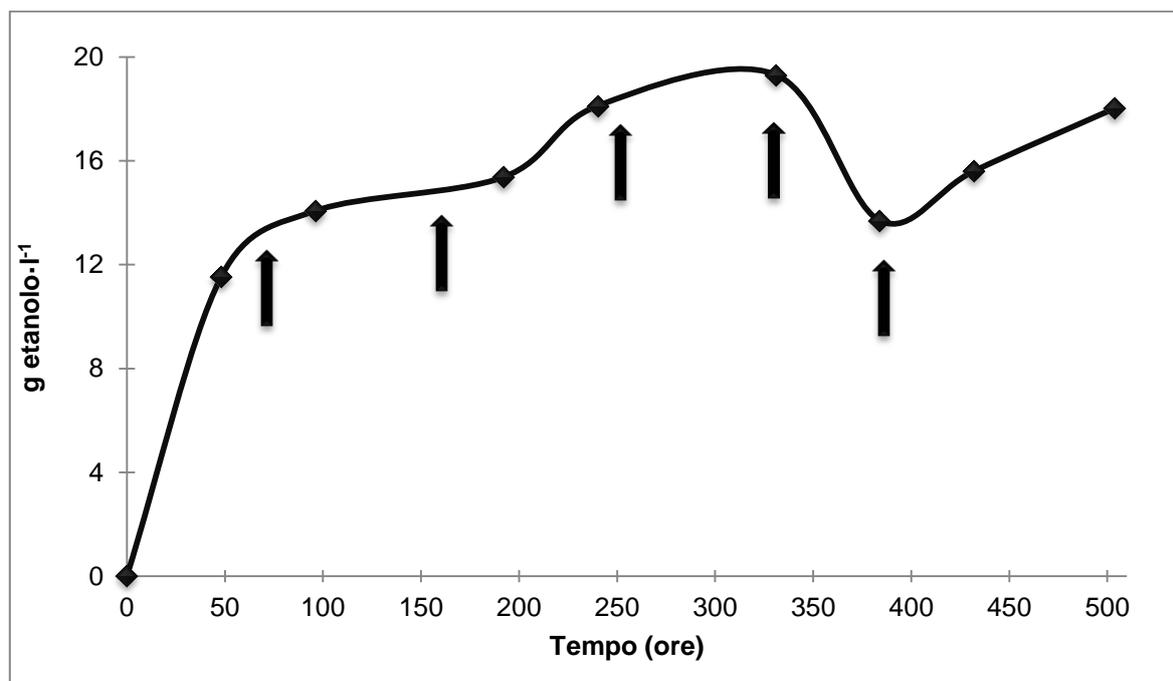


Figura 42. Produzione di etanolo nella fermentazione semicontinue in fase dispersa con siero di latte. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1\cdot 10^8$ cellule·ml⁻¹.

Nella matrice scotta (Figura 43) la produzione di etanolo ha una fase di latenza di circa 48 ore, dopo la quale s'inizia a produrre una notevole quantità di etanolo, superiore a $17 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dopo tre giorni.

La curva di produzione di etanolo presenta un andamento che si ripete: dopo una fase intorno a valori tra i 18 e 19 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, il contenuto di etanolo diminuisce fino a 14-15 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Questo comportamento si ripete per tre volte.

Risultati

Il valore massimo di etanolo prodotto è $19,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ottenuti al 17^{mo} giorno (406 ore) di fermentazione.

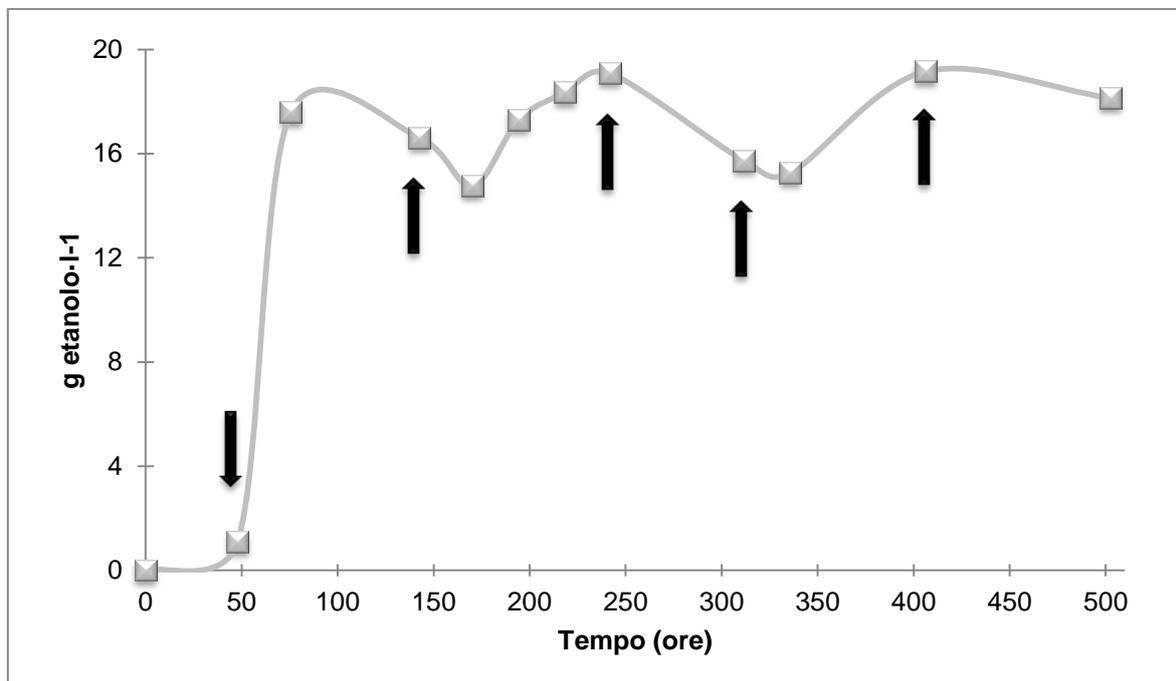


Figura 43. Produzione di etanolo nella fermentazione semicontinua in fase dispersa con scotta. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C , agitazione 400 rpm, inoculo $1\cdot 10^8$ cellule·ml⁻¹.

In generale, per quanto riguarda le fermentazioni semicontinue in fase dispersa si può notare che hanno dato luogo a produzioni di etanolo simili alle fermentazioni con cellule incluse, in special modo per quanto riguarda il siero, e con un aumento per la scotta.

Curva di crescita del lievito

Nelle fermentazioni anaerobiche semicontinue in fase dispersa (Figura 44), l'andamento della concentrazione è pressoché uguale in entrambe le matrici e ricalca quanto ottenuto nella fermentazione anaerobica in batch a 28°C.

Nel siero, la concentrazione cellulare rimane sempre sopra valori di $1,29 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$, con un valore massimo di $2,08 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$ dopo quattro giorni.

Nella scotta si ha un andamento simile al siero, ma con valori superiori; infatti, supera le $2 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$ per quasi tutta la fermentazione raggiungendo un massimo di $3,81 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$ a fine fermentazione.

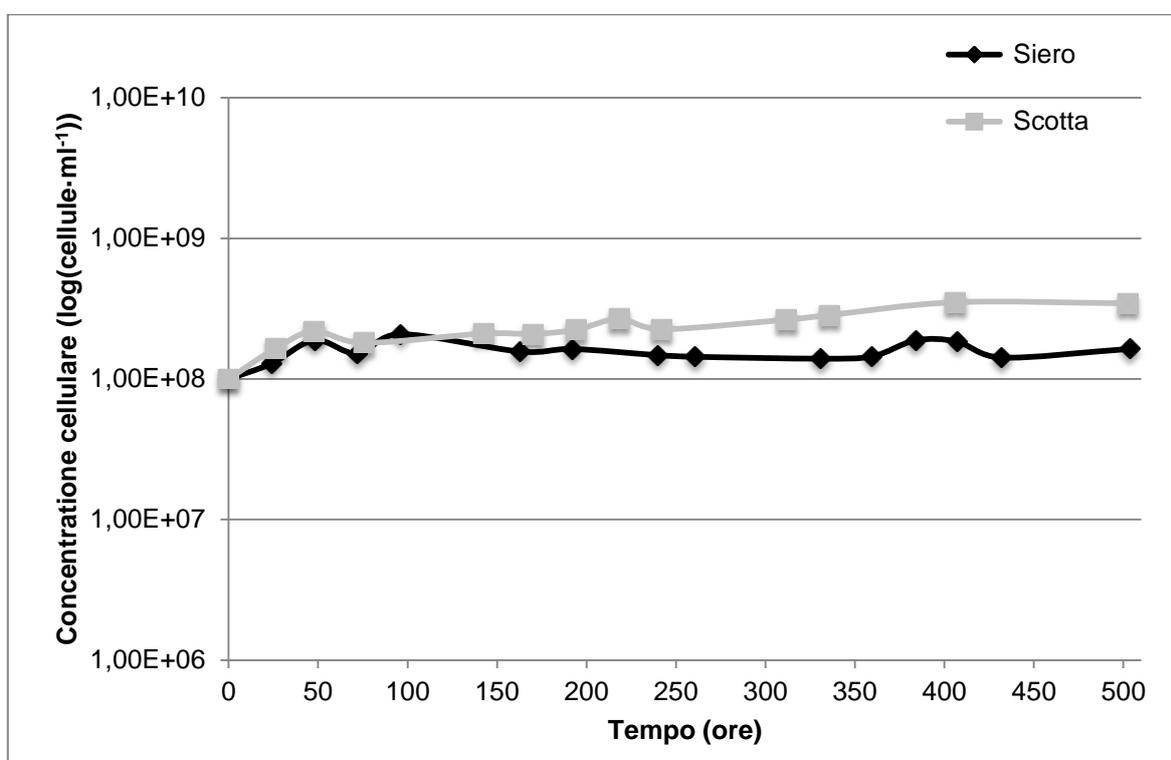


Figura 44. Concentrazione cellulare nella fermentazione anaerobica semicontinue in fase dispersa di siero e di scotta. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

Andamento del pH

Per quanto riguarda l'andamento del pH nelle fermentazioni di siero e scotta, si può notare un andamento similare (Figura 45).

Nelle fermentazioni del siero si parte da pH intorno a 6,5 e arriva a pH 4 fino al momento del primo prelievo e a seguito dell'aggiunta di substrato fresco il pH tende leggermente ad innalzarsi. Dall'andamento del pH si possono vedere distintamente i momenti di prelievo e d'immissione di nuova matrice contraddistinti da dei piccoli picchi.

La scotta parte da pH 5,3 per poi rimanere costante per tutta la durata della fermentazione a pH 4,5. Anche in questo caso risultano essere ben visibili i momenti di prelievo contraddistinti da picchi di ridotte dimensioni.

L'andamento del pH del siero e della scotta nella prima fase, prima del primo prelievo è pressoché identico a quello riscontrato in precedenza nelle fermentazioni del siero a 40°C.

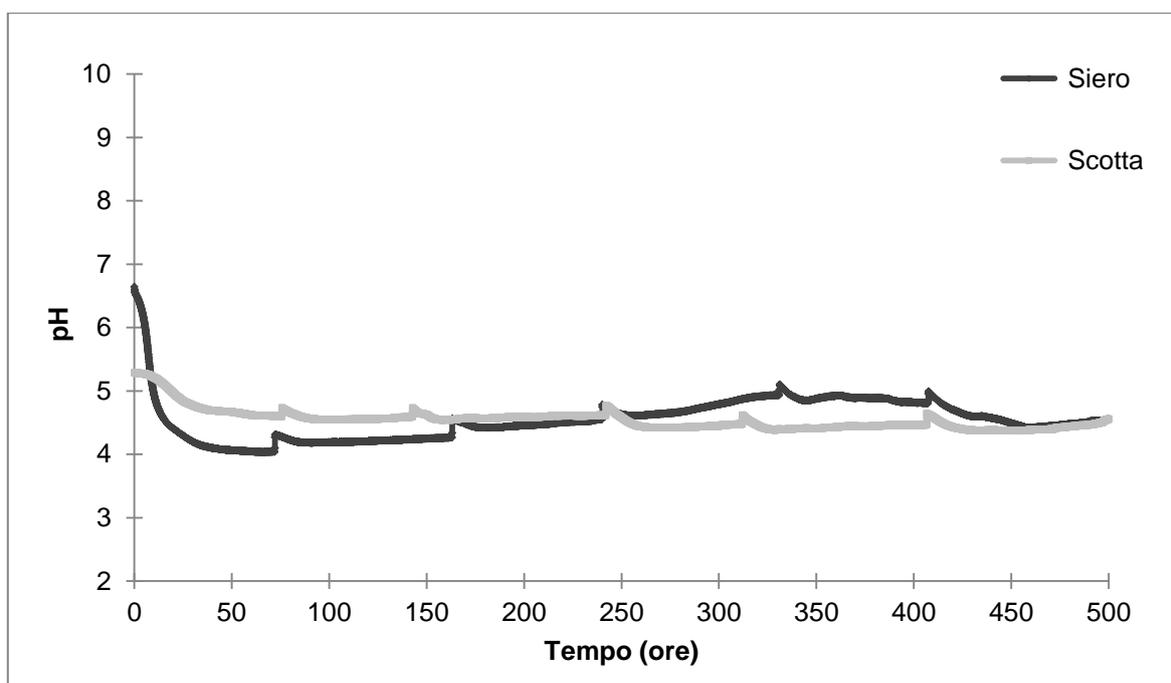


Figura 45. Andamento del pH nel siero e nella scotta in fermentazioni anaerobiche semicontinue in fase dispersa. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

Concentrazione di ossigeno

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione di ossigeno disciolto (Figura 46), si può notare che nel siero, dopo circa dieci ore, tutto l'ossigeno di cui era satura la matrice inizialmente viene consumato. Stesso andamento si riscontra nella scotta.

Perciò, per quanto riguarda il consumo di ossigeno si può riscontrare un comportamento simile alle matrici in anaerobiosi a 37°C (Figura 29), a 28°C e il siero a 40°C, con una riduzione quasi totale dell'ossigeno presente nelle matrici, dopo le prime dieci ore, nonostante l'insufflazione costante di aria sterile.

