

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Conversione di biomassa in acido lattico
tramite reattore a microonde e
fermentazione batterica**



Relatore

prof. Francesca Bosco

Candidato

Giacomo Cintorrino

Dicembre 2017

Indice

| | |
|--|----|
| 1. Introduzione | 1 |
| 1.1 Acido polilattico | 1 |
| 1.1.1 Proprietà | 1 |
| 1.1.2 Applicazioni | 2 |
| 1.1.3 Produzione | 2 |
| 1.2 Acido lattico | 2 |
| 1.2.1 Applicazioni | 2 |
| 1.2.2 Produzione | 3 |
| 1.3 Materie prime rinnovabili | 3 |
| 1.3.1 Monosaccaridi e disaccaridi | 3 |
| 1.3.2 Substrati polimerici | 3 |
| 1.3.2.1 Amilacei | 4 |
| 1.3.2.2 Lignocellulosa | 4 |
| 1.4 Idrolisi | 5 |
| 1.4.1 Prodotti dell'idrolisi | 5 |
| 1.4.2 Idrolisi chimica | 6 |
| 1.4.3 Idrolisi enzimatica | 7 |
| 1.4.4 SHF e SSF | 8 |
| 1.5 Fermentazione | 9 |
| 1.5.1 Batteri | 9 |
| 1.5.1.1 LAB | 9 |
| 1.5.1.2 <i>Bacillus</i> | 10 |
| 1.5.1.3 <i>E. coli</i> e <i>C. glutamicum</i> | 10 |
| 1.5.2 "Pathways" metabolici | 11 |
| 1.5.3 Funghi | 12 |
| 1.5.4 Processi di fermentazione | 12 |
| 1.5.5 Recupero acido lattico | 13 |
| 1.6 Scopo del lavoro | 14 |
| 2. Materiali e metodi | 15 |
| 2.1 Reagenti | 15 |
| 2.1.1 Xilano | 15 |
| 2.1.2 Guscio di noce | 16 |
| 2.2 Strumentazione | 16 |
| 2.2.1 Reattore a microonde | 16 |
| 2.2.2 TOC, HPLC e spettrofotometro | 17 |
| 2.3 Curva di calibrazione della soluzione standard | 17 |
| 2.4 Idrolisi di xilano in reattore a microonde | 18 |
| 2.5 Idrolisi del guscio di noce in reattore a microonde | 18 |
| 2.6 Fermentazione batterica | 19 |
| 2.6.1 Microrganismi | 19 |
| 2.6.2 Preparazione del medium di fermentazione | 19 |
| 2.7 Fermentazione di xilosio commerciale con <i>Lactobacillus delbrueckii delbrueckii</i> CECT 286 | 21 |
| 2.7.1 Riattivazione del batterio congelato | 21 |
| 2.7.2 Inoculo del medium di fermentazione | 22 |
| 2.8 Fermentazione xilosio commerciale con <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 | 22 |
| 2.8.1 Riattivazione del batterio liofilizzato | 22 |
| 2.8.2 Inoculo del medium di fermentazione | 22 |

| | |
|--|----|
| 2.9 Fermentazione xilosio commerciale con <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 | 23 |
| 2.9.1 Riattivazione del batterio liofilizzato | 23 |
| 2.9.2 Inoculo del medium di fermentazione | 23 |
| 2.10 Fermentazione xilosio da idrolisi con <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 | 25 |
| 2.10.1 Preparazione medium di fermentazione | 25 |
| 2.10.2 Inoculo del medium di fermentazione | 25 |
| 3. Risultati e discussione | 27 |
| 3.1 Curva di calibrazione della soluzione standard | 27 |
| 3.2 Idrolisi di xilano in reattore a microonde | 28 |
| 3.3 Idrolisi del guscio di noce in reattore a microonde | 28 |
| 3.3.1 Prodotti di idrolisi ottenuti | 28 |
| 3.3.2 Influenza della dimensione dei granuli sulla composizione dell'idrolizzato | 29 |
| 3.3.3 Influenza della temperatura sulla composizione dell'idrolizzato | 30 |
| 3.3.4 Influenza del tempo di esposizione sulla composizione dell'idrolizzato | 31 |
| 3.3.5 Resa di conversione della emicellulosa | 32 |
| 3.4 Fermentazione di xilosio commerciale con <i>Lactobacillus delbrueckii delbrueckii</i> CECT 286 | 35 |
| 3.4.1 Fermentazione 1 | 35 |
| 3.5 Fermentazione di xilosio commerciale con <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 | 36 |
| 3.5.1 Fermentazione 2 | 36 |
| 3.5.2 Fermentazione 7 | 38 |
| 3.5.3 Fermentazione 8 | 39 |
| 3.6 Fermentazione di xilosio commerciale con <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 | 41 |
| 3.6.1 Fermentazione 12 | 41 |
| 3.6.2 Fermentazione 13 | 42 |
| 3.6.3 Fermentazione 14 e 15 | 44 |
| 3.7 Fermentazione di xilosio da idrolisi con <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 | 46 |
| 3.7.1 Fermentazione 16 | 46 |
| 3.7.2 Fermentazione 17 | 48 |
| 3.7.3 Confronto tra le fermentazioni 15 e 16 | 49 |
| 3.7.4 Confronto tra le fermentazioni 16 e 17 | 50 |
| 4. Conclusioni | 51 |
| 5. Bibliografia | 53 |
| 6. Appendice | 57 |

1. Introduzione

1.1 Acido polilattico

L'acido polilattico (PLA) è un poliestere alifatico prodotto per polimerizzazione di acido lattico ed è il biopolimero più studiato ed utilizzato di sempre (Farah *et al.*, 2016). Nel 2016 la sua produzione ha raggiunto quasi 600.000 tonnellate (Tabella 1.1) e nel 2024, secondo una ricerca di mercato pubblicata da Global Market Insights (2016), si raggiungeranno 1.600.000 tonnellate annue. Nel corso degli ultimi 25 anni, le relative pubblicazioni hanno subito un incremento esponenziale (Castro-Aguirre *et al.*, 2016), con 4000 articoli pubblicati solamente nel 2017, valore ottenuto da ScienceDirect utilizzando come keyword poly(lactic acid) e polylactide.

Tabella 1.1 Produzione mondiale PLA, tratta da Wong *et al.* (2016) con modifiche

| Azienda | Sede | Produzione annuale (tonnellate) |
|------------------------------|-------------|---------------------------------|
| Cargill Dow Cargill LLC | USA, Asia | 450.000 |
| Synbra | Paesi Bassi | 5.000 |
| Solanyl | Paesi Bassi | 40.000 |
| Sulzer | Svizzera | 1.300 |
| Futtero | Germania | 300 |
| Pyramid & German Bioplastics | Germania | 60.000 |
| Inventa Fischer | Germania | 25.000 |
| Teijin | Giappone | 1.000 |
| Haizheng | China | 15.000 |

1.1.1 Proprietà

Il merito di tale interesse è dovuto ai numerosi vantaggi che rendono il PLA il biopolimero più promettente in ambito medico e industriale, proponendosi come futura alternativa ai polimeri di origine petrolchimica. È biodegradabile, riciclabile e compostabile. Viene prodotto a partire da fonti rinnovabili ed inoltre la sua produzione porta al consumo di anidride carbonica (Vink e Davies, 2015).

Viene impiegato in ambito biomedico ormai da diversi anni in quanto è stato provato essere biocompatibile e sicuro (Ramot *et al.*, 2016). Esso infatti, quando impiantato in organismi viventi, idrolizza formando α -idrossiacido, il quale può essere degradato nel ciclo degli acidi tricarbossilici ed escreto (Farah *et al.*, 2016). È stato dichiarato Generally Recognized as Safe (GRAS) dalla United State Food and Drug Administration (FDA), cosa che ha incrementato il suo utilizzo in ambito medico e nel packaging di prodotti alimentari.

Rispetto agli altri biopolimeri in commercio presenta la migliore processabilità termica. Il PLA infatti è compatibile con processi quali formatura per soffiaggio e per iniezione, termoformatura, filatura ed estrusione. Anche i costi energetici di produzione sono un punto a vantaggio di questo polimero: Farah *et al.* (2016) riportano che la produzione di PLA richiede il 25-55 % in meno di energia rispetto ai polimeri derivati dal petrolio. Considerando che gli impianti di produzione di PLA sono ancora relativamente recenti, le prospettive di miglioramento dell'efficienza energetica sono notevoli.

1.1.2 Applicazioni

Inizialmente il PLA è stato utilizzato per scopi medici quali la realizzazione di tessuti ingegnerizzati, protesi, punti di sutura riassorbibili e sistemi di drug delivery (Ramot *et al.*, 2016). Con il miglioramento tecnologico e la riduzione dei costi le possibilità applicative del PLA si sono allargate anche a livelli di beni di largo consumo come buste compostabili, bottiglie, stoviglie usa e getta, tappezzeria, capi di abbigliamento ed ancora applicazioni in elettronica e automotive (Wong *et al.*, 2016).