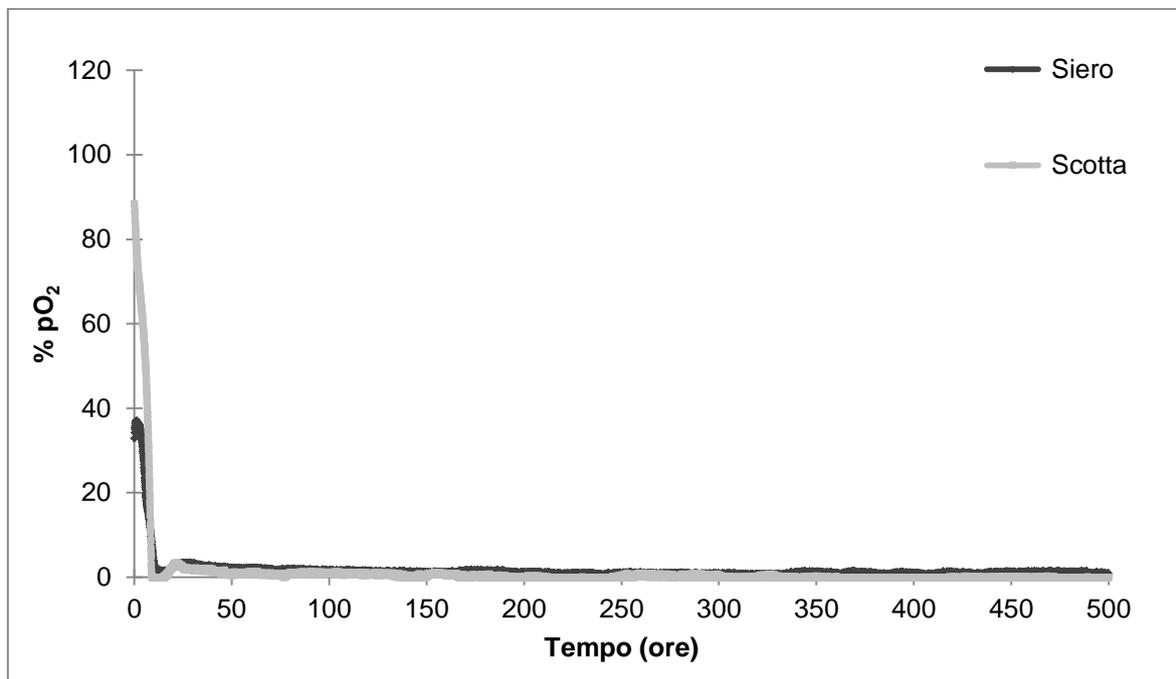


Figura 46. Andamento della concentrazione di ossigeno disciolto nel siero e nella scotta in fermentazioni anaerobiche semicontinue in fase dispersa. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml⁻¹.

Concentrazioni di lattosio e galattosio e resa in etanolo

In Figura 47 si può notare il consumo del lattosio presente nel siero e nella scotta nel corso della fermentazione.

In entrambe le fermentazioni dopo due giorni il lattosio viene tutto consumato e se ne rilevano solo tracce durante la restante parte della fermentazione.

Nel siero si parte da una concentrazione iniziale di lattosio di $42,38 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ e dopo un giorno viene praticamente dimezzata e continua dimezzarsi il giorno seguente. Nella scotta, invece, si parte da una concentrazione iniziale di lattosio leggermente inferiore rispetto al siero, di $40,38 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, e dopo un giorno la concentrazione scende a $34,04 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; il giorno seguente si riduce ulteriormente intorno ai $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

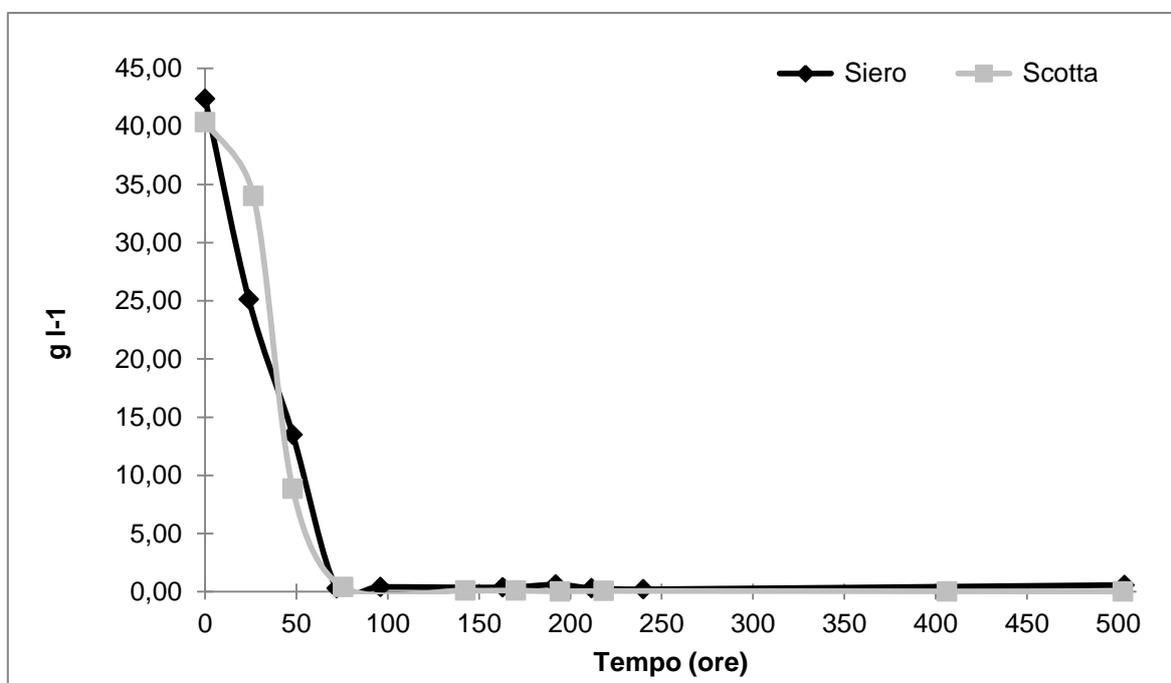


Figura 47. Andamento della concentrazione di lattosio nelle fermentazioni siero e scotta semicontinue in fase dispersa. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1\cdot 10^8$ cellule·ml⁻¹.

In Tabella 13 vengono messe a confronto le concentrazioni di lattosio e di galattosio all'inizio e alla fine della fermentazione e la produzione massima ottenuta di etanolo delle fermentazioni semicontinue in fase dispersa e delle fermentazioni semicontinue con cellule incluse in alginato di calcio.

Tabella 13. Fermentazioni semicontinue: concentrazione massima di etanolo e concentrazioni all'inizio e alla fine della fermentazione di lattosio e di galattosio.

	Produzione di etanolo ^a	Lattosio ^b		Galattosio ^b	
		Iniziale	Finale	Iniziale	Iniziale
Siero in fase dispersa	19,32	42,38	0,58	0,75	0,00
Scotta in fase dispersa	19,15	40,38	0,01	0,33	0,02
Siero con cellule incluse	19,50	42,38	0,53	0,42	0,00
Scotta con cellule incluse	14,39	40,38	0,02	0,22	0,00

^a produzione di etanolo: concentrazione massima di etanolo rilevata durante la fermentazione ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

^b lattosio e galattosio concentrazione: $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

La concentrazione massima di etanolo è stata di $19,50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, riscontrata nella fermentazione anaerobica semicontinua di siero di latte con cellule incluse in alginato; concentrazioni molto elevate di etanolo sono state raggiunte anche in fermentazioni semicontinue in fase dispersa in siero ($19,32 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) e in scotta ($19,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

I residui zuccherini finali sono consumati interamente in tutte e quattro le fermentazioni.

4.6 Produzione di etanolo su refluo da produzione di PHA

Per indagare ulteriormente le potenzialità del lievito *K. marxianus*, e per approfondire la valorizzazione degli scarti sfruttando al massimo il potenziale delle matrici, si è proceduto fermentando la scotta derivante da una precedente fermentazione, operata da un consorzio batterico per la produzione di poliidrossialcanoati (PHA).

4.6.1 Caratterizzazione iniziale della matrice

La matrice, in questa fermentazione, presenta un forte depauperamento sia di lattosio che di galattosio già all'inizio del processo, in quanto queste sostanze sono già state utilizzate da un consorzio batterico nel precedente processo. Pertanto, si riscontrano valori di lattosio corrispondenti a $0,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ e nessuna traccia di galattosio.

4.6.2 Produzione di etanolo

Nella fermentazione anaerobica di scotta, proveniente dalla fermentazione per la produzione di PHA, la produzione di etanolo è inizialmente lenta, raggiungendo un valore massimo, osservato alla fine della fermentazione, di $7,00 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 48).

La produzione, seppur limitata, e considerando la povertà della matrice in lattosio, risulta di un certo interesse.

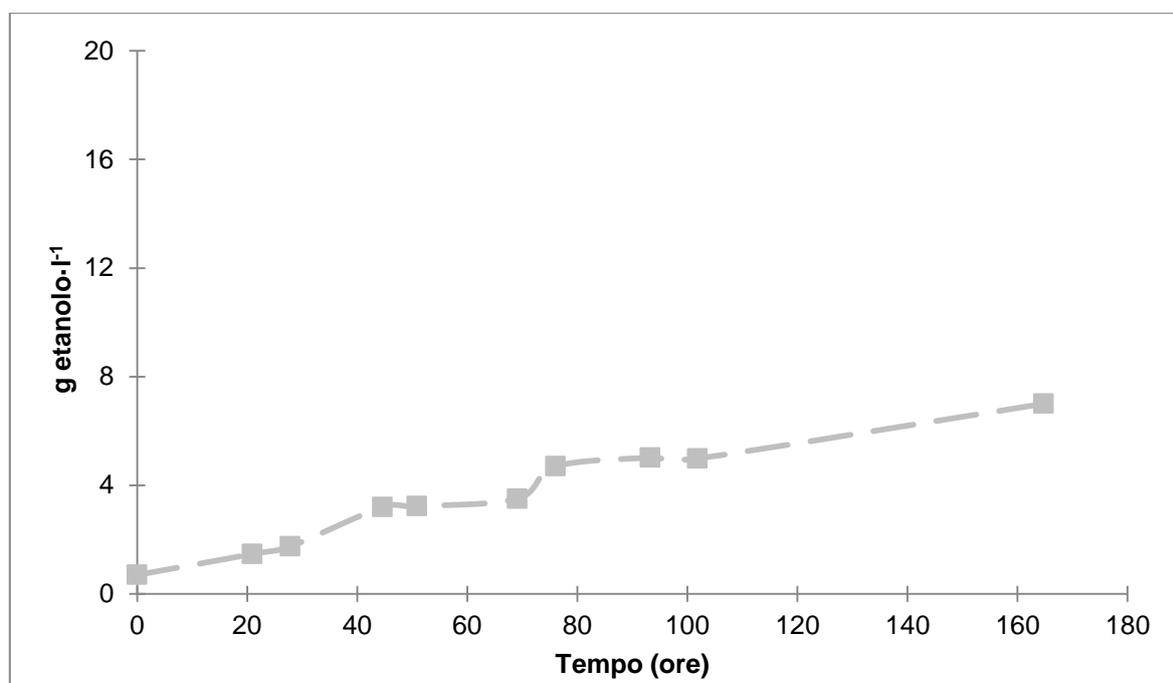


Figura 48. Andamento della produzione di etanolo nella fermentazione anaerobica di scotta proveniente dalla fermentazione per la produzione di PHA. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C , agitazione 400 rpm , inoculo $1\cdot 10^8 \text{ cellule}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.6.3 Curva di crescita del lievito

Nella fermentazione anaerobica di scotta proveniente dal processo per la produzione di PHA la concentrazione cellulare (Figura 49) risulta essere inibita nella prima fase della fermentazione, anche se l'inoculo di partenza era $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$, probabilmente dovuta alla presenza di residui del consorzio batterico. All'incirca al terzo giorno si è osservata una crescita, dopodiché la coltura sembra andare in fase di senescenza raggiungendo valori inferiori a $1 \cdot 10^7$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

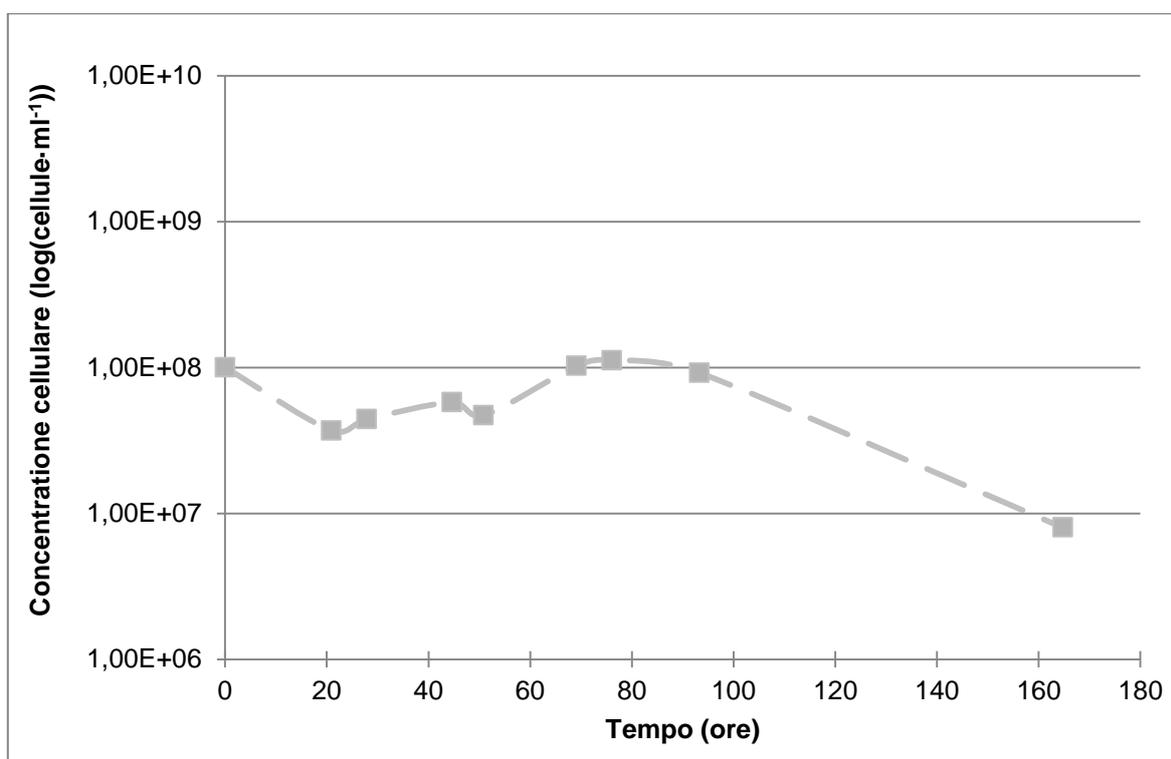


Figura 49. Concentrazione cellulare del lievito *K. marxianus* nella fermentazione anaerobica di scotta proveniente dalla fermentazione per la produzione di PHA. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

4.6.4 Andamento del pH e del consumo di ossigeno

Per quanto riguarda l'andamento del **pH**, si può notare come l'andamento sia costante durante tutta la fermentazione, rimanendo intorno ad un valore di pH pari ad 8 (Figura 50). Il valore di pH di partenza risulta essere più alto rispetto al pH riscontrato nella scotta utilizzata fino a questo momento, in quanto durante la fermentazione per la produzione di PHA il pH viene controllato a valore 7.

Per quanto riguarda, invece, l'andamento del consumo di **ossigeno** disciolto (Figura 50) si riscontra un comportamento simile a quanto notato nelle fermentazioni anaerobiche. Si può, infatti, osservare che dopo meno di una decina di ore, tutto l'ossigeno di cui era saturata la matrice viene consumato.

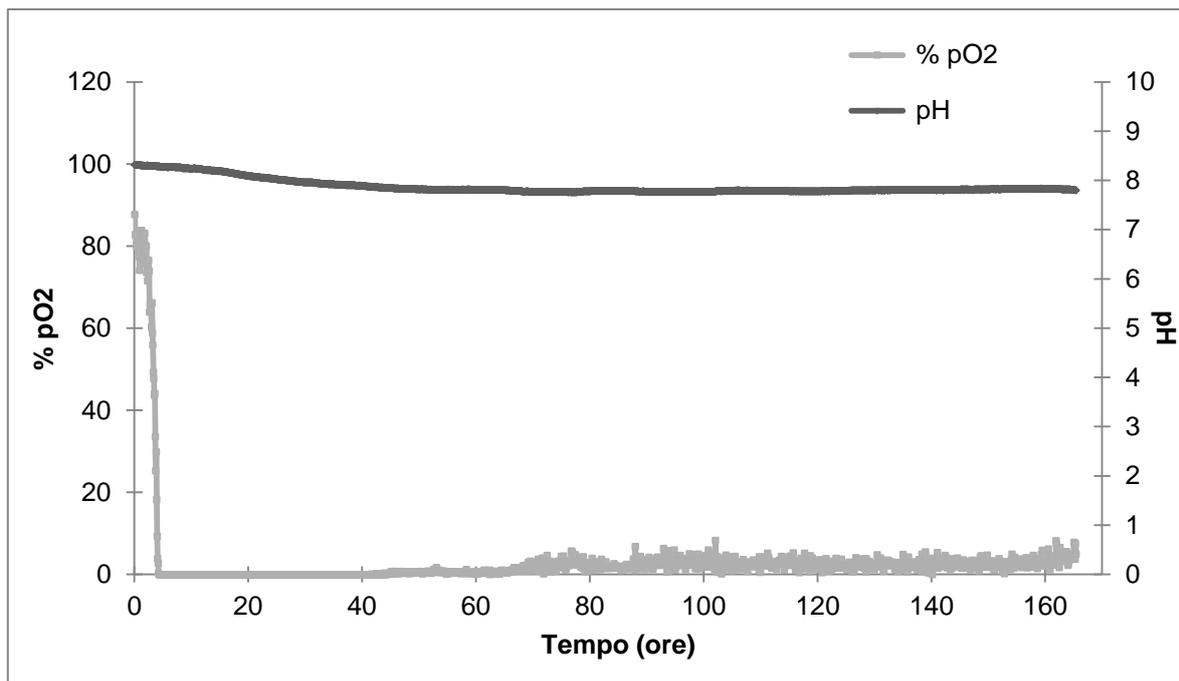


Figura 50. Andamento del pH e della concentrazione di ossigeno disciolto nella fermentazione anaerobica di scotta proveniente dalla fermentazione per la produzione di PHA. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1 \cdot 10^8$ cellule \cdot ml $^{-1}$.

4.6.5 Concentrazioni di lattosio e galattosio

La scotta proveniente dalla fermentazione per la produzione di PHA risulta essere molto diversa dalla scotta normalmente utilizzata; infatti, il lattosio presente è stato già utilizzato dal consorzio batterico della precedente fermentazione. Durante tutto il processo, il valore di lattosio rimane costante e pressoché nullo: $0,10 \pm 0,04 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 51). Situazione simile per il galattosio con un contenuto medio di $0,01 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Esauriti perciò il lattosio e il galattosio dalla precedente fermentazione, si presuppone che rimangano, invece un gran numero di acidi organici come acido lattico e acido acetico e in misura minore acido propionico e acido butirrico.

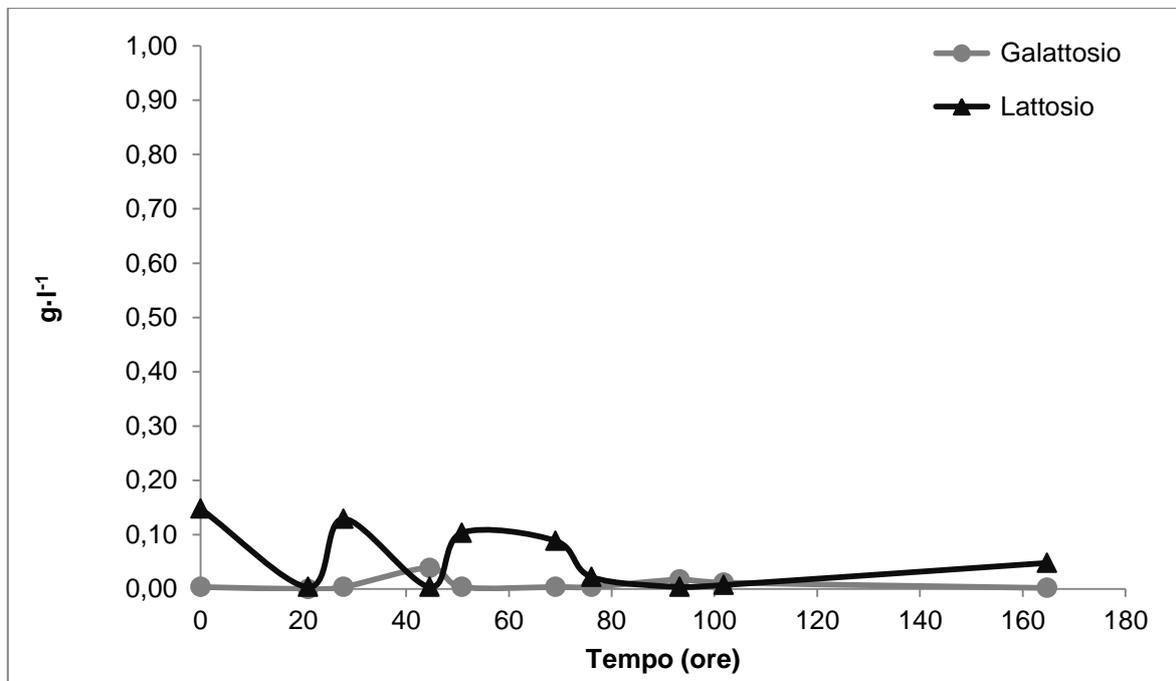


Figura 51. Andamento della concentrazione di lattosio e galattosio durante tutta la fermentazione anaerobica di scotta proveniente dalla fermentazione per la produzione di PHA. Condizioni di fermentazione: temperatura 28°C, agitazione 400 rpm, inoculo $1\cdot 10^8$ cellule·ml⁻¹.

5. Discussione

5.1 Fermentazione di siero e scotta

Mentre le problematiche relative all'utilizzo del siero di latte sono state ampiamente trattate in letteratura (Grba *et al.*, 2002), al contrario, la scotta non trova molti riscontri. È, tuttavia, noto che la scotta può essere considerata un substrato di crescita povero per le biomasse microbiche, in quanto pressoché priva di fonti di azoto, anche se ancora discretamente ricca in zuccheri ed acidi organici. Per questo motivo nel presente lavoro sono stati utilizzati come substrati il siero, la scotta ed una miscela di scotta e siero; quest'ultima con l'obiettivo di valutare la possibilità di migliorare la fermentescibilità della scotta senza usare materiali che incrementassero i costi del processo, ma lo stesso siero che è prodotto nei caseifici simultaneamente alla scotta e costituisce uno scarto da smaltire ancora dotato di fonti di azoto.

Oltre a questi substrati, è stato preso in considerazione anche un altro effluente con caratteristiche simili alla scotta: il siero deproteinato.

In generale, gli andamenti delle fermentazioni aerobiche, hanno evidenziato un picco nella produzione di etanolo nelle prime 30-50 ore (Figura 22), e un successivo graduale esaurimento, probabilmente indotto dal metabolismo ossidativo a carico dell'etanolo.

Confrontando le curve di produzione di etanolo con l'andamento dell'ossigeno disciolto nella matrice (Figura 25), si può notare che il momento in cui la fermentazione diventa anaerobica corrisponde in termini di tempo al periodo in cui avviene il processo che conduce alla produzione di etanolo. Il lievito passa, quindi, da un metabolismo respiratorio ad un metabolismo di tipo fermentativo e, in tale fase, un maggior consumo di ossigeno corrisponde una maggiore produzione di etanolo. La continua insufflazione di aria, all'interno delle matrici di fermentazione, conduce al ristabilirsi delle condizioni di aerobiosi e all'ossidazione da parte del lievito dell'etanolo prodotto.

Si può anche osservare che nel siero e nella miscela, la fase di maggiore produzione di etanolo corrisponde alla fase di maggiore velocità di crescita della biomassa e successivamente la biomassa continua a crescere, ma più lentamente (Figura 23).

Nella scotta la massima produzione di etanolo avviene in un punto medio della fase di massima crescita della biomassa. Successivamente la biomassa continua a crescere, ma senza produzione di etanolo. A questo punto il lievito probabilmente utilizza gli zuccheri residui per la produzione di biomassa piuttosto che per la produzione di etanolo. Tale andamento potrebbe essere riconducibile allo scarso contenuto in proteine, e quindi in azoto assimilabile, della scotta. La disponibilità di azoto interviene sulla cinetica di trasporto degli zuccheri durante la fermentazione in quanto consente il continuo rinnovo del "pool" di proteine enzimatiche e dei vettori

transmembranici (Salmon, 1989). Quando si presenta la carenza di azoto, la produzione di etanolo può, quindi, arrestarsi. La scotta risulta essere di poco sostegno alla produzione di bioetanolo e sembra non essere adatta come mezzo di crescita per la produzione di bioetanolo dalla fermentazione aerobica.

5.2 Disponibilità di ossigeno: fermentazioni in aerobiosi e anaerobiosi

L'apporto del fattore **ossigeno** gioca un ruolo di fondamentale importanza e pertanto è stato necessario indagare il comportamento del lievito sia in aerobiosi che in anaerobiosi, in quanto *K. marxianus* non può crescere in condizioni rigorosamente anaerobiche, ma la formazione di etanolo è legata quasi esclusivamente alla limitazione dell'ossigeno (Fonseca *et al.*, 2008).

Durante la fermentazione in aerobiosi, nonostante l'insufflazione di aria con flusso costante pari a $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, si nota una riduzione dell'ossigeno disciolto che arriva quasi a zero, per poi ritornare, a fine processo, ad una concentrazione intorno all'80-100%; la fase di anaerobiosi corrisponde al periodo di produzione di etanolo (Figura 25 e Figura 22).

Nelle fermentazioni aerobiche di siero di latte, di scotta e della miscela di scotta e siero (1:1) la moltiplicazione cellulare è stata fortemente stimolata (Figura 23) e gli zuccheri presenti sono stati quasi completamente esauriti (Figura 52) per produrre biomassa, mentre la produzione di etanolo risulta molto bassa (Tabella 10).

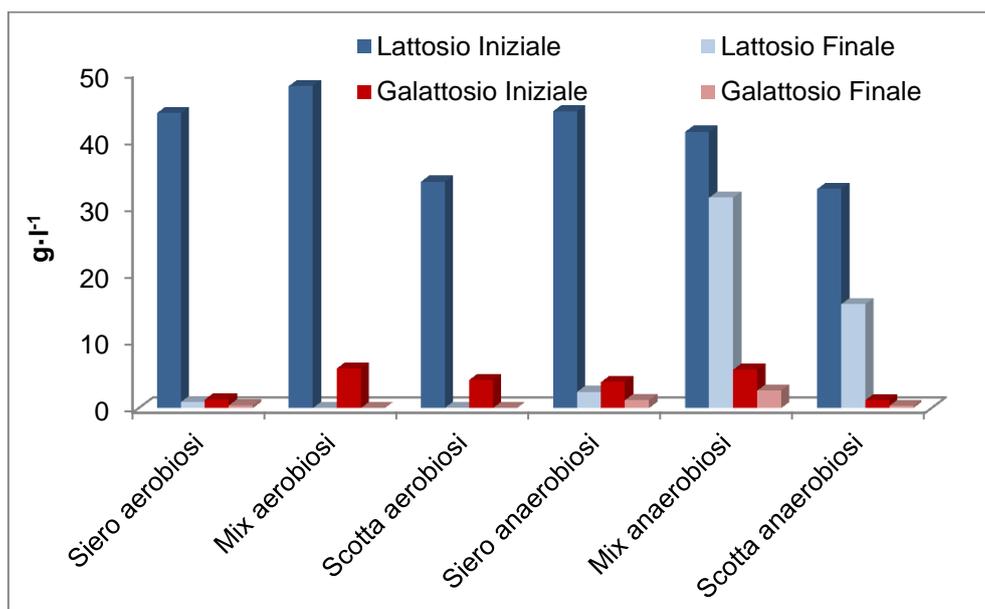


Figura 52. Fermentazioni aerobiche e anaerobiche effettuate a 37°C: concentrazioni iniziali e finali di lattosio e galattosio.

Inoltre, l'etanolo prodotto al termine della fase logaritmica di crescita è scomparso durante la fase stazionaria, probabilmente a causa del metabolismo ossidativo. Ciò significa che non è stato possibile conciliare una buona resa di etanolo con condizioni fisiologiche ottimali per la crescita cellulare.