La limitazione principale nell'uso del PLA è legata alle sue proprietà termo-meccaniche, infatti presenta una bassa stabilità termica ed è un materiale molto fragile, con un allungamento a rottura minore del 10%. Per ovviare a tale problema viene spesso copolimerizzato con acidi idrossialcanoati o miscelato con altri polimeri, cariche o plasticizzanti, ampliandone il campo applicativo (Ramot *et al.*, 2016).

1.1.3 Produzione

Il PLA venne sintetizzato per la prima volta nel 1932, tramite riscaldamento sottovuoto di acido lattico e contemporanea rimozione dell'acqua condensata. Ad oggi le principali soluzioni industriali che permettono l'ottenimento del biopolimero a partire da acido lattico sono la policondensazione, la polimerizzazione per apertura dell'anello e i metodi diretti quali la disidratazione isotropica e la polimerizzazione enzimatica.

1.2 Acido lattico

1.2.1 Applicazioni

L'attuale sviluppo del mercato di acido lattico è principalmente dovuto al suo impiego nella produzione di PLA, ma sono molti altri i campi in cui trova applicazione. Ad esempio, nell'industria alimentare viene impiegato come acidificante, disinfettante, conservante o ancora per la sua azione aromatizzante (Wang *et al.*, 2015); nell'industria cosmetica e farmaceutica invece, viene impiegato per la sua azione idratante e antimicrobica (Castillo Martinez *et al.*, 2013), nella sintesi di farmaci e per combattere l'osteoporosi (Bai *et al.*, 2004).

1.2.2 Produzione

L'acido lattico può essere prodotto industrialmente per sintesi chimica o per via biologica tramite processi fermentativi.

Il metodo più comune per la sintesi chimica di acido lattico si effettua a partire da acetaldeide, operando ad alta pressione per averla in fase liquida. Questa viene messa a reagire con acido cianidrico ed in presenza di una base si ottiene lattonitrile il quale, dopo essere stato purificato per distillazione, viene idrolizzato in acido lattico tramite l'impiego di un acido forte (Castillo Martinez *et al.*, 2013). Altre vie di sintesi sono la degradazione catalitica di zuccheri, l'ossidazione di glicole propilenico e l'idrolisi dell'acido cloro propionico, tra le altre. I maggiori svantaggi della sintesi chimica consistono nell'utilizzo di fonti di origine petrolchimica e nella possibilità di ottenere esclusivamente una miscela racemica di acido D-L-lattico.

La fermentazione, invece, non solo permette di ottenere acido D(-)-lattico o L(+)-lattico otticamente puri (Jamshidian *et al.*, 2010) ma permette anche l'utilizzo di fonti rinnovabili. Questo, sommato al fatto che il PLA presenta migliori caratteristiche se ottenuto a partire dall'enantiomero puro (Lasprilla *et al.*, 2012), spiega il motivo per cui ad oggi circa il 90% dell'acido lattico è prodotto per fermentazione microbica (Wang *et al.*, 2015).

1.3 Materie prime rinnovabili

Wang *et al.* (2015) riportano che fino al 2010 il costo delle materie prime utilizzate nella fermentazione per produrre acido lattico contavano per quasi il 35% del costo totale. Negli ultimi anni invece la sperimentazione di materie prime "low cost" ha permesso di abbattere notevolmente i costi e rendere il processo maggiormente competitivo. Fra queste, le risorse più utilizzate sono mono e disaccaridi oppure substrati polimerici di origine naturale.

1.3.1 Monosaccaridi e disaccaridi

Sono costituiti principalmente da scarti dell'industria alimentare come melassa e siero di latte (Castillo Martinez *et al.*, 2013), sostanze ad alto contenuto di pentosi, esosi o in generale zuccheri direttamente metabolizzabili dai microrganismi. Gli estratti da succhi di frutta sono un altro esempio di materie prima ad alto contenuto zuccherino.

1.3.2 Substrati polimerici

Per quanto riguarda invece la seconda categoria, i substrati polimerici sono tutte quelle materie prime contenenti zucchero non immediatamente accessibile e dunque non sono direttamente metabolizzabili. Si possono dividere in due categorie, gli amilacei e la lignocellulosa.

1.3.2.1 Amilacei

Gli amilacei come patata, mais, grano e riso, sono costituiti da amido, un polisaccaride contenente 20 o più unità di glucosio. Come riportato da Castillo Martinez *et al.* (2013), è possibile ottenere una soluzione di glucosio a partire da amido tramite liquefazione e successiva saccarificazione tramite l'enzima α -amilasi. La soluzione ottenuta può essere utilizzata come substrato da fermentare per produrre acido lattico. In alternativa esistono alcuni microorganismi, come il fungo del genere *Rhizopus*, capaci di metabolizzare l'amido direttamente perché in grado di produrre l'enzima amilasi.

1.3.2.2 Lignocellulosa

La biomassa lignocellulosica è la risorsa rinnovabile più abbondante del pianeta (Cai *et al.*, 2017) e per questo motivo ha attratto su di sé enorme interesse come potenziale alternativa alle fonti di origine fossile (Yan *et al.*, 2017). La lignocellulosa utilizzata in ambito industriale deriva principalmente da residui agricoli, forestali ed industriali, materie prime che hanno come vantaggi il basso costo e non sottraggono terreno utile alla coltivazione di biomasse edibili.

La lignocellulosa è l'elemento costitutivo della parete cellulare nelle piante ed è formata principalmente da cellulosa, emicellulosa e lignina, oltre che da una piccola quantità di acqua, ceneri e sostanze volatili. La specifica composizione della biomassa lignocellulosica (Tabella 1.2) dipende dal tipo di pianta, dal suo stadio di crescita ed ancora dall'ambiente in cui si sviluppa (Shrestha *et al.*, 2017).

Tabella 1.2 Composizione biomasse lignocellulosiche, da Verardi *et al.* (2012) con modifiche

| Biomassa lignocellulosica | Cellulosa (%) | Emicellulosa (%) | Lignina (%) |
|----------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|
| Pannocchia di mais | 45 | 35 | 15 |
| Piante erbacee | 25-40 | 35-50 | 10-30 |
| Paglia di grano | 30 | 50 | 15 |
| Cotone | 80-95 | 5-20 | 0 |
| Guscio di noce | 25-30 | 25-30 | 30-40 |
| Carta | 85-99 | 0 | 0-15 |
| Foglie | 15-20 | 80-85 | 0 |

La cellulosa è costituita da unità di D-glucosio legate fra loro tramite legame β -1,4 a formare catene lineari. Queste, in seguito alla presenza di gruppi ossidrilici (Seidl e Goulart, 2016), sono impaccate insieme, tramite legami ad idrogeno e di van der Waals, formando micro fibrille (Verardi *et al.*, 2012). I legami ad idrogeno tra le catene sono responsabili della struttura compatta e cristallina della cellulosa, conferendo elasticità alle fibre vegetali (Ricci *et al.*, 2001).

L'emicellulosa è un polisaccaride con catene ramificate e più corte rispetto alla cellulosa. È costituita da zuccheri pentosi (xilosio e arabinosio) ed esosi (glucosio, mannosio, galattosio) e generalmente contiene anche gruppi acetile (Jönsson *et al.*, 2013). In particolare si distingue in *hardwood* e *softwood*: nei primi l'emicellulosa è costituita essenzialmente da xilosio, mentre nei *softwood* prevalgono gli zuccheri a 6 atomi di carbonio (Ricci *et al.*, 2001). L'emicellulosa permette la coesione fra cellulosa e lignina ed insieme a quest'ultima ricopre le microfibrille di cellulosa.

La lignina, invece, è un polimero complesso di natura aromatica che, oltre a svolgere una funzione strutturale nella pianta conferendole rigidità, ne migliora la resistenza alla degradazione microbica ed enzimatica (Shrestha *et al.*, 2017). Lo schema della struttura macromolecolare della lignocellulosa è rappresentato in Figura 1.1.

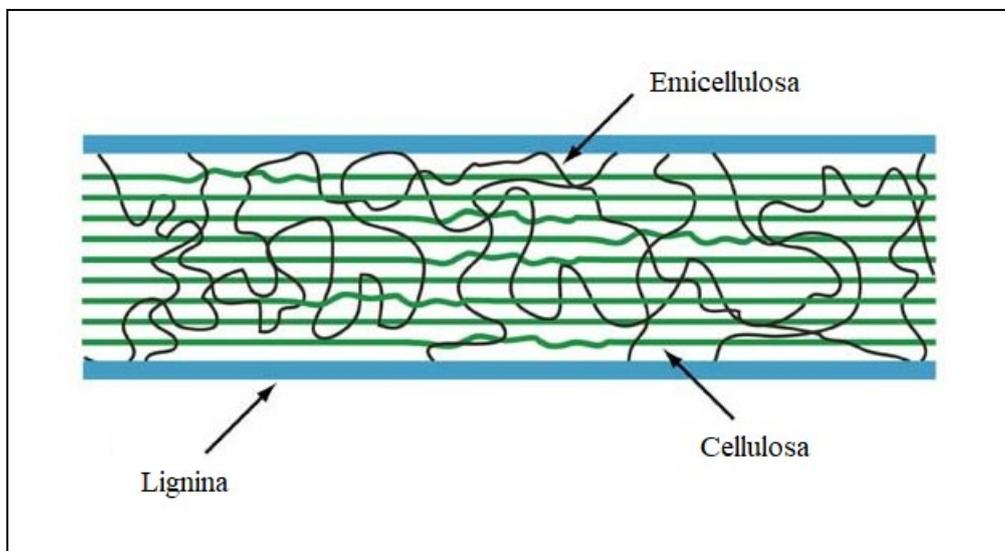


Figura 1.1 Struttura lignocellulosa, modificata da Microbewiki.kenyon.edu (2012)

1.4 Idrolisi

La lignocellulosa tal quale non è utilizzabile come substrato di fermentazione ma può essere valorizzata tramite *idrolisi*, un processo di depolimerizzazione che permette di trasformare i polisaccaridi della lignocellulosa in zuccheri semplici e fermentabili.