Per quanto riguarda l'anaerobiosi si è notato che tutto l'ossigeno di cui era stata saturata la matrice

inizialmente viene consumato totalmente tra le 10 e le 40 ore (Figura 29). Gli andamenti delle fermentazioni nelle prove condotte in anaerobiosi sono risultati diversi rispetto alle prove condotte in aerobiosi. In tali condizioni non si osserva alcuna diminuzione della concentrazione di etanolo successiva al punto di massimo tasso di produzione: la concentrazione di etanolo rimane in lieve aumento fino alla fine della fermentazione. Si è anche osservato che l'andamento della curva di formazione di etanolo è simile in siero e in scotta, e che le concentrazioni di etanolo prodotte sono molto superiori rispetto all'aerobiosi. La miscela di scotta e siero invece ha prodotto quantità esigue di etanolo e la causa di tale comportamento non è ancora stata identificata.

La curva di crescita di *K. marxianus* nel siero in anaerobiosi è stata a doppio sigmoide (Figura 27), probabilmente indice di un adattamento metabolico all'instaurarsi delle condizioni di anaerobiosi, in cui il secondo plateau corrispondeva, in termini di concentrazione cellulare, a quello raggiunto in aerobiosi.

Le fermentazioni anaerobiche hanno, perciò, evidenziato una minore propensione alla crescita cellulare rispetto alle fermentazioni aerobiche in cui, dopo una breve fase esponenziale, si raggiungeva una concentrazione cellulare di circa $1 \cdot 10^9$ cellule ml^{-1} in fase stazionaria in tutti i substrati di fermentazione.

Nel siero di latte, tuttavia, la crescita ha dimostrato di non essere compromessa dall'anaerobiosi, forse grazie alle buone caratteristiche nutrizionali di questo tipo di reflui per la moltiplicazione delle cellule di lievito. La crescita del lievito in scotta in condizioni aerobiche è stata inferiore, così come la concentrazione di etanolo, a conferma dell'ipotesi che la scotta è un substrato di crescita povero, non ottimale per sostenere la moltiplicazione cellulare.

Le massime rese e le più alte concentrazioni in etanolo sono state ottenute con le fermentazioni anaerobiche di siero e di scotta (Tabella 10). La migliore resa pari a 0,54 si ottiene con la scotta, praticamente il valore teorico (Ozmihici e Kargi, 2007; Kargi e Ozmihici, 2006), seguita dal siero con un valore di 0,36.

È noto che la disponibilità di ossigeno è necessaria per la biosintesi di varie molecole, quali acidi grassi insaturi, steroli e amminoacidi (Mannazzu *et al.*, 2008; Zara *et al.*, 2009), e quando le cellule di lievito trovano queste molecole nel substrato di crescita, esse possono moltiplicarsi anche in assenza di ossigeno; dai risultati ottenuti è evidente che il siero può supportare queste esigenze, mentre la scotta, che è nota essere molto povera, in particolare in proteine, risulta meno adeguata a sostenere i fabbisogni nutrizionali delle cellule in crescita nelle fermentazioni anaerobiche.

Tutto questo conferma quanto riportato da Fonseca *et al.* (2008): il processo fermentativo che conduce alla produzione di etanolo con rendimenti elevati, è favorito, per il siero e la scotta, in condizioni di anaerobiosi, pur se con un apporto iniziale di ossigeno necessario a sostenere la moltiplicazione cellulare. Nel caso della fermentazione aerobica, è indispensabile definire con precisione il momento in cui la fermentazione dovrebbe essere interrotta per ottenere la massima produzione di etanolo. Nella fermentazione anaerobica occorrono tempi più lunghi, ma si

Discussione

raggiunge una produzione molto maggiore di etanolo; ciò malgrado non vengono esaurite le risorse zuccherine delle matrici e la produzione di etanolo è favorita a discapito della produzione di biomassa microbica.

In aerobiosi, invece, il lievito ha una fase di moltiplicazione iniziale veloce, che consuma l'ossigeno, e porta ad una minore produzione di etanolo e ad una maggiore produzione di biomassa.

5.3 Effetto di temperature differenti

La produzione di etanolo industriale dipende dall'attività microbica, in particolare dai lieviti, e in questi processi i vantaggi relativi all'alta temperatura sono molti (Anderson *et al.*, 1986; Gough *et al.*, 1996; Banat *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Fonseca *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010); per questo motivo le applicazioni di microrganismi termofili, sono state da sempre ampiamente auspiccate (Banat *et al.*, 1998). Tuttavia, la scelta della temperatura ottimale di fermentazione è molto importante in quanto temperature troppo elevate possono condurre a una maggiore sensibilità dei microrganismi alla tossicità dell'etanolo prodotto e, di conseguenza, a una minore produzione dello stesso (Antoni *et al.*, 2007; Banat *et al.*, 1992).

Indagando, nel presente lavoro, sul comportamento del lievito a diverse temperature su siero e scotta, si evince che la temperatura influenza fortemente le prestazioni della fermentazione.

Come già detto, le alte temperature causano una fluidità maggiore nelle membrane e i lieviti rispondono a questo cambiamento fisico adattando la composizione degli acidi grassi (Ohta *et al.*, 1988); questo è solitamente associato ad una variazione di composizione delle membrane, con una riduzione dell'indice di insaturazione ed un aumento di alcuni steroli, al fine di mantenere una fluidità ottimale per le attività cellulari che sono eventualmente parte di una risposta adattativa (Lloyd *et al.*, 1993; Banat *et al.*, 1998).

Dai risultati ottenuti risulta chiaro che il siero può supportare meglio tali esigenze, mentre la scotta risulta inadeguata a sostenere i fabbisogni nutrizionali delle cellule in crescita.

Ciò è confermato dalle fermentazioni effettuate a 40°C, in cui è stato usato un inoculo starter con una concentrazione cellulare maggiore per cercare di evitare l'effetto di stress termico sulla moltiplicazione cellulare osservato in prove preliminari, visto che già Fonseca *et al.*, (2007) sosteneva l'evidenza di un effetto delle temperature sulla produzione di biomassa. Anche con questo accorgimento la concentrazione cellulare di *K. marxianus* a 40°C è diminuita (Figura 32). Anche la massima concentrazione di β -galattosidasi è stata segnalata a 37°C, e diminuisce rapidamente a temperature superiori a 40°C (Rech *et al.*, 1999).

Nel siero la temperatura più elevata ha dato luogo ad un aumento molto rapido della concentrazione di etanolo, con un massimo raggiunto a 40°C al terzo giorno che si mantiene costante fino al termine della fermentazione (Figura 30). La massima concentrazione di etanolo, anche se risulta essere leggermente inferiore a quella ottenuta a 37°C (Figura 26), viene raggiunta in meno tempo e viene mantenuta fino alla fine della fermentazione.

In scotta la fermentazione alcolica è stata quasi completamente inibita a 40°C (Figura 30); con un residuo di lattosio molto elevato al termine della fermentazione (Tabella 11); ciò può essere considerato indice di un'alterazione funzionale delle membrane plasmatiche indotta dall'elevata temperatura e aggravata dall'anaerobiosi che ha impedito, in assenza dei nutrienti nel mezzo, la sintesi dei costituenti necessari ad adattarne la composizione (Mannazzu *et al.*, 2008; Zara *et al.*,

2009, Belviso *et al.*, 2004). A questo va ad aggiungersi il fatto, che nelle prove effettuate, ripetute più volte, non si sia mai instaurata l'anaerobiosi (Figura 36), essenziale per la produzione di etanolo.

Riducendo, invece, la temperatura a 28°C, di cui in letteratura non si hanno riscontri, si raggiunge una concentrazione massima di etanolo superiore sia a quella ottenuta a 37°C che a 40°C, sia per il siero che per la scotta (Tabella 11 e Tabella 10).

Le fermentazioni di siero e scotta a 28°C mostrano andamenti simili con un decremento di etanolo nella fase terminale, più accentuato nella scotta (Figura 31).

È stato trovato anche del residuo di lattosio in scotta alla fine della fermentazione condotta a 28°C, mentre alla stessa temperatura tale zucchero è scomparso completamente nel siero; questo conferma che la composizione della scotta non risulta ottimale per sostenere il metabolismo cellulare in anaerobiosi, mentre risulta esserlo il siero, il cui contenuto di lattosio è nullo a fine fermentazione. Inoltre, risulta evidente che le carenze nutrizionali indotte dalla scotta sono causa di stress decisamente accentuato dalle alte temperature, ma molto meno evidente a temperature più basse.

I residui zuccherini a fine fermentazione sono, comunque, risultati nettamente maggiori in scotta a tutte le temperature, rispetto al siero (Figura 53).

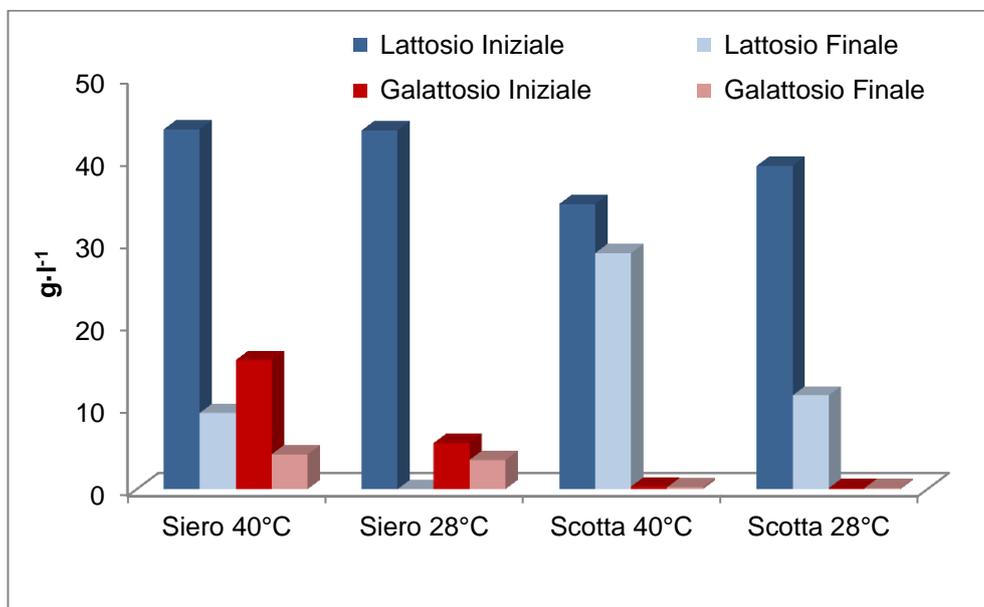


Figura 53. Fermentazioni anaerobiche effettuate a 40°C e 28°C: concentrazioni iniziali e finali di lattosio e galattosio.

Le rese maggiori si sono riscontrate con la scotta a 28°C con un tasso di 0,54, come da letteratura (Ozmihici e Kargi, 2007; Kargi e Ozmihici, 2006), seguite da siero a 28°C e in coda dal siero a 40°C (Tabella 11). Le rese maggiori riscontrate con la scotta aprono a spunti di riflessione per indagini future sulle potenzialità della scotta, sulla sua caratterizzazione e su modalità di arricchimento del substrato e sul metabolismo di *K. marxianus* su questa matrice.

5.4 Fermentazioni con biomassa inclusa in alginato di calcio

Secondo gli studi di Singh *et al.*, (1998) quando l'organismo era immobilizzato in alginato di calcio e coltivato su terreni contenenti glucosio e saccarosio per brevi periodi di tempo, le concentrazioni di etanolo prodotto sia in sistemi liberi che in sistemi immobilizzati erano relativamente simili. Tuttavia, quando le cellule immobilizzate e quelle libere sono state coltivate in batch, la produzione di etanolo è aumentata nel primo caso su periodi di tempo prolungati (Singh *et al.*, 1998; Nolan *et al.*, 1994). Nel nostro studio la produzione di etanolo è risultata più elevata nelle fermentazioni in fase dispersa rispetto a quelle con biomassa inclusa, sia in batch che in semicontinuo (Tabella 12 e Tabella 13). Tuttavia, nelle fermentazioni in batch in fase dispersa sono stati riscontrati zuccheri residui a fine fermentazione (Tabella 12).

Nelle fermentazioni semicontinue le concentrazioni di etanolo aumentano anche grazie al fatto che l'aggiunta di matrice fresca permette di avere nuovi nutrienti.

In generale, sono state ottenute concentrazioni molto elevate di etanolo con le fermentazioni semicontinue sia in fase dispersa (sia in siero che in scotta) che con biomassa intrappolata (soprattutto siero). Inoltre, i residui zuccherini finali sono quasi nulli in tutte e quattro le fermentazioni (Tabella 13).

In fermentazioni semicontinue in fase dispersa, la massima concentrazione di etanolo è stata raggiunta molto rapidamente e si è mantenuta elevata durante tutta la fermentazione per più di dieci giorni (Figura 44); gli zuccheri sono stati inoltre quasi completamente esauriti al termine della fermentazione (Figura 47). Ciò significa che questa forma di gestione della fermentazione è particolarmente adatta per raggiungere le migliori prestazioni di processo, in particolare per la scotta, dove i risultati sono stati migliori che nelle fermentazioni semicontinue con cellule incluse (Figura 41). Questo può essere spiegato con il fatto che l'aggiunta di mezzo fresco per tutta la fermentazione può agire come una forma di fermentazione fed-batch, in cui nutrienti, fra cui l'ossigeno, sono periodicamente aggiunti permettendo un miglior stato fisiologico delle cellule; in questo modo la performance della matrice scotta può essere assimilabile a quella del siero.

L'uso di cellule di lievito intrappolate non ha migliorato i risultati di processo; soprattutto per quanto riguarda la scotta.

5.5 Produzione di etanolo su refluo da produzione di PHA

I PHA sono polimeri molto interessanti poiché presentano caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche confrontabili a quelle delle plastiche tradizionali, oltre ad avere una serie di vantaggi quali la completa biodegradabilità, la resistenza agli UV e la biocompatibilità (Reddy *et al.*, 2003). Questi poliesteri sono sintetizzati e accumulati intracellularmente da batteri aerobi come riserva di carbonio e di energia (Anderson e Dawes, 1990).

La riduzione dei costi di produzione dei PHA è possibile mediante l'impiego di substrati più economici (Koller *et al.*, 2005), quali i sottoprodotti dell'industria alimentare come il siero di latte e la scotta, la ricerca di nuove strategie di fermentazione (Lee, 1996), l'impiego di consorzi microbici capaci di sintetizzare elevate concentrazioni di PHA (Choi e Lee, 1999), e l'ottimizzazione dei processi di ricupero e purificazione (Lakshman e Shamala, 2006).

Il contenuto in lattosio del siero e della scotta rende interessante e promettente la possibilità di utilizzarli come medium di fermentazione per batteri lattosio-degradanti al fine di produrre plastiche “*environmental friendly*” come i PHA.

Per valorizzare maggiormente i reflui dell'industria lattiero casearia, e per sfruttare al massimo il potenziale delle matrici, si è provata anche la fermentazione alcolica del refluo derivante dalla fermentazione di scotta per la produzione di PHA.

La matrice presenta un forte depauperamento degli zuccheri già all'inizio del processo (Figura 51), in quanto queste sostanze sono già state utilizzate dal consorzio batterico nel precedente processo per la sintesi e l'accumulo di PHA. Sebbene la matrice di partenza sia così povera, questo non ha impedito la formazione di etanolo (Figura 48) che, seppur limitata, è comunque stata maggiore della produzione in aerobiosi sia di scotta che di siero (Figura 26).

Essendo esauriti il lattosio e il galattosio dalla precedente fermentazione, si presuppone che rimangano, invece un gran numero di acidi organici, prodotti dal consorzio composto da batteri lattici, come acido lattico e acido acetico e in misura minore acido propionico e acido butirrico, che hanno in qualche modo supplito alla carenza di nutrienti della matrice.

Considerando i dati ottenuti, molto interessanti dal punto di vista di valorizzazione della matrice scotta, si ritiene che, in futuro, sia auspicabile indagare più approfonditamente sia sulle potenzialità che sul metabolismo di *K. marxianus* applicato a questi processi per ottenere non solo una produzione di plastiche “*environmental friendly*”, ma anche di biocarburanti.

6. Conclusioni

In conclusione, il presente lavoro ha consentito di investigare le potenzialità degli effluenti dell'industria lattiero casearia, mettendo in evidenza che sia il siero di latte che la scotta hanno dimostrato di essere idonei alla produzione di bioetanolo.

La fermentazione aerobica di siero e scotta è risultata non essere particolarmente adatta per la produzione di etanolo; potrebbe, tuttavia, essere presa in considerazione come via alternativa di depurazione dei reflui, e di conseguenza di riduzione dell'impatto ambientale e dei costi di smaltimento, in parallelo alla produzione di biomasse microbiche per via biotecnologica.

Kluyveromyces marxianus ha mostrato un buon tasso di crescita su queste matrici, con una elevata capacità di convertire lo zucchero in biomassa. Questi risultati forniscono utili informazioni per quanto riguarda la futura applicazione di questo lievito in processi finalizzati alla produzione di biomassa e di bioetanolo.

La fermentazione anaerobica del siero può facilmente essere gestita in diversi modi, raggiungendo sempre buoni risultati; la scotta, invece, risulta, in alcuni casi, inadeguata a sostenere i fabbisogni nutrizionali delle cellule in crescita o in fermentazione.

Le migliori prestazioni, per entrambe le matrici, sono state raggiunte a basse temperature (28°C). Le alte temperature sono anche compatibili con buone rese di etanolo nelle fermentazioni con siero, per il quale, l'alta temperatura ha permesso di raggiungere buoni risultati in meno tempo. Ottimi risultati si sono ottenuti anche con la scotta, che ha raggiunto la resa teorica sia a 37°C che a 28°C.

In altre condizioni la scotta, ha presentato caratteristiche non ottimali come mezzo di crescita, a causa della mancanza di nutrienti necessari per sostenere il metabolismo anaerobico; tuttavia con il processo di fermentazione in semicontinuo, sono stati ottenuti ottimi risultati.

Le fermentazioni in semicontinuo hanno dato eccellenti risultati per quanto riguarda la produzione di etanolo. Ciò significa che questa forma di gestione della fermentazione è particolarmente adatta per raggiungere le migliori prestazioni di processo, in particolare per la scotta.

Invece, l'uso di cellule di lievito intrappolate in alginato di calcio non ha migliorato i risultati di processo.

La produzione di bioetanolo da scotta può essere, dunque, considerata un'ottima opportunità; infatti, questo effluente viene tuttora considerato solamente uno scarto, in quanto non trova altre possibili destinazioni. La scotta, perciò, potrebbe rappresentare un efficace fonte non vegetale di produzione di energia rinnovabile grazie al suo significativo contenuto di zuccheri fermentabili e per il suo basso costo.

La possibilità di utilizzare il siero di latte e la scotta come substrato di crescita per trasformazioni biotecnologiche è, pertanto, un'opportunità sia per migliorare il valore aggiunto dei processi agro-industriali sia per ridurre l'impatto ambientale. In questo modo, oltre a ridurre i costi di smaltimento

Discussione

di questi effluenti, contemporaneamente si dà origine a prodotti secondari di processo, che in questo caso sono rappresentati in primo luogo da un biocarburante come il bioetanolo, riutilizzabile anche all'interno della stessa filiera.

7. Bibliografia

Adrian J., Frangne R., Potus J. (2009). *Dizionario degli alimenti. Scienza e tecnica.* II edizione. Traduzione dal francese di Valentina Guani. Editore tecniche nuove. Pagg. 462-463

Amrane A., Prigent Y. (1998). Effect of culture conditions of *Kluyveromyces marxianus* on its autolysis, and process optimization *Bioprocess Engineering* 18 (1998) 383 - 388

Anderson A. J. and Dawes E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxylakanoates. *Microbiol. Rev.* 54: 450-472.

Anderson P. J., McNeil K. and Watson K. (1986). High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at Temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and environmental microbiology*, June 1986, p. 1314-1320 Vol. 51, No. 6

Antoni D. & Zverlov V. V. & Schwarz W. H. (2007). Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) 77:23–35

Audic J., Chaufer B. and Daufin G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait* 83 (2003) 417-438

Bajpai P. & Margaritis A. (1982). Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* growth on Jerusalem Artichoke juice. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 1325-1329.

Banat I.M., Nigam P. and Marchant R. (1992). Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 259-263

Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R. and McHale A.P. (1998).

Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 14, 1998 809-821

Belviso S., Bardi L., Biondi Bartolini A., Marzona M. (2004). Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(9):657-667.

Biavati B., Sorlini C. (2008). Cap. Produzione industriale di biomasse microbiche (autrice Manzoni M.) e cap. Produzione di bioetanolo (autori Manzoni M., Molinari F.) In: *Microbiologia agro ambientale*. Casa Editrice Ambrosiana. Pagg. 523-538, 660-661

Cappelli P. e Vannucchi V. (2005). Cap. Glucidi, cap. Sostanze che derivano dalle trasformazioni dei principi nutritivi, cap. Formaggio in: *Chimica degli alimenti*. Zanichelli. Pagg. 33-34, 37-38, 170-171, 450-453

Capodicasa S. (2008). Messa a punto di processi biotecnologici per la produzione di biocombustibili da matrici organiche di rifiuto. Tesi di dottorato.

- Caporali F. (2003).** L'agroecosistema e la sostenibilità dell'attività agraria in: *Agricoltura e salute – la sfida dell'agricoltura biologica*. EDITEAM Gruppo editoriale. Pagg. 28-29
- Carri S. (2008).** Attività antagonistica di batteri lattici isolati da salami verso muffe e lieviti. Tesi di Dottorato.
- Carvalho-Silva M. & Spencer-Martins I. (1990).** Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 57: 77-81, 1990.
- Castelli S. (2011).** Biomasse per la produzione di energia. Maggioli S.p.A. Pagg. 49, 78-79
- Castrillo J. I., Kaliterna J., Weusthuis R.A., van Dijken J. P., and Pronk J. T. (1996).** High-cell-density cultivation of yeasts on disaccharides in oxygen-limited batch cultures *biotechnology and bioengineering*, Vol. 49, Pp. 621-628 (1996)
- Castrillo J.I., Ugalde U. O. (1993).** Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 01/1993; 40(2):386-393.
- Cherubini F. and Jungmeier G. (2010).** LCA of a biorefinery concept producing bioethanol, bioenergy, and chemicals from switchgrass. *Int J Life Cycle Assess* (2010) 15:53–66
- Choi J. e Lee SY (1999).** Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 13-21
- Civiero M. (2008).** IRES Veneto. Paper n. 64 pagg. 70-71
- Clark J.H. and Deswarte F.E.I. (2008).** The biorefinery concept– an integrated approach. p. 1–20. In J.H. Clark and F.E.I. Deswarte (ed.) *Introduction to chemicals from biomass*. Wiley series in renewable resources. Wiley, Padstow, UK.
- COMMISSIONE EUROPEA (2006).** Biofuels in the European Union - A vision for 2030 and beyond. Final draft report of the Biofuels Research Advisory Council.
- COMMISSIONE EUROPEA (2011).** – Comunicato Stampa IP/11/901 Via libera a sistemi di certificazione dei biocarburanti sostenibili Bruxelles, 19 luglio 2011.
- Corradini C. (1995).** Gli zuccheri nel latte in: *Chimica e tecnologia del latte*. Tecniche nuove. Pagg. 41-43
- D'Avino L., Croce B., Lazzeri L. (2010).** ISPRA Rapporti 128/2010 - Multifunzionalità dell'azienda agricola e sostenibilità ambientale - La chimica verde e il concetto di Bioraffineria. Pagg. 139-144
- Domingues L., Lima N., Teixeira J.A. (2000).** Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, VOL. 72, NO. 5, MARCH 5, 2001 507-514

Donadio S. e Marino G (2008). Cap. Le fermentazioni anaerobiche, cap. Il panorama attuale, cap. I lieviti e cap. Metaboli primari in: *Biotecnologie microbiche*. Casa Editrice Ambrosiana. Pagg. 9, 31-32, 142-145, 185-199

EIA (2012). <http://www.eia.gov/>

EUBIA (2007). European Biomass Industry Association. <http://www.eubia.org/212.0.html> Nov 2012.

EUROSERV'ER (2012). Systemes Solaires le journal des énergies renouvelable N° 210 – 2012 Baromètre Biocarburants – Euroserv'er – Juillet 2012 pagg. 42-62

EUROSTAT (2012).

<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=1&language=en&pcode=tag00040> Date of extraction:15 Oct 2012

Delbianco A. e Sposini M. (2001). Alba o tramonto nell'orizzonte del bioetanolo? FUEL ALTERNATIVI TPoint 4/2001 pagg. 14-19

Fahd S., Fiorentino G., Mellino S., Ripa M. and Ulgiati S.(2011). Biorefinery implementation in marginal land a focus on the multifunctional use of regional agriculture. Proceedings of the Conference "Trends and Future of Sustainable Development" 9-10 June 2011, Tampere, Finland

FAO (2008). FAO Sala stampa. - La FAO: rivedere le politiche e i sussidi ai biocombustibili: Il rapporto annuale SOFA 2008 valuta rischi e opportunità della bioenergia <http://www.fao.org/newsroom/it/news/2008/1000928/index.html> 14/11/2012

FAOSTAT (2010) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> ©FAO Statistics Division 19 October 2012

Foda M.I., Joun H. and Li Y. (2010). Study the suitability of cheese whey for bio-butanol production by *Clostridia*. Journal of American Science, 2010, 6(8)

Fonseca G.G. & Heinzle E. & Wittmann C.& Gombert A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential Appl Microbiol Biotechnol (2008) 79:339–354

Fonseca G.G., Gombert A.K., Heinzle E. & Wittmann C. (2007). Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. FEMS Yeast Res 7 (2007) 422–435

Gänzle M.G., Haase G., Jelen P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. International Dairy Journal Volume 18, Issue 7, July 2008, Pages 685-694

Gazzetta ufficiale 17 maggio 2000 n. 113. Delibera CIPE 15 febbraio 2000 (programma nazionale biocombustibili - PROBIO).

Gigliotti C. e Verga R. (2007). Cap. Principali tecniche di microbiologia e enzimologia nel settore alimentare (aurete Verga R.), cap. Latte e derivati (autori Verga R. e Gigliotti C.) , cap. Alimenti ad

uso zootecnico (Autore Marcozzi G.) in: *Bioteconologie alimentari*. Piccin Nuova Libreria S.p.A. Pagg. 19-21, 45-52, 61-62, 422-424

Gough S., Flynn O., Hack C. J., Marchant R. (1996). Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimization of media supplements. *Appl Microbiol Biotechnol* (1996) 46:187-190

Grba S., Stehlink-Tomas V., Stanzer D., Vahčić N. and Škrilin A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chem. Biochem. Eng.*, 2002, 16 (1):13-16

Guimarães P.M.R., Teixeira J.A., Domingues L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeast as part of integrated solutions for valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances* 2010, 25:375-384

Hack C.J. and Marchant R. (1998). Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1998) 20, 323–327

Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Lidén G. and Zacchi G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* 24(12): 549-556.

Hart H. (1983). Cap. Alcoli, fenoli e tioli in: *Chimica organica*. Zanichelli. Pag. 165

Henke R., Salvioni C. (2010). ISPRA Rapporti 128/2010 - Multifunzionalità dell'azienda agricola e sostenibilità ambientale. Pagg. 3-10

Hunt S. (2005). BIOFUELS FOR TRANSPORTATION: Global Potential and Implications for Sustainable Agriculture & Energy in the 21st Century. Worldwatch Institute. www.worldwatch.org

IEA (2008). IEA (International Energy Agency) Bioenergy Task 42 on Biorefineries. <http://www.biorefinery.nl/ieabioenergy-task42/> 17/10/2012.

IFA-GESTIS (2012). GESTIS Substance Database <http://gestis-en.itrust.de> 08/11/12

ISTAT (2011). Indagine annuale sul latte e sui prodotti lattiero caseari. Anno 2011 <http://agri.istat>.

Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A.B., Kongjan P., Angelidaki I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 100 (2009) 2562–2568.

Kargi F., Ozmihci S. (2006). Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006) 711–718

Koller M., Bona R., Braunegg G., Hermann C., Horvat P., Kroutil M., Martinz J., Neto J., Pereira L., Varila P. (2005). Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and

Surplus Materials. *Biomacromolecules* 6, 561-565.

Koller M., Hesse P., Bona R., Kutschera C., Atlic A., Braunegg G. (2007). Potential of various Archea and Eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromol. Biosci.* 7: 218-226.