L'emicellulosa è più facilmente idrolizzabile della cellulosa, in quanto quest'ultima presenta maggiore cristallinità e grado di polimerizzazione. Invece, il legame etere e il legame C-C presenti nella lignina non sono suscettibili ad idrolisi (Shrestha *et al.*, 2017) e di conseguenza, dopo l'idrolisi dei polisaccaridi, la lignina rimane come residuo solido e solo una piccola parte viene degradata in fenoli o altri composti aromatici (Jönsson *et al.*, 2013).

1.4.1 Prodotti dell'idrolisi

Se in seguito all'idrolisi della cellulosa ed emicellulosa si ottengono rispettivamente glucosio e xilosio e/o altri zuccheri (mannosio, galattosio, arabinosio), la degradazione degli zuccheri a

loro volta porta alla formazione di sostanze come idrossimetilfurfurale (HMF), furfurale e acidi alifatici come l'acido levulinico, formico e acetico (Figura 1.2). Generato in seguito all'idrolisi dei gruppi acetile presenti nell'emicellulosa, l'acido acetico assume un ruolo importante ai fini della reazione in quanto, svolgendo un'azione di catalisi acida, aumenta la velocità di idrolisi dei carboidrati lignocellulosici (Yan *et al.*, 2017). Jönsson *et al.*, (2013) riporta che furfurale e HMF derivano dalla disidratazione rispettivamente di pentosi ed esosi e sono sostanze capaci di inibire la crescita microbica. Anche gli acidi formico e levulinico presentano effetti di tossicità microbica; l'acido formico viene prodotto in seguito alla degradazione termochimica acido-catalizzata di furfurale e HMF, mentre l'acido levulinico deriva dalla degradazione del solo HMF. Oltre alle sostanze precedentemente citate, l'idrolizzato può contenere sostanze aromatiche, le quali vengono rilasciate dalla lignina contenuta nella biomassa sottoposta ad idrolisi.

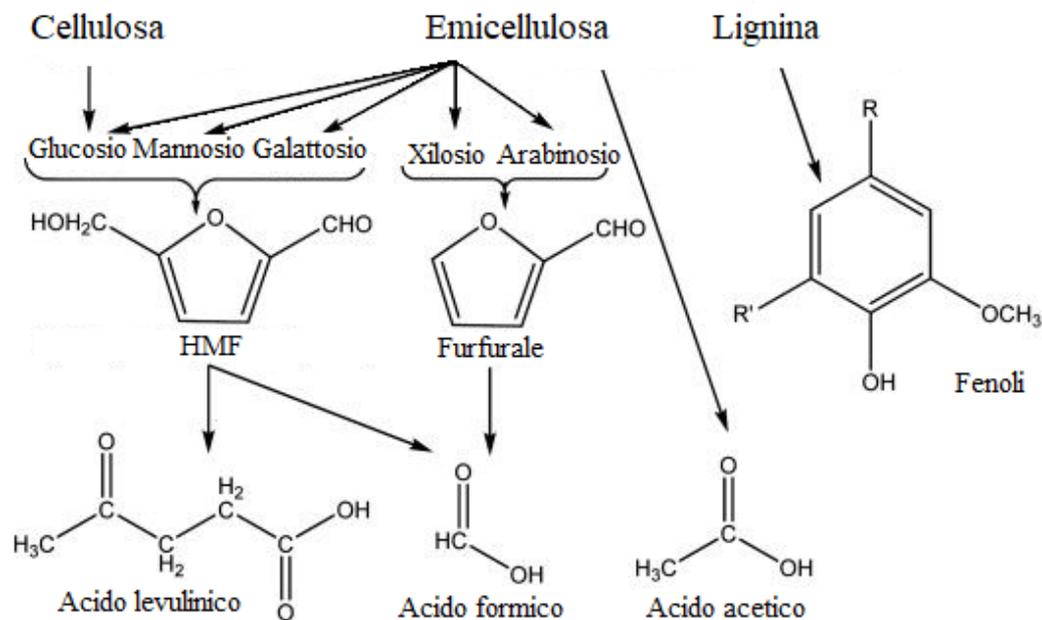


Figura 1.2 Prodotti di idrolisi della lignocellulosa, modificata da Jönsson *et al.* (2013)

1.4.2 Idrolisi chimica

Si realizza utilizzando acidi forti, i quali sono capaci di penetrare all'interno della struttura lignocellulosica e successivamente degradare cellulosa ed emicellulosa, formando i rispettivi zuccheri costituenti. Gli acidi più comunemente utilizzati sono l'acido solforico e cloridrico, ma possono anche esserne utilizzati altri come fluoridrico, formico, nitrico e fosforico (Verardi *et al.*, 2012).

Il quantitativo di acido utilizzato permette due alternative: idrolisi con acidi concentrati e idrolisi con acidi diluiti. L'utilizzo di acidi concentrati permette di raggiungere valori elevati

di conversione e di lavorare a basse temperature con conseguente riduzione dei costi di processo. Tuttavia, l'elevato impatto ambientale dei reflui e la necessità di realizzare gli impianti in materiali resistenti alla corrosione sono notevoli svantaggi che ne limitano l'utilizzo.

Al contrario, l'idrolisi con acidi diluiti elude problemi di corrosione ma necessita di temperature più elevate al fine di raggiungere una conversione sufficiente. Inoltre le temperature elevate possono portare ad una eccessiva degradazione della emicellulosa che causa non solo la perdita di zuccheri fermentabili ma anche la produzione di sostanze tossiche per i microrganismi impiegati nel successivo step di fermentazione.

1.4.3 Idrolisi enzimatica

L'idrolisi per via biologica della lignocellulosa è catalizzata da enzimi extracellulari quali cellulasi ed emicellulasi (Shtresha *et al.*, 2017). Gli enzimi cellulasi sono prodotti principalmente da batteri anaerobici appartenenti all'ordine dei *Clostridiales* e al genere *Ruminococcus*, e da alcuni funghi del genere *Neocalimastix*, *Piromyces* e *Orpinomyces* (Shtresha *et al.*, 2017). Le emicellulasi invece sono prodotti da ceppi batterici come *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces halstedii*, *Dictyoglomus thermophilum* e *Thermobacillus xylanolyticus* (Maki *et al.*, 2009).

Questa tecnica di idrolisi presenta numerosi vantaggi, infatti, se paragonata con l'idrolisi acida, l'impatto ambientale è molto basso e le condizioni di processo sono meno severe. Inoltre l'elevata specificità degli enzimi evita la produzione di composti tossici per il microrganismo fermentante come furfurale, idrossimetilfurfurale e composti fenolici (Verardi *et al.*, 2012; Shtresha *et al.*, 2017). Tali caratteristiche rendono l'idrolisi enzimatica fra le tecniche più interessanti, tuttavia a livello industriale la sua applicazione è ancora limitata dagli elevati costi di produzione e purificazione degli enzimi e dalla loro elevata suscettibilità alle variazioni di pH e temperatura durante il processo (Gavilà *et al.*, 2015).

Inoltre, le rese di conversione di un materiale lignocellulosico sottoposto tal quale ad idrolisi enzimatica risultano essere molto basse. Ricci *et al.* (2001) riportano valori intorno al 10% ed afferma che tale inefficienza vada attribuita alla dimensione degli enzimi: la matrice lignocellulosica infatti risulta molto compatta per via del fatto che cellulosa, emicellulosa e lignina sono fra loro ben cementate e di conseguenza gli enzimi, per effetto di ingombro, non riescono a penetrare.

Per ottenere rese sufficientemente elevate è necessario dunque l'impiego di pretrattamenti, capaci di rimuovere parzialmente lo strato di lignina che ricopre i polisaccaridi e di sciogliere i domini cristallini della cellulosa (Verardi *et al.*, 2012). In questo modo viene incrementata la permeabilità della lignocellulosa e l'accessibilità degli enzimi verso la cellulosa e l'emicellulosa (Seidl e Goulart, 2015). L'effetto del pretrattamento sulla struttura della lignocellulosa è illustrato in Figura 1.3.

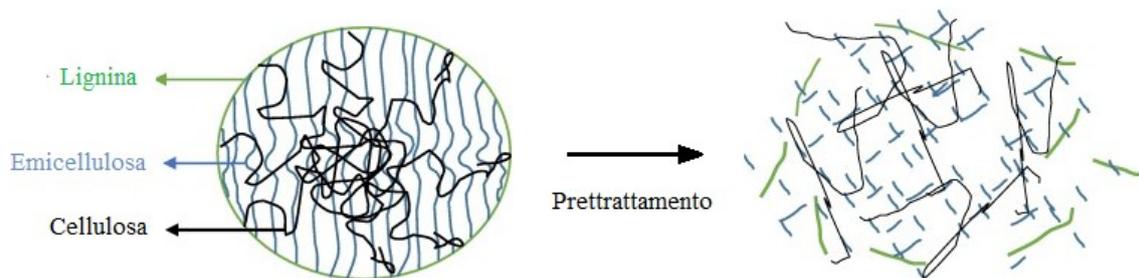


Figura 1.3 Effetto del pretrattamento sulla struttura lignocellulosica, modificata da Veluchamy e Kalamdhad (2017)

Il pretrattamento porta ad un incremento dei tempi e costi di processo e va scelto in maniera opportuna in funzione della biomassa utilizzata; gioca un ruolo molto importante ai fini della qualità e quantità di idrolizzato disponibile nella successiva fermentazione. Le tecniche disponibili si suddividono in pretrattamenti fisici, chimici, biologici, elettrici o una loro combinazione (Verardi *et al.*, 2012).

1.4.4 SHF e SSF

Idrolisi e fermentazione possono essere effettuate separatamente o simultaneamente. Il primo metodo, identificato con SHF (separate hydrolysis and fermentation), è il più semplice per quanto riguarda l'ottimizzazione del processo, infatti, temperatura, pH e tempi di trattamento del processo di idrolisi possono essere ottimizzati indipendentemente dalle condizioni adottate nella fermentazione.

Il metodo SSF (simultaneous saccharification and fermentation) viene prevalentemente applicato nel caso di idrolisi enzimatica ed è dunque effettuato dopo il pretrattamento. La SSF riduce il processo ad un singolo "step" ed è quindi necessario un solo reattore, con conseguente diminuzione dei costi. Inoltre permette di superare il problema legato alla sensibilità degli enzimi idrolitici agli zuccheri prodotti durante la reazione, i quali vengono continuamente convertiti dal microrganismo fermentante. Il principale svantaggio di questa tecnica sta nel fatto che le condizioni di processo devono essere definite trovando un compromesso fra idrolisi e fermentazione e di conseguenza l'ottimizzazione risulta molto difficile: le condizioni ideali per enzimi e batteri possono essere molto diverse. Inoltre, a differenza della SHF, il residuo solido rimane all'interno del reattore per tutto il processo e verrebbe ad accumularsi nel caso di un processo continuo (Verardi *et al.*, 2012). Di conseguenza, a meno di particolari accorgimenti, la SSF è applicabile esclusivamente ad un processo "batch".

1.5 Fermentazione

Il processo fermentativo richiede la preparazione del medium di fermentazione, una soluzione contenente il substrato carbonioso e i nutrienti essenziali alla crescita microbica come azoto, fosforo e altri macro e microelementi. Questa viene poi inoculata con il microrganismo selezionato. Alla base del processo vi sono diversi parametri operativi da tenere in considerazione come pH, temperatura, aerobiosi o anaerobiosi, dai quali dipendono crescita e produttività del microrganismo scelto.

Batteri e funghi filamentosi sono i microorganismi più studiati nella produzione di acido lattico tramite fermentazione, seguiti da lieviti, cianobatteri e microalghe. A livello industriale, batteri e funghi filamentosi dominano il mercato. Questi possono essere utilizzati singolarmente o insieme in modo tale da combinarne le capacità produttive e migliorare la resa di fermentazione. Per esempio, funghi filamentosi e batteri possono essere utilizzati nella SSF per sfruttare la capacità idrolitica dei primi e fermentativa dei secondi, oppure due o più specie batteriche diverse possono essere combinate per fermentare substrati complessi, in cui una sia capace di metabolizzare zuccheri esosi e una i pentosi. Un altro modo per migliorare le rese di fermentazione è quello di utilizzare microrganismi ingegnerizzati, ai quali si apportano modifiche del DNA al fine di modificarne i “pathway” metabolici.

1.5.1 Batteri

I batteri maggiormente utilizzati nella fermentazione di acido lattico sono: batteri LAB (lactic acid bacteria), *Bacillus* sp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium glutamicum* (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Sono anaerobi aerotolleranti, cioè crescono in condizioni anaerobiche ma, grazie alla perossidasi, sono protetti da molecole altamente reattive che si formano in presenza di ossigeno, come il perossido di idrogeno (Ghaffar *et al.*, 2014).

1.5.1.1 LAB

I LAB sono batteri gram positivi, capaci di produrre acido lattico con alte resa e produttività. Sono ritenuti batteri sicuri a livello industriale e le condizioni ottimali di crescita, che dipendono dal ceppo batterico considerato, variano in generale in un range di 3.5-10 per il pH e 5-45°C per la temperatura (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

In base al prodotto di fermentazione, i LAB possono essere classificati in omofermentanti o eterofermentanti. Mentre i primi producono acido lattico come unico prodotto finale, gli eterofermentanti producono anche altri sottoprodotti come l'acido acetico o l'etanolo. La resa maggiore è il motivo per cui gli omofermentanti sono gli unici ad essere utilizzati a livello industriale.

Il problema principale dei LAB è il costo del medium di fermentazione. Essi necessitano infatti di nutrienti complessi, a causa della loro limitata abilità nel sintetizzare fattori di crescita come vitamine B e amminoacidi (Wee *et al.*, 2006). A livello commerciale, i LAB più importanti appartengono al genere *Lactobacillus*, grazie alla loro elevata tolleranza ad ambienti acidi (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

1.5.1.2 *Bacillus*

L'utilizzo dei *Bacillus* nella fermentazione di acido lattico ha origini più recenti rispetto ai LAB, grazie all'isolamento dal suolo di nuovi batteri con ottime capacità produttive. Fra questi abbiamo specie come *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*.

Se confrontati con i LAB, questi batteri presentano alcuni importanti vantaggi nella produzione di acido lattico come la termofilia, che permette di condurre la fermentazione a temperature più elevate riducendo il rischio di contaminazione. Ad esempio, alcuni ceppi di *Bacillus* sp. e di *Bacillus coagulans* hanno come temperature ottimali di crescita rispettivamente $T \geq 50^\circ\text{C}$ (Abdel-Rahman *et al.*, 2013) e $T=55^\circ\text{C}$ (Otto, 2004). Inoltre, non necessitano di un medium complesso: van der Pol *et al.* (2016), Otto *et al.* (2004) e Ye *et al.* (2013) riportano l'utilizzo di un mineral salt medium con aggiunta di 10-20 g/L di estratto di lievito. In ultimo, ma non per importanza, sono capaci di metabolizzare gli zuccheri pentosi mediante la via omolattica (via del pentosio fosfato), la quale permette una resa teorica di acido lattico da pentosio pari al 100%. I batteri LAB, invece, o non sono capaci di metabolizzare xilosio o lo fermentano mediante la via eterolattica (via della fosfochetolasi) (Castillo Martinez *et al.*, 2013), la quale permette una resa teorica massima del 60% (Ye *et al.*, 2013).

Di conseguenza, i batteri del genere *Bacillus* sono più indicati nella metabolizzazione di lignocellulosa ad alto contenuto emicellulosico, grazie alla loro capacità di fermentare esosi e pentosi mediante la via omolattica. Inoltre, il medium di fermentazione è meno costoso e non è necessario sterilizzarlo, grazie al fatto che le temperature di processo superano i 50°C .

Fra i risultati più importanti, Meng *et al.* (2012) riportano di avere ottenuto 225 g/l di acido L-lattico, con una resa di acido lattico da xilosio $Y_{AL/S}$ di 0.993 g/g e una purezza ottica del 99.9%, utilizzando *Bacillus* sp. WL-S20 in una fermentazione fed-batch. Ye *et al.* (2013), tramite *Bacillus coagulans* C106 in una fermentazione fed-batch, hanno prodotto acido L-lattico otticamente puro al 99.6%, ad una concentrazione di 212 g/l e una produttività di 4 g/l/h.

1.5.1.3 *E. coli* e *C. glutamicum*

E. coli e *C. glutamicum* sono gli altri due batteri utilizzati nella produzione di acido lattico. Sono capaci di una veloce riproduzione e non richiedono terreni complessi, ma non generano acido lattico come unico prodotto di fermentazione. La forma wild-type di *E. coli* produce una miscela di etanolo e acidi organici quali acido lattico, acetico e succinico. È stato dunque necessario ingegnerizzare il batterio al fine di produrre acido lattico puro. Secondo quanto riportato da Abdel-Rahman *et al.* (2013), produttività e concentrazione finale di acido lattico sono molto inferiori rispetto a quelle ottenute con LAB e *Bacillus*.