Lachance M.A. (2007). Current status of *Kluyveromyces* systematic. *FEMS Yeast Res* 7 (2007) 642–645

Lakshman K., Shamala T. R. (2006). Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. *Enzyme and Microbial Technol.* 39 1471–1475

Lazzeri L. (2012). Presentazione Modelli di bioraffineria in agricoltura: le strategie europee. Pagg. 1-17

Lee S.Y. (1996). Plastic bacteria? progress and prospects for Polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Biotech.* 14: 431-438.

Lloyd D., Morell S., Carlsen H.N., Degn H., James P.E. & Towlands C.C. (1993). Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9, 825-833.

Lynd L.R., Ahn H.J., Anderson G., Hill P., Kersey D.S. & Klapatch T. (1991). Thermophilic ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28/29, 549-569

Manzoni M. (2006). Cap. Terreni colturali e materie prime e cap. Etanolo in: *Microbiologia industriale*. Casa Editrice Ambrosiana. Pagg. 72-73, 77, 220, 249-253

Mannazzu I., Angelozzi D., Belviso S., Budroni M., Farris G.A., Goffrini P., Lodi T., Bardi L. (2008). Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 121(1):84-91.

NCBI. National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nolan A. M., Barron N., Brady D., McAree T., Smith D., McHale L., P. McHale A. (1994). Ethanol production at 45 ° by an alginate-immobilized, thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* following growth on glucose-containing media *Biotechnology Letters* August 1994, Volume 16, Issue 8, pp 849-852

OECD– FAO (2008). <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/previousoutlook.htm> 19 Oct 2012

OECD – FAO (2010). <http://stats.oecd.org> Data extracted on 19 Oct 2012

Ohta K., Wijeyaratn, S.C. & Hayashida S. (1988). Temperature sensitive mutants of a

thermotolerant yeast, *Hansenula polymorpha*. Journal of Fermentation Technology 66, 455-459.

Ottogalli G. (2002). Latticini in: *Atlante dei formaggi*. Ulrico Hoepli Editore. Pagg. 181-186

Ozmihci S. and Kargi F. (2007a). Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44:602-606.

Ozmihci S., Kargi F. (2007b). Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. Enzyme Microbiol Technol 2007d;41:169–74.

O'Shea D.G., Walsh P.K. (2000). The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. Appl Microbiol Biotechnol. 2000 Mar;53(3):316-22.

Quaglierini C., Vannini M., Paladino E. (1995). Cap. Biomolecole e cap. Le fermentazioni industriali in: *Chimica delle fermentazioni e laboratorio – Introduzione alla biotecnologie*. Zanichelli. Pagg 29, 313-321, 332-333

Rech R., Cassini C.F., Secchi A.R., Ayub M.A.Z. (1999) Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for the production of beta-galactosidase by *K. marxianus*. J Ind Microbiol Biotechnol, 1999, 23:91-96.

Reddy C.S., Ghai R., Rashmi, Kalia V.C. (2003). Polyhydroxylakanoates: an overview. Biores. Technol. 87: 137-146.

RFA (2012) Renewable Fuels Association <http://www.ethanolrfa.org/> Nov 2012

Salmon J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. Applied And Environmental Microbiology, Apr. 1989, p. 953-958 Vol. 55, No. 4.

Sansonetti S., Curcio S., Calabrò V., Iorio G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. Biomass & Bioenergy Vol. 33 Pagg. 1687-1692 33:1687-1682

Saraceno A., Sansonetti S., Curcio S., Calabrò V., Iorio G. (2010). A hybrid neural approach to model batch fermentation of dairy industry wastes. 20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20 S. Pierucci and G. Buzzi Ferraris (Editors) © 2010 Elsevier B.V.

Schnepf R. (2006). European Union Biofuels Policy and Agriculture: An Overview. CRS Report for Congress. Order Code RS22404. Pagg. 1-6

Serrat M., Bermúdez R. C., e Villa T. G. (2004). Polygalacturonase and ethanol production in *kluyveromyces marxianus* potential use of polygalacturonase in foodstuffs. Applied Biochemistry and Biotechnology 49 Vol. 117, 2004

Singh D., Nigam P., Banat I.M., Marchant R. and McHale A.P. (1998). Review: Ethanol

production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II ± Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998 Vol 14, 823- 834

Siso M.I.G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology* Volume 57, Issue 1, July 1996, Pages 1–11

Soetaert W. and Vandamme E. (2006). The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol. J.* 2006, 1, 756–769

Todisco A. (2008). ISPRA, Manuali e linee guida 47/2008: pag V e pag 1

Yang S.T., Silva E.M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J Dairy Sci.* 1995 Nov;78(11):2541-62.

Yépez Silva-Santisteban B. O. & Converti A. & Maugeri Filho F. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Biochem Biotechnol* (2009) 152:249–261

Zadow J.G. (1984). Lactose: Properties and Uses. *Journal of Dairy Science* Volume 67, Issue 11, Pages 2654-2679, November 1984.

Zafar S., Owais M., Saleemuddin M. & Husai S. (2005). Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. *International Journal of food and science and Technology*, 2005, 40:597-604

Zafar S., Owais M. (2005). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Eng J* 2005; 27:295–298.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration: *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56:17-34

Zambonelli C., Tini V., Giudici P., Grazia L. (2001). Cap. I microrganismi “virtuosi” e cap. I prodotti lattiero caseari in: *Microbiologia degli alimenti fermentati*. Calderini Ed. Agricole 2001 pagg. 20, 65-66, 77

Zara G., Angelozzi D., Belviso S., Bardi L., Goffrini P., Lodi T., Budroni M. and Mannazzu I. (2009). Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9:217–225.

Attività collaterali

Parallelamente al lavoro svolto nell'ambito del progetto del dottorato è stato avviato un progetto di microbiologia agroambientale che riguardava la **“gestione di funghi simbiotici e batteri della rizosfera per migliorare l'efficienza d'uso dell'acqua in sistemi colturali piemontesi e senegalesi”**. Il progetto concerneva l'uso di inoculi di consorzi di microrganismi rizosferici composti da funghi micorrizici e batteri promotori della crescita nella coltura del mais, in Piemonte, e del fagiolo Niebè (*Vigna unguiculata*), in Senegal.

In particolare presso il CRA-RPS Gruppo di Ricerca di Torino è stato condotto il Sottoprogetto **“Caratterizzazione dell'effetto di inoculi di funghi micorrizici (AMF) e batteri rizosferici (PGPR) su piante coltivate in condizioni di stress idrico”**. Nell'ambito di questo sottoprogetto sono state svolte attività di valutazione dell'efficacia dell'impiego di microrganismi rizosferici per ottimizzare l'uso di acque irrigue, riducendo lo stress idrico delle piante e, quindi, conferendo contemporaneamente un vantaggio produttivo ed ambientale, dovuto all'ottimizzazione del consumo delle risorse idriche.

Il lavoro è parte del progetto BIOMOLENER: **“Recupero di scarti derivanti da attività agrozootecniche ed agroindustriali per la produzione di biomolecole ad elevato valore aggiunto e biocombustibili”**.

Progetto finanziato dal MIPAAF Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, Bando Bioenergie 2007, coordinato dalla dott.ssa Laura Bardi - C.R.A.-RPS, Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro per le razioni Pianta Suolo, Gruppo di Ricerca di Torino.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare per prima cosa il mio tutor di Dottorato, il Professor **Fabio Fava**, per la sua disponibilità e perché mi ha dato la possibilità di fare quest'esperienza. Con lui ringrazio anche il Dott. **Giulio Zanaroli** e l'Ing. **Lorenzo Bertin** per il loro prezioso aiuto e per aver risolto tutti i miei dubbi con professionalità e gentilezza.

Ringrazio anche i miei colleghi e compagni di "avventura": **Andrea**, **Selene** con cui abbiamo iniziato e concluso l'esperienza del Dottorato e, in particolar modo, **Elena**, con cui fin da subito siamo entrate in sintonia. È stato facile e naturale condividere difficoltà, dubbi e perplessità di questo mondo, sostenendoci e incoraggiandoci a vicenda; ogni volta che ci vedevamo era una boccata di aria fresca!

Ringrazio la Dott.ssa **Anna Benedetti** e la Dott.ssa **Laura Bardi** per avermi dato l'opportunità di svolgere parte di questo lavoro presso il C.R.A.-R.P.S.. In particolare la Dott.ssa **Laura Bardi**, che mi ha accolto nel suo gruppo di ricerca quando ero ancora inesperta, e con il suo aiuto mi ha permesso di imparare, crescere, scoprire e anche visitare posti nuovi. La ringrazio per avermi seguito in questo progetto, per la sua collaborazione e per avermi fatto scoprire il mondo scientifico.

Tra tutto il personale del CRA-RPS vorrei ringraziare in particolare la Dott.ssa **Fulvia Rosso**, una collega fidata con cui condividere i momenti quotidiani della vita, diventata una cara amica su cui contare in qualsiasi occasione, sempre disposta ad ascoltare le mie vicissitudini analitiche e non, senza la quale non sarei arrivata alla fine di questo percorso.

Ringrazio la Prof.ssa **Francesca Bosco** e l'Ing. **Riccardo Andrea Carletto** che mi hanno accolto in quest'ultimo periodo come se fossi un membro della loro squadra.

Ringrazio mio papà per essermi stato vicino e per avermi sostenuto nelle mie scelte.

Ringrazio gli amici di sempre e le persone che giorno per giorno mi sono state vicine, mi hanno dato l'appoggio per perseguire i miei obiettivi, e mi hanno aiutato ad affrontare i momenti più duri di questi anni: **GRAZIE!**

Un **GRAZIE** particolare a **Valeria**, **Letizia**, **Sara**, con **Ivo**, **Diego** e il piccolo **Samuel**, che mi hanno aiutata a diventare quella che sono.

Un ringraziamento speciale a tutta la mia famiglia, in particolar modo a **Zia Teresa** e a **Zia Paola** e alla mia famiglia allargata con **Gisella** e **Gigi**, il loro supporto nei momenti di crisi è stato fondamentale.

Per ultimo, ma non meno importante, ringrazio **Massimo**, mio amico, mio marito e mia vita, perché con lui affianco le cose assumono sempre un altro sapore... **GRAZIE di essere al mio fianco!**



Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*

Francesca Zoppellari and Laura Bardi

C.R.A. – RPS Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (Agricultural Research Council), Research Centre for the Soil-Plant System – Turin Research Group, Environment Park – Regione Piemonte, Via Livorno, 60 (A2 laboratori), 10144 Turin, Italy

Whey and scotta are effluents coming from cheese and ricotta processing respectively. Whey contains minerals, lipids, lactose and proteins; scotta contains mainly lactose. Whey can be reused in several ways, such as protein extraction or animal feeding, while nowadays scotta is just considered as a waste; moreover, due to very high volumes of whey produced in the world, it poses serious environmental and disposal problems. Alternative destinations of these effluents, such as biotechnological transformations, can be a way to reach both goals of improving the added value of the agroindustrial processes and reducing their environmental impact.

In this work we investigated the way to produce bioethanol from lactose of whey and scotta and to optimize the fermentation yields. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* was chosen as lactose-fermenting yeast. Batch, aerobic and anaerobic, fermentations and semicontinuous fermentations in dispersed phase and in packed bed reactor were carried out of row whey, scotta and mix 1:1 whey:scotta at a laboratory scale. Different temperatures (28–40°C) were also tested to check whether the thermotolerance of the chosen yeast could be useful to improve the ethanol yield.

The best performances were reached at low temperatures (28°C); high temperatures are also compatible with good ethanol yields in whey fermentations, but not in scotta fermentations. Semicontinuous fermentations in dispersed phase gave the best fermentation performances, particularly with scotta. Then both effluents can be considered suitable for ethanol production. The good yields obtained from scotta allow us to transform this waste in a source.

Introduction

Whey is a waste produced by dairy industries in significant amounts (approximately 10 l kg⁻¹ of cheese product) [1–3]. It is an organic waste rich in proteins (6–8 g l⁻¹), peptides, lipids, minerals, vitamins and especially lactose (4–6%) [2–4]. It may be reused in several ways, such as animal feeding (either directly or after biotechnological treatment aimed to increase shelf life and nutritional value), extraction of proteins and microbial biomasses growth [4]. However, due to the high volumes produced throughout the world (10⁸ tons year⁻¹) [4] and the high pollution load due to the high

COD (60–80 g l⁻¹) [1] and BOD (30–60 g l⁻¹) [5] mean values, whey is considered as a waste causing important environmental problems.

Another effluent produced by dairies is scotta, a residue of the ricotta production that still contains lactose but does not contain proteins. As nowadays it is not reused in any way, it is considered just a waste [6]; however, recently the biotechnological potential of scotta has been explored [7].

Because of the high lactose content, whey and scotta could be considered as media for biotechnological transformation into bioethanol. Nowadays, the alcoholic fermentation of whey is hardly economically competitive in comparison to the fermentation of other sources, such as cane sugar or corn [3]. However, their biotechnological reuse is strongly desirable, as it could allow us to

Corresponding author: Bardi, L. (laura.bardi@entecra.it)

transform these wastes in sources of renewable energies without competition with food crops for land use; that's why further improvements of processes management to increase ethanol yield are suitable.

Lactose is a disaccharide fermented only by microorganisms expressing both the membrane transporter, lactose permease and the hydrolytic enzyme β -galactosidase [4]. *Kluyveromyces marxianus* is a lactose-fermenting yeast with useful physiological features: it is thermotolerant, it usually has a high growth rate, it adapts to many different substrates [8] and many strains have already been recognized as GRAS (Generally Recognised As Safe) [8]. However, it presents a Crabtree-negative character and the fermentative metabolism is almost exclusively linked to the limitation of oxygen, but it cannot grow under strictly anaerobic conditions; then the yields usually reached in ethanol fermentations are lower than in *Saccharomyces cerevisiae*.

The thermotolerance is an important feature for alcoholic fermentations, because it can contribute to costs reduction: cooling systems can be avoided and contamination risks reduced. Ethanol production at temperatures above 40°C has been reported in *Kl. marxianus* [8,9].