Anche il *C. glutamicum* non è competitivo a livello industriale perché, nonostante l'ingegnerizzazione ne abbia aumentato la produttività, è in grado di generare acido lattico ma in concentrazioni molto basse, a causa della contemporanea produzione di acido acetico e succinico (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

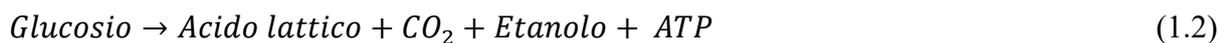
1.5.2 “Pathways” metabolici

Le principali vie del metabolismo batterico di esosi e pentosi possono essere suddivise in due categorie: “pathways” di fermentazione omolattica ed eterolattica.

La fermentazione omolattica del glucosio si divide in due fasi. Nella prima, detta via di Embden-Meyerhoff-Parnas (glicolisi), il glucosio è trasformato in acido piruvico, il quale viene ridotto ad acido lattico nella seconda fase. Vengono prodotte 2 moli di acido lattico da 1 mole di glucosio, dunque la massima resa teorica è pari a 2 mol/mol (1 g/g). Vengono inoltre prodotte 2 molecole di ATP, mentre il NADH, generato nella prima fase, viene utilizzato nella seconda per ridurre l’acido piruvico. Complessivamente si ottiene:



La fermentazione eterolattica, invece, inizia con la via del fosfogluconato, in cui si ha la degradazione del glucosio in xilulosio 5-fosfato, con produzione di 1 mole di CO₂. Successivamente lo xilulosio 5-fosfato entra nella via della fosfochetolasi e viene trasformato in acetil-fosfato e gliceraldeide 3-fosfato. Quest’ultima, tramite gli enzimi della glicolisi, viene trasformata in acido lattico, mentre l’acetil-fosfato viene convertito in etanolo o acido acetico. L’equazioni di bilancio molare sono le seguenti:

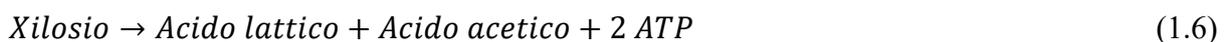


Con la fermentazione eterolattica, la resa teorica di acido lattico da glucosio scende a 1 mol/mol (0.5 g/g), pari a metà di quella omolattica. Da 1 mole di glucosio, infatti, si ottengono 1 mole di acido lattico e 1 mole di acido acetico/etanolo.

La fermentazione omolattica dello xilosio ha inizio con la conversione dello zucchero in xilulosio 5-fosfato, il quale entra nella via del pentosio fosfato per essere convertito in gliceraldeide 3-fosfato (Patel *et al.*, 2006). Questa viene convertita dagli enzimi della glicolisi a piruvato, il quale a sua volta viene ridotto ad acido lattico. Vengono prodotte 5 moli di acido lattico a partire da 3 moli di xilosio, equivalente ad una resa teorica di 1.67 mol/mol (1 g/g).



Nella fermentazione eterolattica di xilosio, avviene prima la sua conversione in xilulosio 5-fosfato, poi la trasformazione di quest’ultimo in gliceraldeide 3-fosfato e acetil fosfato tramite la via della fosfochetolasi. Da queste, come precedentemente descritto, si ottengono 1 mole di acido lattico e 1 mole di acido acetico/etanolo. La resa teorica di acido lattico da xilosio è pari a 1 mol/mol (0.6 g/g).



1.5.3 Funghi

Dopo i batteri, i funghi sono i microrganismi più utilizzati nella fermentazione di acido lattico, in particolare specie del genere *Rhizopus* come *R. oryzae* (Bayitse, 2015).

Il loro successo deriva principalmente dalla capacità di convertire direttamente polisaccaridi amilacei in acido L-lattico, grazie al rilascio extracellulare di enzimi amilasici (Ghaffar *et al.*, 2014). Inoltre non richiedono terreni complessi e la loro crescita in forma filamentosa o di “pellet” permette una facile separazione del fungo dal brodo di fermentazione (Castillo Martinez *et al.*, 2013). Di conseguenza, la produzione di acido lattico tramite funghi permette di eliminare i costi del processo di idrolisi e riduce quelli relativi al medium di fermentazione e ai processi di “downstream”.

La fermentazione con *R. oryzae* richiede un’aerazione molto vigorosa essendo un microrganismo aerobio obbligato. Inoltre è fondamentale mantenere delle condizioni di processo tali da permette al fungo di svilupparsi in forma di “pellets” di piccola dimensione, in quanto tale forma migliora il trasporto di materia e la reologia del brodo di fermentazione (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Se comparata con quella batterica, la fermentazione tramite funghi raggiunge rese di acido lattico inferiori a causa della produzione di sottoprodotti come acido fumarico e etanolo (Wee *et al.*, 2006). Oltre alla fermentazione degli amilacei, i funghi vengono utilizzati per metabolizzare biomasse lignocellulosiche precedentemente idrolizzate: fra queste, Castillo Martinez *et al.* (2013) riportano substrati come legno di pino, scarti cartacei e residui di pannocchia di mais (corn cob).

1.5.4 Processi di fermentazione

I processi di fermentazione più comunemente impiegati sono batch, fed-batch e continuo, la cui scelta dipende da diversi fattori come il substrato impiegato, il microrganismo e la viscosità del brodo di fermentazione (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

La fermentazione batch è fra le tre il processo di più semplice realizzazione. Fatta eccezione per ossigeno, sostanze di regolazione del pH e agenti antischiuma, tutti i componenti del medium vengono aggiunti nella fase iniziale (Bayitse, 2015) e con essi anche il microrganismo, tramite l’inoculazione di un volume di precoltura pari in genere al 5-10% del liquido contenuto nel reattore (Ghaffar *et al.*, 2014). Essendo un sistema chiuso, il rischio di contaminazione è minore rispetto agli altri metodi, inoltre la concentrazione finale di acido lattico è la maggiore. Quest’ultima caratteristica e l’aggiunta dei reagenti in una sola volta rendono la fermentazione batch non applicabile quando il microrganismo soffre di inibizione da prodotto o substrato. Inoltre, la produttività è bassa a causa delle frequenti fasi di “shutdown”.

La fermentazione fed-batch risolve i problemi di inibizione da substrato, in quanto i nutrienti vengono alimentati in più “step” durante il processo, mantenendone la concentrazione al di sotto del valore critico. Grazie a questo la produttività migliora rispetto al batch, ma rimane comunque inferiore a quella ottenuta con fermentazione continua. Inoltre, permane il problema legato all’inibizione da prodotto.

La fermentazione in continuo, invece, prevede due portate uguali in ingresso e in uscita (stato stazionario): la prima alimenta il medium fresco e l'altra scarica il brodo di fermentazione. Incrementando la portata di medium fresco alimentata, si ha la diluizione dei prodotti nel brodo di fermentazione e si evita l'inibizione da prodotto del microrganismo, problema tipico delle fermentazioni batch e fed-batch. Inoltre, rispetto a questi, il processo in continuo richiede "shutdown" meno frequenti e di conseguenza la produttività è maggiore (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Con la fermentazione in continuo non si raggiungono concentrazioni di acido lattico elevate come in quella batch e fed-batch, inoltre si ha una perdita di biomassa microbica e di substrato non fermentato con la corrente in uscita. Per ovviare a questi problemi si adottano fermentazioni in continuo con "cell-recycling", dove la biomassa in uscita viene separata dal permeato tramite membrane di ultra o microfiltrazione e poi ricircolata al fermentatore, oppure con cellule immobilizzate in reattori a letto impaccato o fluidizzato (Taskila e Ojamo, 2013).

1.5.5 Recupero acido lattico

A fine processo, l'acido lattico prodotto deve essere recuperato e purificato dal brodo di fermentazione. Questo infatti contiene impurità come zuccheri e nutrienti residui, biomassa microbica, altri acidi organici ed eventuali sostanze derivanti dall'idrolisi della lignocellulosa.

Secondo quanto riportato da Taskila e Ojamo (2013), la tecnica tradizionale consiste nella rimozione del microrganismo e degli altri residui solidi, seguita dalla precipitazione dell'acido lattico sotto forma di lattato di calcio e successivo recupero. L'acidificazione del precipitato con acido solforico porta alla formazione di acido lattico e gesso, il quale precipita e viene separato. Tale metodo risulta però troppo dispendioso a causa del costo dei reagenti, che ammonta al 50% del costo complessivo di produzione (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). A questo, si aggiunge il problema dello smaltimento del gesso prodotto.

Per ovviare a questi problemi, è stato necessario sviluppare nuove tecniche di recupero al fine di rendere il processo economicamente sostenibile. Fra queste, Castillo Martinez *et al.* (2013) riportano l'estrazione con solvente, lo scambio ionico, la separazione con membrane e la distillazione con reazione chimica. La cromatografia a scambio ionico è una delle tecniche più efficienti ed utilizzate, in quanto estremamente selettiva e permette un recupero dell'acido lattico "low cost" e veloce (Ghaffhar *et al.*, 2014). Alcune di queste tecniche possono essere applicate *in situ*, col vantaggio di rimuovere l'acido lattico non appena si forma e di conseguenza ridurre l'inibizione da prodotto.