A fermentation yield between 0.22 and 0.53 has been reported for whey fermentations carried out with different *Kl. marxianus* strains, reaching sometimes the theoretical yield (0.54 g gE-1S) [2]. Fermentation technology and management can also significantly affect ethanol yields and production rates. The lactose to ethanol fermentation rate can vary during the different yeast growth phases: Rech [5] reported that the β -galactosidase activity of *Kl. marxianus* remained constant during stationary phase, while Mahoney [10] observed a decrease; this can affect the different performances of batch, continuous or semicontinuous fermentations [3]. The continuous or semicontinuous fermentations can allow us to improve ethanol yields and competitiveness of yeasts in a nonsterile medium. It has also been reported that cells of *Kl. marxianus* retain the ability to hydrolyze the lactose in entrapped forms, suitable for continuous and semicontinuous fermentations [11].

The aim of this work was the exploitation of the dairy effluents to convert these wastes as renewable sources for bioethanol production. Different fermentation managements were tested to reach the best ethanol yields and process performances, taking into account the yeast physiology and the need to minimize the costs. In particular, we focused on: (a) oxygen availability; indeed, the highest energy requirement of the cell happens during the log phase, and small amounts of oxygen are necessary for cell multiplication, so we tested if a controlled air supply during fermentation could induce cell growth and consequently a better ethanol yield in comparison to anaerobic fermentation; (b) temperature, to check if thermotolerance of the chosen yeast can be exploited to improve the process performances; (c) growth medium; as scotta is a poor nutritional medium, a mix of scotta/whey was also tested in addition to pure scotta and pure whey; (d) semicontinuous fermentations, in dispersed phase or with embedded cells, to make easier the biomass separation from broth.

Materials and methods

Microorganism and growth conditions

All fermentations were carried out with *Kl. marxianus* var. *marxianus* strain CBS 712. Stock culture was maintained on YEPD agar

plates at 4°C. Precultures were grown in aerated flasks in the same growth medium (whey or scotta) and at the same temperature of following fermentations.

Dairy effluents

Whey and scotta were taken from a dairy in Piedmont (Italy) immediately after the cheese or ricotta production and stored at 4°C until use and no more than three days; for longer time storage they were maintained at -25°C.

The lactose and galactose concentrations were analyzed at the start and at the end of each fermentation. The mean values were respectively $37.70 \pm 7.20 \text{ g l}^{-1}$ and $3.20 \pm 4.07 \text{ g l}^{-1}$. The mean pH was 6.05 ± 0.88 in whey and 5.53 ± 0.16 in scotta.

Batch fermentations

Batch fermentations were carried out in a BIOSTAT® A plus 11 Sartorius bioreactor in 800 ml growth medium stirred at 400 rpm. Dissolved oxygen and pH were monitored throughout the fermentations with OXIFERM™ O₂ Sensor (Hamilton) and pH electrode (Hamilton) respectively. In semi-aerobic fermentations the growth medium was aerated throughout the whole fermentation with $1 \text{ ml l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ sterile air. In anaerobic fermentations the growth medium was saturated with sterile air only at the start of fermentation, then anaerobiosis was reached due to oxygen consumption by growing cells.

Different physiological parameters and fermentation management technologies were checked and compared as follows.

- Oxygen availability** – Batch fermentations were carried out in both semi-aerobic and anaerobic conditions at 37°C for seven days with a starter inoculum of $1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$; cell growth, ethanol concentration and ethanol yield were measured throughout the fermentation. Ethanol yield was calculated as $[\text{maximum ethanol concentration}/(\text{lactose} + \text{galactose})_i - (\text{lactose} + \text{galactose})_f]$. Three different fermentation media were tested: undiluted whey, undiluted scotta and a mix 1:1 whey:scotta.
- Temperature** – Batch anaerobic fermentations of whey and scotta carried out at 28°C and 40°C were also compared. As a dramatic decrease of cell growth was observed in scotta at high temperatures, a starter inoculum of $1 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ was used in all fermentations to compare ethanol production and yield.

Semicontinuous fermentations

Semicontinuous fermentations were carried out for 480 hours, in the dispersed phase and in packed bed reactor with yeast cells embedded in alginate beds. One-third of the volume of fermenting medium was withdrawn and replaced with fresh medium at times: 72 hours, 163 hours, 240 hours, 330 hours, 384 hours in whey fermentations in the dispersed phase; 48 hours, 142 hours, 242 hours, 312 hours, 406 hours in scotta fermentations in the dispersed phase; 72 hours, 187 hours, 336 hours in whey fermentations with embedded cells; 120 hours, 219 hours, 288 hours, 384 hours in scotta fermentations with embedded cells. Fermentations in the dispersed phase were carried out in BIOSTAT® A plus 11 Sartorius bioreactor (see above) at 28°C; fermentations in packed bed reactor were carried in a glass column filled with alginate-embedded yeast cells, with continuous recirculation of growth medium carried out (bottom-up) by an external peristaltic

pump. A total amount of 8×10^9 embedded cells were used to inoculate 150 ml broth added with 0.5% CaCl_2 to avoid dissolution of alginate beds. Ethanol concentration was analyzed throughout the fermentations.

Analytical methods

The yeast growth was analyzed by direct determination of cells concentration by haematocytometer counting. The concentrations of ethanol, lactose and galactose were analyzed by enzymatic assay (Megazyme K-ETOH 09/04 and K-LACGAR 12/05).

Statistical analysis

All the assays were executed in triplicate. Mean values and standard deviations were calculated by Graph Prism[®] 4.0; the Coefficients of Variation were also calculated and they were always less than 15%.

Results

Oxygen availability

From the comparison of all fermentations carried out at 37°C in aerobiosis (Fig. 1) a similar trend of ethanol production in the three fermentation media (whey, scotta and mix), with a peak in the first 30/50 hours (whey: 6.22 g l^{-1} at 24.6 hours; scotta: 1.68 g l^{-1} at 51st hour and mix: 5.36 g l^{-1} at 51st hour) followed by a decrease until its complete exhaustion was observed. The highest ethanol production was observed in whey, the lowest in scotta. The whey–scotta mix produced less ethanol and more slowly than whey, but more than scotta. Cell growth showed a very short lag phase in whey, and yeast cell concentration at the stationary phase was about $1 \times 10^9 \text{ cells ml}^{-1}$ in all fermentation media (Fig. 3a).

In anaerobic fermentations at 37°C ethanol reached concentrations strongly higher than in aerobiosis and no decrease happened (Fig. 2). Whey produced a 15.90 g l^{-1} final ethanol concentration; in addition, scotta showed a maximum concentration higher than in aerobic conditions (9.68 g l^{-1}), but lower than whey. Whey–scotta mix did not produce ethanol, then it was not tested anymore in following experiments. Yeast cell concentration at stationary phase was about $2 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ in scotta and mix, while in whey it reached values up to $7 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ (Fig. 3b).

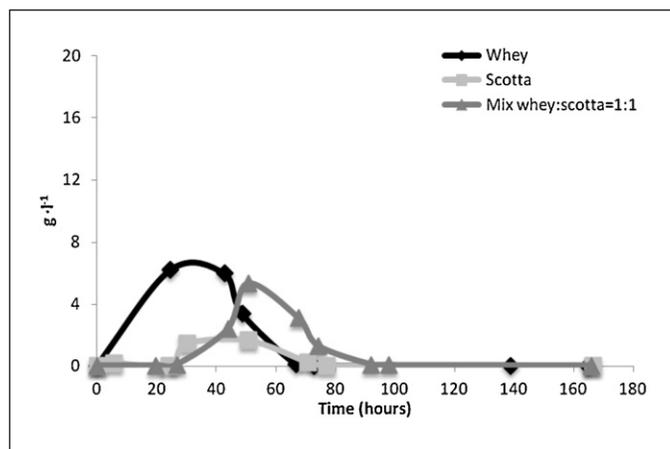


FIGURE 1

Ethanol concentration throughout the semi-aerobic fermentations of whey, scotta and mix. Fermentation conditions: temperature 37°C, stirring 400 rpm, sterile air flow rate $1 \text{ ml l}^{-1} \text{ min}^{-1}$, starter inoculum $1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$.

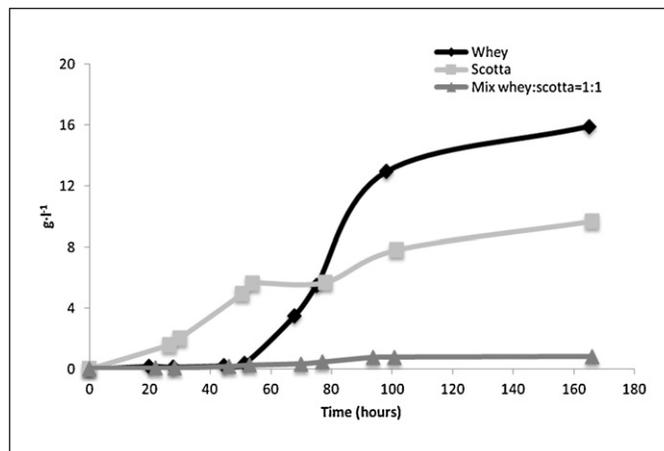


FIGURE 2

Ethanol concentration throughout the anaerobic fermentations of whey, scotta and mix. Fermentation conditions: temperature 37°C, stirring 400 rpm, starter inoculum $1 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$.

Temperature

In the anaerobic fermentation at 40°C scotta did not produce ethanol; in whey the ethanol concentration rose rapidly reaching a maximum of 14.51 g l^{-1} at third day, that remained constant until the end of fermentation (Fig. 4). At 28°C in whey the maximum ethanol concentration higher than at 40°C was reached (17.04 g l^{-1}), but with a slower increase: the highest concentration

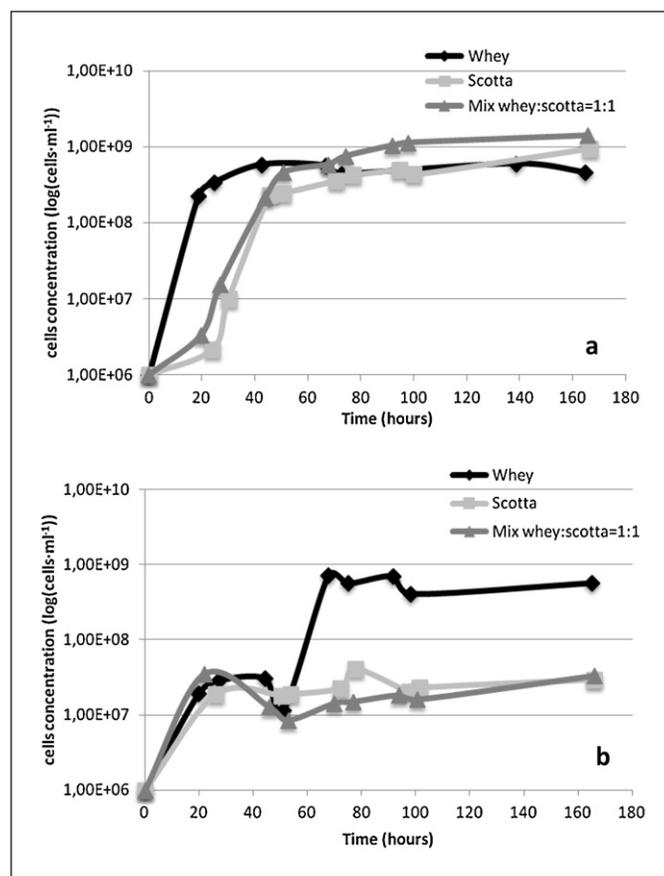


FIGURE 3

Yeast growth in semi-aerobic and anaerobic fermentations of whey, scotta and mix at 37°C. (a) Semi-aerobic fermentation; (b) anaerobic fermentation.

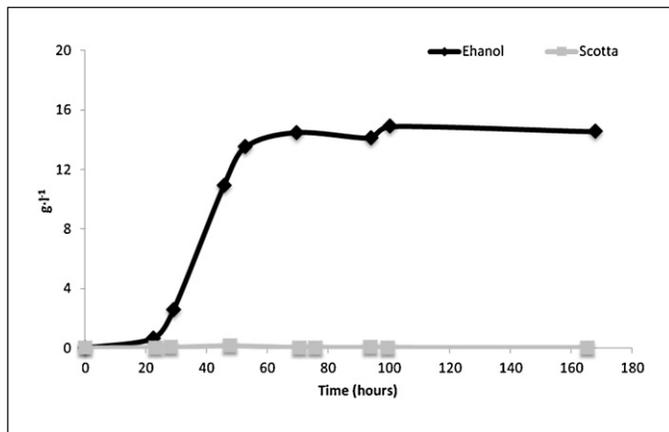


FIGURE 4

Ethanol concentration throughout the anaerobic fermentations of whey and scotta. Fermentation conditions: temperature 40°C, stirring 400 rpm, starter inoculum 1×10^8 cells ml^{-1} .

was observed at fourth day. Fermentation of scotta showed a similar trend with a 14.99 g l^{-1} maximum concentration at fourth day (Fig. 5).

Semicontinuous fermentations

Semicontinuous fermentations gave rise to an increase in the ethanol production in comparison to batch fermentation in the dispersed phase, reaching a concentration of up to 19 g l^{-1} , in both whey and scotta (Fig. 6). These performances were not improved when semicontinuous anaerobic fermentations were carried out in packed bed reactor with yeast cells entrapped in alginate: ethanol concentration increase was slower in whey, and lower in scotta (Fig. 7).

Ethanol yield

Lactose and galactose were analyzed at the start and at the end of fermentations and ethanol yield was calculated in batch aerobic and anaerobic fermentations (Table 1) and in batch anaerobic fermentations at different temperatures (Table 2).

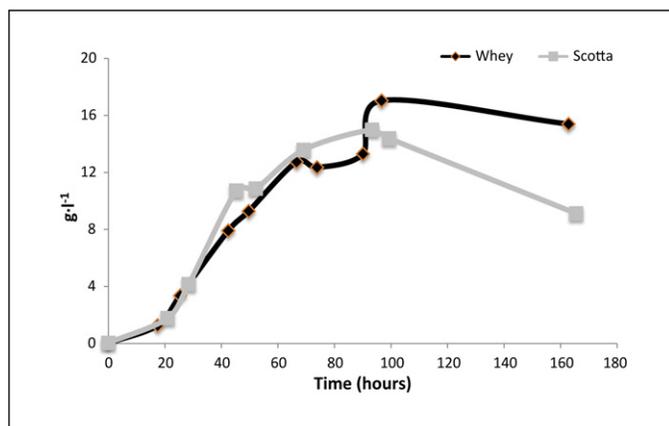


FIGURE 5

Ethanol concentration throughout the anaerobic fermentations of whey and scotta. Fermentation conditions: temperature 28°C, stirring 400 rpm, starter inoculum 1×10^8 cells ml^{-1} .