1.6 Scopo del lavoro

L'obiettivo del seguente lavoro di tesi è stato quello di definire un processo *ex novo* per la produzione di acido lattico a partire da guscio di noce. Il processo consiste di due "step" distinti, l'idrolisi del guscio di noce tramite reattore a microonde al fine di ottenere xilosio e la successiva fermentazione batterica dell'idrolizzato per produrre acido lattico.

L'idrolisi in reattore a microonde è una tecnica innovativa che permette di idrolizzare la lignocellulosa in maniera più efficiente. Grazie alla formazione di "hot spot", è possibile infatti ottenere la degradazione del materiale lavorando con temperature più basse rispetto ai processi tradizionali (Gavilà *et al.*, 2015).

La prima parte del lavoro è stata quella di trovare le condizioni di lavoro del reattore a microonde (temperatura, pressione, tempo di esposizione alle microonde) che permettessero di idrolizzare lo xilano (emicellulosa pura) ed ottenere xilosio. Successivamente, una volta definite tali condizioni, si è proceduto con l'idrolisi del guscio di noce.

La seconda parte del lavoro è stata quella di individuare il batterio capace di metabolizzare xilosio commerciale producendo acido lattico, per poi testarlo nella fermentazione dello xilosio ottenuto per idrolisi del guscio di noce. Sono stati testati tre differenti ceppi batterici: *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* CECT 286, *Bacillus coagulans* CECT 561 e *Bacillus coagulans* DSM 2314.

2. Materiali e metodi

2.1 Reagenti

La maggior parte dei reagenti presentano una purezza al minimo pari al 98% e sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich. Fanno eccezione il D-(+)-xilosio e lo xilano, i quali sono reagenti rispettivamente Fischer e Biophoretics.

Tabella 2.1 Reagenti utilizzati

| Reagente | Codice prodotto | Reagente | Codice prodotto |
|---------------------|----------------------|--|-----------------------|
| xilano | B38500.02 | citrato di ammonio | 25102 SIGMA-ALDRICH |
| xilosio | BP708-250 | acetato di sodio | W302406 ALDRICH |
| glucosio | G8270 SIGMA | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1374361 USP |
| acido lattico | L6402 SIGMA | MnSO ₄ ·H ₂ O | M8179 SIGMA-ALDRICH |
| acido formico | 251364 SIGMA-ALDRICH | NaCl | S7653 SIGMA-ALDRICH |
| acido levulinico | W262701 ALDRICH | hepes | H3375 SIGMA |
| acido acetico | W200603 ALDRICH | (NH ₄)SO ₄ | A4418 SIGMA |
| furfurale | 185914 SIGMA-ALDRICH | FeSO ₄ ·7H ₂ O | F8633 SIGMA |
| HMF | W501808 ALDRICH | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 09839 SIGMA-ALDRICH |
| peptone | 70172 SIGMA-ALDRICH | K ₂ HPO ₄ | P5655 SIGMA |
| estratto di carne | 70164 SIGMA-ALDRICH | KH ₂ PO ₄ | P3786-M EMD MILLIPORE |
| estratto di lievito | 92144 SIGMA-ALDRICH | BIS-TRIS | B9754 SIGMA |

2.1.1 Xilano

Gli xilani sono polissaccaridi di tipo emicellulosico, costituiti principalmente da monomeri di D-(+)-xilosio. In particolare lo xilano utilizzato in tale lavoro è un estratto di muschio con una purezza del 98%. In figura 2.1, la struttura fornita dal produttore.

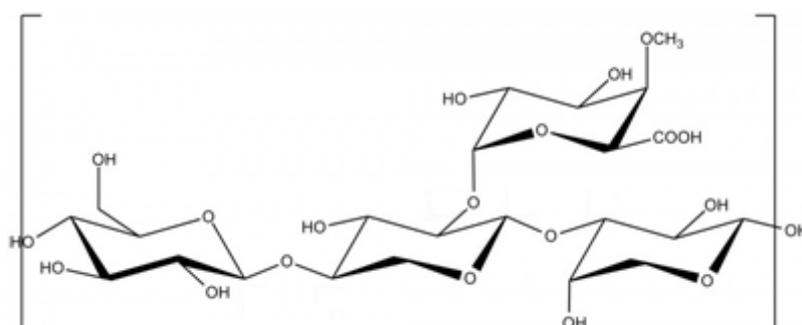


Figura 2.1 Formula di struttura dello xilano utilizzato, modificata da Biophoretics.com (2016)

Esso si presenta sotto forma di polvere, si solubilizza totalmente in acqua dopo solo qualche minuto di miscelazione a temperatura ambiente.

2.1.2 Guscio di noce

L'emicellulosa presente all'interno del gusci di noce può essere idrolizzata al fine di ottenere xilosio per la fermentazione. In particolare, in questo lavoro è stato utilizzato guscio di noce spagnola fornita dall'Università Rovira i Virgili di Tarragona.



Figura 2.2 Guscio di noce prima e dopo la triturazione

2.2 Strumentazione

2.2.1 Reattore a microonde

L'idrolisi di xilano e guscio di noce è stata condotta all'interno del sistema a microonde synthWAVE della Milestone. Esso sfrutta una tecnologia a singola camera di reazione all'interno della quale viene inserito un contenitore in PTFE. Questo viene riempito con 200 ml di acqua deionizzata nella quale vengono immerse provette contenenti il campione da idrolizzare.

Un display esterno permette di impostare le condizioni di reazione quali temperatura, pressione, durata di esposizione e velocità di rotazione dell'agitatore magnetico posto all'interno della provetta. Una volta impostata la temperatura alla quale condurre l'esperimento, la pressione deve essere regolata in maniera tale da evitare l'evaporazione del campione da idrolizzare. Trattando soluzioni acquose, il valore di pressione richiesto è facilmente ottenibile dalla tabella del vapor saturo, adottando un certo margine di sicurezza (+10 bar al valore individuato da tabella). La pressione desiderata viene raggiunta tramite l'iniezione di azoto in camera di reazione che, sostituendosi all'aria, evita l'ossidazione del campione trattato.

La miscelazione tramite agitatore magnetico e l'acqua deionizzata inserita nel contenitore in PTFE permettono di distribuire in maniera omogenea le microonde che raggiungono il campione. Un'eccessiva concentrazione di microonde infatti, ne causerebbe la degradazione.

2.2.2 TOC, HPLC e spettrofotometro

Terminata la reazione nel reattore a microonde, il Total Organic Carbon (TOC) Analyzer (Shimadzu, TOC-L CSN) permette di valutare la concentrazione del carbonio totale passato in soluzione nella fase liquida in seguito all'idrolisi del campione.

L'idrolizzato è stato analizzato tramite un sistema HPLC (HPLC Agilent tech, 1100 series) utilizzando una colonna ICsep ICE-COREGEL 87H3, equipaggiato con detector DAD (misure a 210 nm) e RID. La fase mobile è costituita da acqua deionizzata il cui valore di pH è stato corretto a 2.2 con acido solforico. La colonna opera ad una temperatura di 50 °C con flusso della fase mobile di 0.6 ml/min. Ad ogni analisi vengono prelevati 20 µl di campione ed iniettati in colonna. L'analisi dura 50 minuti, tempo necessario affinché tutte le sostanze di interesse percorrano la colonna: fra queste infatti, il tempo di ritenzione maggiore è quello del furfurale ed è pari a 49.2 minuti. Il sistema HPLC è stato inoltre utilizzato per determinare i prodotti formati nel corso degli esperimenti di fermentazione dello xilosio, che rappresentano la seconda parte di questo lavoro.

La crescita batterica è stata valutata tramite misure di densità ottica a 600 nm, utilizzando lo spettrofotometro SpectraMax 340PC della Molecular Devices.

2.3 Curva di calibrazione della soluzione standard

Si è proceduto preparando una soluzione a concentrazione nota di glucosio, xilosio, acido lattico, acetico, formico e levulinico, idrossimetilfurfurale (HMF) e furfurale, sostanze di maggiore interesse ai fini di questo studio (Tabella 2.2).

Tabella 2.2 Composizione della soluzione analizzata

| | Xilosio | Glucosio | Acido lattico | Acido acetico | Acido formico | Acido levulinico | HMF | Furfurale |
|---------------|----------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|------------|------------------|
| C, g/l | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 20,0 | 20,0 | 30,0 | 5,0 | 10,0 |

Successivamente, sono state preparate cinque soluzioni prelevando dalla precedente rispettivamente 666, 333, 100, 50 e 10 µl ed aggiungendo acqua deionizzata fino ad arrivare ad un volume finale di 1 ml. Da ognuna di queste e dalla soluzione iniziale è stato prelevato un campione per analisi HPLC.

2.4 Idrolisi di xilano in reattore a microonde

La soluzione da idrolizzare è stata preparata aggiungendo 1 g di xilano in 20 ml di acqua deionizzata. Questa è stata poi inserita all'interno del reattore a microonde secondo i procedimenti descritti al paragrafo 2.2.1.

Temperatura (T) e tempo di esposizione (t) sono i parametri fondamentali che regolano l'idrolisi, perché con essi aumenta l'energia fornita al sistema. Partendo dalle informazioni presenti in letteratura (Hricovíniová, 2013), si sono effettuate prove a temperature di 170, 190, 200 e 210°C, per un tempo di esposizione di 5 minuti. Successivamente sono stati eseguiti due test, uno a temperature più basse (90-140°C) ad un tempo di esposizione pari a 50 minuti ed uno ad un tempo intermedio (20 minuti) in un range di temperatura più ampio (100-190°C). Le condizioni testate sono riportate in Tabella 2.3.

Tabella 2.3 Idrolisi xilano: tempi e temperature testati

| Esperimento | t, minuti | T, °C |
|-------------|-----------|--------------------|
| 1 | 5 | 170, 190, 200, 210 |
| 2 | 50 | 90, 100, 120, 140 |
| 3 | 20 | 100, 120, 170, 190 |

Gli esperimenti sono stati ripetuti ponendo lo xilano in soluzioni di acido acetico 0,1 M e 0,5 M e in soluzioni di acido solforico di uguale molarità. Terminata la reazione, si preleva un campione da analizzare con HPLC e TOC.

2.5 Idrolisi del guscio di noce in reattore a microonde

I gusci di noce sono stati triturati tramite un macinacaffè ed i granuli ottenuti sono stati poi separati per dimensione tramite una serie di setacci con luce di passaggio pari a 2, 1, 0.5 e 0.2 mm. La soluzione da idrolizzare è stata preparata aggiungendo 1 g di granuli di guscio noce in 20 ml di acqua deionizzata. Sono state condotte prove a 190°C per 20 minuti al fine di determinare l'influenza della dimensione dei granuli (d=diametro), come mostrato in Tabella 2.4.

Tabella 2.4 Idrolisi guscio di noce: tempi, temperature e dimensione del granulo testati

| Esperimento | t, minuti | T, °C | d, mm |
|-------------|-----------|-------|-----------|
| 1 | 20 | 190 | 1 - 2 |
| 2 | | | 0.5 - 1 |
| 3 | | | 0.2 - 0.5 |
| 4 | | | < 0.2 |

Sono state inoltre effettuate prove a diversa temperatura e tempo di esposizione alle microonde su granuli di diametro fra 1 e 2 mm (Tabella 2.5).

Tabella 2.5 Idrolisi guscio di noce: tempi, temperature e dimensione del granulo testati

| Esperimento | t, minuti | T, °C | d, mm |
|-------------|-----------|-------|-------|
| 5 | 10 | 170 | 1 - 2 |
| 6 | 20 | | |
| 7 | 10 | 190 | |
| 8 | 20 | | |
| 9 | 10 | 210 | |
| 10 | 20 | | |

A fine reazione si ottengono due fasi. Una fase liquida, ricca in componenti che in seguito all'idrolisi sono passati dai granuli di noce alla fase acquosa ed una solida corrispondente ai residui dei granuli trattati. Si procede separando le due fasi tramite una filtrazione a vuoto, utilizzando una carta filtrante con porosità di 11 μm . La parte solida viene dunque posta in forno a 120 °C per un'ora in maniera tale da rimuovere l'acqua assorbita e viene infine pesata. La parte liquida invece è stata analizzata prelevando un campione per misure di HPLC e TOC.

2.6 Fermentazione batterica

2.6.1 Microrganismi

***Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* CECT 286.** In uno studio precedente a questo, il batterio è stato impiegato dallo stesso gruppo di ricerca con lo scopo di metabolizzare glucosio derivante da idrolisi di cellulosa e si è deciso di testarlo nella fermentazione di xilosio. Il batterio era conservato a -80°C in un medium (pH=7) avente la seguente composizione: peptone 10 g/l, estratto di carne 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l, citrato di ammonio 2 g/l, acetato di sodio 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/l, K_2HPO_4 2 g/l, idrocloruro di cisteina 1 g/l, hepes 11 g/l, glucosio 20 g/l.

***Bacillus coagulans* CECT 561.** Il ceppo è stato acquistato in forma liofilizzata presso la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia).

***Bacillus coagulans* DSM 2314.** L'acquisto è stato effettuato presso la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germania). Anche in questo caso, il batterio è stato ordinato in forma liofilizzata.

Qualunque procedura che prevedeva manipolazione di batteri come riattivazione, inoculo e campionamento è stata eseguita lavorando sotto cappa sterile in maniera tale da evitare possibili contaminazioni.

2.6.2 Preparazione del medium di fermentazione

Per la fermentazione si utilizza un flacone in vetro di volume pari a 30 ml e contenenti 25 ml di medium, dove la reazione è condotta in condizioni anaerobiche (fatta eccezione per l'esperimento 7 e 9). Dunque, prima di sterilizzare il sistema, è necessario creare al suo

interno un'atmosfera priva di ossigeno e al contempo isolarlo per evitare l'ingresso di aria dall'esterno.

Per far questo, si procede versando in una beuta il medium di fermentazione. Questo viene miscelato e riscaldato a 50°C tramite una piastra riscaldante dotata di agitatore magnetico e viene fatto gorgogliare Argon alla pressione di 2 bar. Così facendo si riduce la solubilità dell'ossigeno nella soluzione e si favorisce la sua rimozione. Dopo 15 min si procede trasferendo 25 ml di medium per ciascun flacone, il quale viene chiuso tramite tappi in gomma di butile sigillati con ghiere in alluminio. Questi assicurano una chiusura ermetica senza impedire l'accesso al medium.

Una volta isolato il flacone, si completa la deossigenazione del sistema aspirando l'aria soprastante il liquido e successivamente facendo nuovamente gorgogliare Argon per 15 minuti, come mostrato in Figura 2.3. La procedura viene ultimata sterilizzando in autoclave (121°C, 15 min).



Figura 2.3 Rimozione dell'aria dal sistema di fermentazione

2.7 Fermentazione di xilosio commerciale con *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* CECT 286

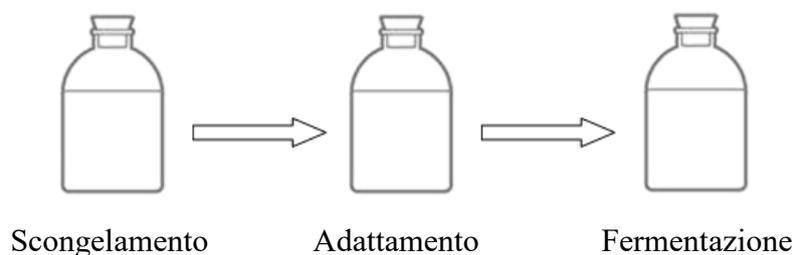


Figura 2.4 Schema di processo

2.7.1 Riattivazione del batterio congelato

Il *Lactobacillus* è stato scongelato ponendolo in termostato a 37°C e 150 rpm fino a completa fusione del ghiaccio. Una volta scongelato, si è proceduto trasferendone 2.5 ml in 25 ml di medium fresco (lo stesso in cui era conservato), incubandolo a 37°C e 150 rpm.

2.7.2 Inoculo del medium di fermentazione

Dopo circa 12 ore, raggiunta una densità ottica di valore pari a 0.1, si prelevano 2.5 ml e si procede con l'inoculo di 25 ml del seguente medium:

- Medium A (Gavilà *et al.*, 2015): peptone 10 g/l, estratto di carne 10 g/l, estratto di lievito 5 g/L, citrato di ammonio 2 g/l, acetato di sodio 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, MnSO₄·H₂O 0.005 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, idrocloruro di cisteina 1 g/l, hepes 11 g/l, xilosio 10 g/l

Le condizioni operative della fermentazione sono riportate in Tabella 2.6.

Tabella 2.6 Condizioni operative della prova 1

| Fermentazione | Tipologia medium | pH | T, °C | Anaerobiosi |
|---------------|------------------|-----|-------|-------------|
| 1 | A | 7.0 | 37 | si |

Periodicamente si preleva 1 ml di campione con lo scopo di controllare il processo di fermentazione. Di questo volume, 100 µl sono utilizzati per misure di assorbanza a 600 nm (spettrofotometro, Molecular Devices) ed il resto è utilizzato per analisi HPLC previa filtrazione con filtri in PVDF con porosità di 0.22 µm.

2.8 Fermentazione xilosio commerciale con *Bacillus coagulans* CECT 561

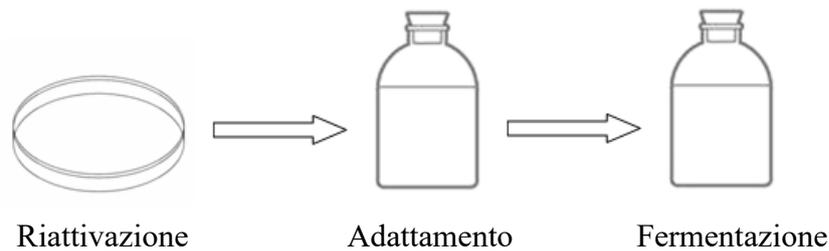


Figura 2.5 Schema di processo

2.8.1 Riattivazione del batterio liofilizzato

Il processo di riattivazione prevede una prima fase di adattamento in un medium la cui composizione, pH e temperatura di incubazione sono forniti dalla casa produttrice. Tale medium, detto di adattamento, presenta la seguente composizione: peptone 10 g/l, estratto di carne 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l (solo per terreno solido).