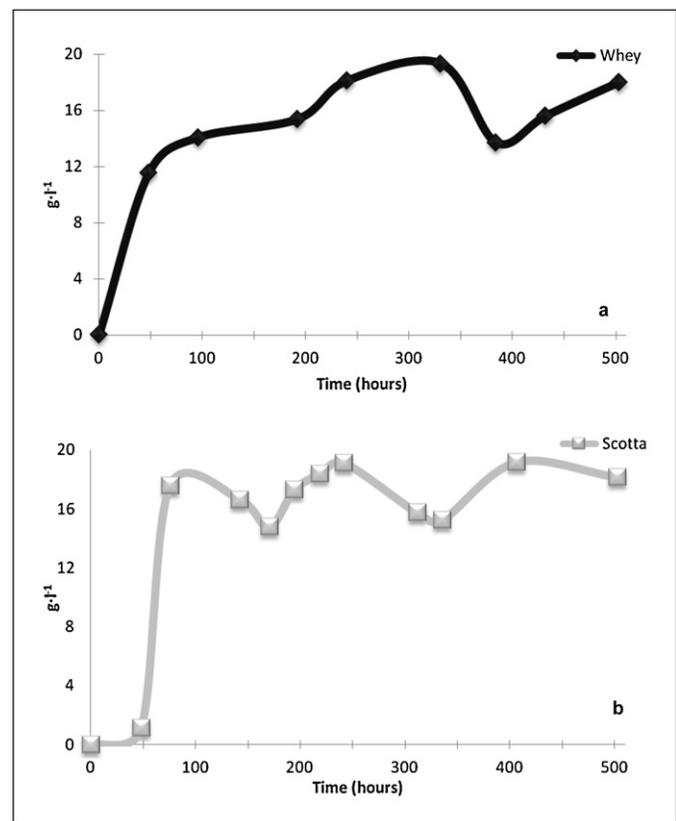


FIGURE 6

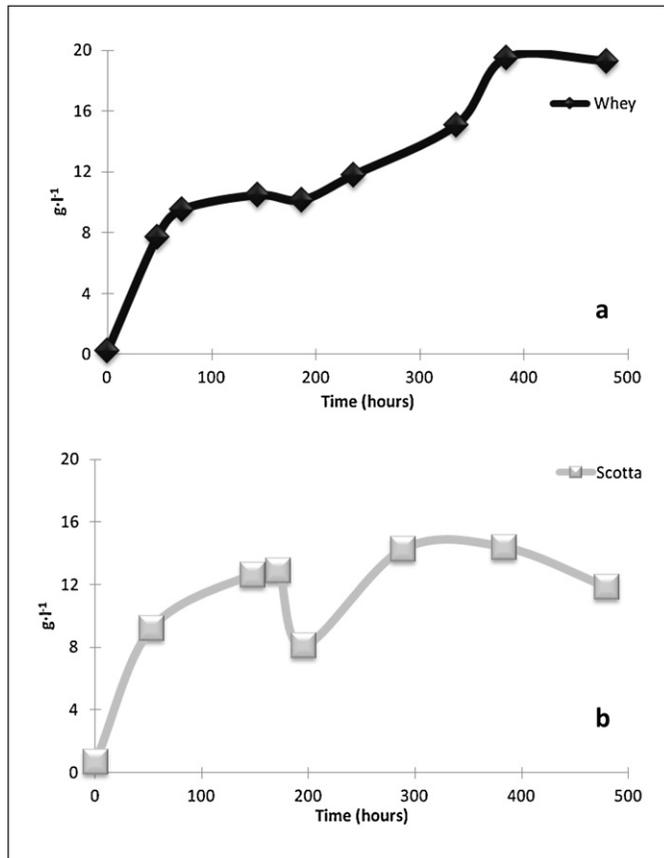
Ethanol concentration throughout the semicontinuous fermentations in the dispersed phase of whey and scotta. Fermentation conditions: temperature 28°C, stirring 400 rpm, starter inoculum 1×10^8 cell ml^{-1} . One-third of the volume of fermented medium was withdrawn and replaced with fresh medium at times: 72 hours, 163 hours, 240 hours, 330 hours, 384 hours in whey fermentations; at times 48 hours, 142 hours, 242 hours, 312 hours, 406 hours in scotta fermentations. (a) Whey; (b) scotta.

In aerobiosis ethanol was produced at very low concentrations and yields (Table 1). In anaerobiosis the highest ethanol yields were found at 28°C (Table 2). The highest ethanol concentration was 19.5 g l^{-1} in anaerobic fermentation of whey in semicontinuous packed bed reactor; very high ethanol concentrations were also reached in semicontinuous fermentations in dispersed phase of whey (19.32 g l^{-1}) and scotta (19.15 g l^{-1}) (Table 3).

The highest final residues of lactose were found in anaerobic fermentation of mix at 37°C (Table 1) and of scotta at 40°C (Table 2), 31.35 g l^{-1} and 28.66 g l^{-1} respectively. Lactose was completely consumed in whey at 28°C, while a final residue was found at 40°C, and galactose was not completely exhausted (Table 2). Both sugars were almost completely exhausted in semicontinuous fermentations (Table 3).

Discussion

In aerobic fermentations cell growth was intense and sugars were nearly completely exhausted to produce biomass (Fig. 3a), while ethanol yield was very low (Fig. 1), even if dissolved oxygen showed to drop to zero at about 38th hour (data not shown), corresponding to the maximum biomass and ethanol concentration: after that peak no more cell multiplication was observed. Moreover, the ethanol produced at the end of log phase of growth disappeared

**FIGURE 7**

Ethanol concentration throughout the semicontinuous fermentations in packed bed reactor of whey and scotta. Fermentation conditions: temperature 28°C, continuous external recirculation of fermentation medium, starter inoculum embedded in alginate beds; one-third of the volume of fermented medium was withdrawn and replaced with fresh medium at times: 72 hours, 187 hours, 336 hours in whey fermentations; at times: 120 hours, 219 hours, 288 hours, 384 hours in scotta fermentations. (a) Whey; (b) scotta.

during stationary phase, probably due to oxidative metabolism, as sterile air was delivered throughout the fermentation. That means that it is not possible to conciliate a good ethanol yield with cell physiological optimal conditions for growth.

Very high ethanol yields were reached in anaerobic fermentations, then anaerobiosis showed to be necessary to reach ethanol

production. Moreover, yeast growth showed not to be impaired by anaerobiosis in whey (Fig. 3b), maybe due to the good nutritional features of this waste for yeast cells metabolism; on the contrary in scotta yeast growth was impaired in anaerobiosis (Fig. 3a), and also ethanol concentrations reached lower levels than in whey. It is known that oxygen availability is necessary for biosynthesis of several molecules, such as unsaturated fatty acids, sterols and aminoacids [12,13]; then, when yeast cells can find these molecules in growth medium they can grow and synthesize the membrane transport proteins and the enzymes necessary to catabolize sugars. In our experiments it is evident that whey can well support these needs, while scotta, that is known to be very poor in proteins content, cannot.

This is also confirmed by the results of fermentations carried out at different temperatures, where a higher starter cell inoculum concentration was used to avoid the effect of heat stress on cell multiplication and to only check the fermentation performances of yeast cells at different temperatures. The temperature showed to strongly affect fermentation performances. In whey the highest temperature (40°C) gave rise to a very rapid achievement of the maximum ethanol concentration between the second and the third day. In scotta the alcoholic fermentation was almost completely inhibited at 40°C; the very high lactose residue at the end of fermentation indicates that this sugar was not transported into the cell to be catabolized, probably due to altered functions of plasma membranes when cells were not able to find in growth medium the nutrients necessary to adapt the membrane composition to the heat stress and were also unable to synthesize them due to anaerobiosis [12–14]. A residue of lactose was found in scotta also at the end of fermentation carried out at 28°C, while at the same temperature this sugar disappeared completely in whey; this confirms that scotta does not contain the nutrients necessary to sustain cell metabolism in anaerobiosis, while whey does.

In semicontinuous fermentations the highest ethanol concentration was reached very rapidly and it was maintained high throughout the fermentation for more than ten days, and sugars were almost completely exhausted at the end of fermentation. That means that this form of fermentation management is strongly suitable to reach the best process performances particularly for scotta, where the results were very better than in batch fermentations. This can be explained by the fact that the addition of fresh medium throughout the fermentation can act as a form of

TABLE 1

Semi-aerobic and anaerobic batch fermentations carried out at 37°C: ethanol yield, maximum ethanol concentration and lactose and galactose concentrations at the start and at the end of fermentation

	Yield ^a	Ethanol production ^b	Lactose ^c		Galactose ^c	
			Initial	Final	Initial	Final
Aerobic whey	0.14	6.22	43.94	0.90	1.28	0.40
Aerobic mix	0.10	5.36	47.98	0.00	5.91	0.00
Aerobic scotta	0.04	1.68	33.72	0.04	4.16	0.00
Anaerobic whey	0.36	15.90	44.21	2.40	3.87	1.19
Anaerobic mix	0.06	0.81	41.16	31.35	5.72	2.60
Anaerobic scotta	0.54	9.68	32.64	15.47	1.18	0.33

^a Yield: maximum ethanol concentration/(lactose + galactose)_i – (lactose + galactose)_f.

^b Ethanol production: maximum ethanol concentration detected throughout the fermentation (g l⁻¹).

^c Lactose and galactose concentration (g l⁻¹).

TABLE 2

Anaerobic batch fermentations at different temperatures: ethanol yield, maximum ethanol concentration and lactose and galactose concentrations at the start and at the end of fermentation

	Yield ^a	Ethanol production ^b	Lactose ^c		Galactose ^c	
			Initial	Final	Initial	Final
Whey 40°C	0.32	14.91	43.68	9.26	15.67	4.23
Scotta 40°C	0.04	0.25	34.62	28.66	0.33	0.23
Whey 28°C	0.37	17.04	43.55	0.00	5.60	3.54
Scotta 28°C	0.54	15.00	39.27	11.38	0.12	0.13

^a Yield: maximum ethanol concentration/(lactose + galactose)_i – (lactose + galactose)_f.

^b Ethanol production: maximum ethanol concentration detected throughout the fermentation (g l⁻¹).

^c Lactose and galactose concentration (g l⁻¹).

TABLE 3

Semicontinuous fermentations: maximum ethanol concentration and lactose and galactose concentrations at the start and at the end of semicontinuous fermentations

	Ethanol production ^a	Lactose ^b		Galactose ^b	
		Initial	Final	Initial	Final
Whey dispersed phase	19.32	42.38	0.58	0.75	0.00
Scotta dispersed phase	19.15	40.38	0.01	0.33	0.02
Whey packed bed reactor	19.50	42.38	0.53	0.42	0.00
Scotta packed bed reactor	14.39	40.38	0.02	0.22	0.00

^a Ethanol production: maximum ethanol concentration detected throughout the fermentation (g l⁻¹).

^b Lactose and galactose concentration (g l⁻¹).

fed-batch fermentation, in which nutrients, and mainly oxygen with them, are frequently added allowing a better physiological state maintenance of cells.

The use of embedded yeast cells did not improve the results; as the final goal is the ethanol distillation, before which the biomass separation is not necessary, this kind of fermentation management did not give rise to any improvement.

Conclusions

Both whey and scotta showed to be suitable for bioethanol production. Anaerobic fermentation of whey can easily be managed in several ways, always reaching good results, while scotta, that has not sufficient features as growth medium due to lack of nutrients necessary to yeast cells for anaerobic metabolism, can give rise to good fermentation performances only in semicontinuous fermentations.

In general, the best performances were reached at low temperatures (28°C), but high temperatures allow good ethanol yields in short times in whey fermentations: in particular, batch anaerobic

fermentation carried out at 40°C with high biomass inoculum showed the best performances.

The production of bioethanol from scotta can be considered a very good opportunity, as nowadays this effluent is considered just a waste without other possible destinations.

Aerobic fermentations of whey and scotta are not suitable for bioethanol production; however, a different goal could be the production of microbial biomasses, contemporarily allowing the waste purification, then the reduction of their environmental impact and disposal costs.

Finally, using whey and scotta as growth media for biotechnological transformations is an important chance which can allow us to improve the added value of agroindustrial processes, contemporarily reducing the effluents disposal costs.

Acknowledgements

We thank Azienda Cascina Fontana Cervo–Villastellone (Torino), in particular Mr Giovanni Crivello, for collaboration and helpfulness.

References

- [1] Zafar S, Owais M, Saleemuddin M, Husai S. Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. *International Journal of Food and Science and Technology* 2005;40:597–604.
- [2] Ozmihi S, Kargi F. Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution. *Letters in Applied Microbiology* 2007;44:602–6.
- [3] Guimaraes PMR, Teixeira JA, Domingues L. Fermentation of lactose to bioethanol by yeast as part of integrated solutions for valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances* 2010;25:375–84.
- [4] Grba S, Stehlink-Tomas V, Stanzer D, Vahčić, Škrilin A. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 2002;16(1):13–6.
- [5] Rech R, Cassini CF, Secchi AR, Ayub MAZ. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for the production of beta-galactosidase by *K. marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1999;23:91–6.
- [6] Foda MI, Joun H, Li Y. Study the suitability of cheese whey for bio-butanol production by clostridia. *Journal of American Science* 2010;6(8):39–46.
- [7] Sansonetti S, Curcio S, Calabrò V, Iorio G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an affective alternative non-vegetable sources. *Biomass and Bioenergy* 2009;33:1687–92.

- [8] Graciano-Fonseca G, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;79:339–54.
- [9] Anderson PJ, McNeil K, Watson K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperature above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and Environmental Microbiology* 1986; 51:1314–20.
- [10] Mahoney RR, Nickerson TA, Whitaker JR. Selection of strain, growth condition, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Dairy Science* 1975;58(11):1620–9.
- [11] Panesar PS. Kinetic analysis of lactose hydrolysis in milk using *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized by alginate and agar gel entrapment. *International Journal of Dairy Science* 2007;2(2):138–44.
- [12] Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, et al. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International Journal of Food Microbiology* 2008;121(1):84–91.
- [13] Zara G, Angelozzi D, Belviso S, Bardi L, Goffrini P, Lodi T, et al. Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS Yeast Research* 2009;9:217–25.
- [14] Belviso S, Bardi L, Biondi Bartolini A, Marzona M. Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Canadian Journal of Microbiology* 2004; 50(9):657–67.