Preparato il medium di adattamento, si corregge il pH ad un valore di 7.2 e si sterilizza in autoclave a 121°C per 15 minuti. Una volta terminato, si procede versando il medium agarizzato sulla capsula di Petri e si dispone quest'ultima sotto cappa sterile, il tempo necessario alla solidificazione del terreno.

Conclusa la preparazione del terreno solido, si versano 0.5 ml del medium di adattamento liquido all'interno della fiala di vetro contenente il ceppo liofilizzato. Si mescola e si attendono 20 min per ottenere la completa idratazione del batterio. Infine, utilizzando una pipetta pasteur, si versa una goccia della miscela sul terreno solido precedentemente preparato e lo si distribuisce tramite un'ansa da inoculo. La procedura termina incubando la piastra a 30 °C. A 24 ore dall'inoculo il batterio è cresciuto e sviluppato sulla superficie del terreno solido e può essere conservato in frigorifero a 4°C.

2.8.2 Inoculo del medium di fermentazione

Prima di passare all'inoculo del medium contenente xilosio, si esegue uno "step" intermedio con lo scopo di adattare il batterio ad un terreno liquido. Con l'aiuto di un'ansa si preleva il batterio cresciuto sulla capsula di Petri e si inoculano 25 ml del medium di adattamento liquido fino ad ottenere una densità ottica di 0,01. Il flacone inoculato viene poi incubato a 30°C e 150 rpm fino a che la densità ottica non ha raggiunto il valore al minimo di 0.1. Da questo si prelevano 2.5 ml e si inoculano 25 ml del medium di fermentazione. Relativamente a quest'ultimo, sono stati testati differenti tipi di terreno:

- **Medium A:** vedi paragrafo 2.7.2.
- **Medium B** (Ye *et al.*, 2013): (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l, NaCl 2 g/l, , FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l, estratto di lievito 10 g/l, xilosio 20 g/l.

Gli esperimenti successivi sono stati condotti variando la composizione del terreno base o i parametri operativi, come riportato in Tabella 2.7.

Tabella 2.7 Condizioni operative delle prove 2-9

| Fermentazione | Tipologia medium | pH | T, °C | Anaerobiosi |
|----------------------|---|------------|--------------|--------------------|
| 2 | B | 7.2 | 37 | si |
| 3 | B, con 5.0 g/l di estratto di lievito | 7.2 | 37 | si |
| 4 | B, con aggiunta di 0.05 g/l di MnSO ₄ •7H ₂ O | 7.2 | 37 | si |
| 5 | B | 6.0 | 37 | si |
| 6 | B | 7.2 | 50 | si |
| 7 | B | 7.2 | 37 | no |
| 8 | A, con aggiunta 5.0 g/l di glucosio | 6.5 | 37 | si |
| 9 | A, con aggiunta 5.0 g/l di glucosio | 6.5 | 37 | no |

Terminata la fermentazione, si prosegue col campionamento del medium secondo la procedura descritta al paragrafo 2.7.2.

2.9 Fermentazione xilosio commerciale con *Bacillus coagulans* DSM 2314

2.9.1 Riattivazione del batterio liofilizzato

Il processo di riattivazione prevede la stessa procedura descritta al paragrafo 2.7. La casa produttrice fornisce un valore di pH pari a 7.3, una temperatura di incubazione di 55°C e la seguente composizione del medium di adattamento: peptone da caseine 15 g/l, peptone da farina di soia 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l (solo per terreno solido).

2.9.2 Inoculo del medium di fermentazione

Stessa procedura descritta al paragrafo 2.7.1. Sono stati testati due differenti tipi di medium (van der Pol *et al.*, 2016):

- **Medium D:** estratto di lievito 10 g/l, (NH₄)₂HPO₄ 2 g/l, (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/l, xilosio 10 g/l.
- **Medium E:** estratto di lievito 10 g/l, peptone 10 g/l, xilosio 10 g/l.

Le condizioni operative delle fermentazioni 10-13 sono riportate in Tabella 2.8.

Tabella 2.8 Condizioni operative delle prove 10-13

| Fermentazione | Tipologia medium | pH | T, °C | Anaerobiosi |
|----------------------|--------------------------------------|-----------|--------------|--------------------|
| 10 | D | 7.3 | 55 | si |
| 11 | D, con aggiunta di 5 g/l di glucosio | 7.3 | 55 | si |
| 12 | E | 7.3 | 55 | si |
| 13 | E, con aggiunta di 5 g/l di glucosio | 7.3 | 55 | si |

Negli esperimenti successivi (fermentazioni 14-17) è stata apportata una modifica relativa al metodo di sterilizzazione ed è stato inoltre regolato il pH del medium durante la fermentazione. La sterilizzazione in autoclave è stata sostituita con quella mediante siringa e filtri sterili in PVDF con porosità di 0.22 μm . Il pH del medium è stato regolato tramite l'utilizzo di un tampone o manualmente tramite aggiunte di una base. Nel primo caso, i componenti del medium sono stati disciolti in 100 ml di tampone fosfato a pH=7, il quale è stato ottenuto miscelando 61.5 ml di una soluzione acquosa 1 M di K_2HPO_4 e 38.5 ml di KH_2PO_4 1 M. Nel secondo caso invece, il pH è stato periodicamente monitorato prelevando 0.1 ml di soluzione poi analizzata tramite cartina tornasole; la regolazione è stata fatta tramite opportune aggiunte di NaOH 6 M.

Le condizioni operative delle fermentazioni 14 e 15 sono riportate in Tabella 2.9.

Tabella 2.9 Condizioni operative delle prove 14 e 15

| Fermentazione | Tipologia medium | pH | Regolazione pH | T, °C | Anaerobiosi |
|----------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--------------|--------------------|
| 14 | E | 7.3 | Aggiunte di NaOH 6M | 55 | si |
| 15 | E | 7.3 | Tampone fosfato | 55 | si |

Terminata la fermentazione, si prosegue col campionamento del medium secondo la procedura descritta al paragrafo 2.7.2.

2.10 Fermentazione xilosio da idrolisi con *Bacillus coagulans* DSM 2314

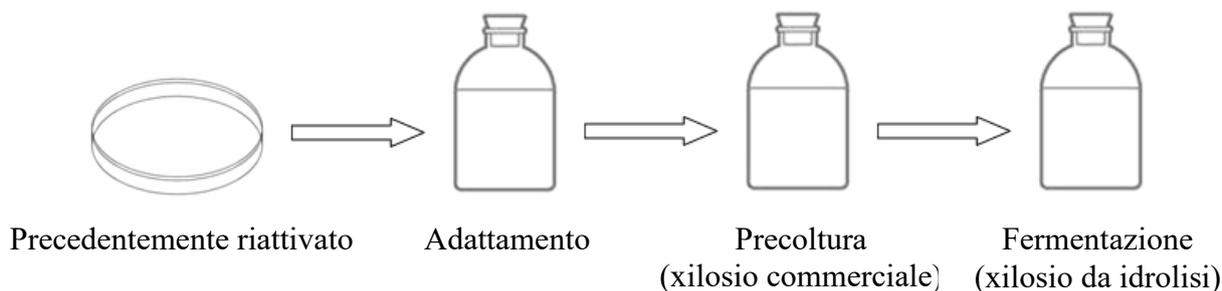


Figura 2.6 Schema di processo Esperimento 17

2.10.1 Preparazione medium di fermentazione

L'esperimento finale consiste nel fermentare lo xilosio derivante dall'idrolisi del guscio di noce. Il medium di fermentazione è ottenuto miscelando due soluzioni. La prima consiste nella fase liquida dell'idrolizzato ottenuto a 190°C e 20 minuti, secondo il processo descritto al paragrafo 2.5. La seconda invece presenta la seguente composizione: peptone 20 g/l, estratto di lievito 10 g/l, tampone fosfato 2×concentrato. Miscelando le due soluzioni in egual volume si ottiene la stessa composizione del medium E utilizzato nell'esperimento 15, con xilosio prodotto per idrolisi del guscio di noce.

2.10.2 Inoculo del medium di fermentazione

Nell'esperimento 16 la procedura applicata è la stessa descritta al paragrafo 2.8.2 e lo schema di processo è quello mostrato in figura 2.5. La fermentazione 17 (Figura 2.6), invece, è preceduta da un adattamento di 12 ore del batterio (2,5 ml di inoculo) in 25 ml di medium contenente xilosio commerciale con la seguente composizione: peptone 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l, BIS-TRIS metano 10 g/l, xilosio 10 g/L. I parametri operativi sono pH=7.2, condizioni anaerobiche, 55°C e 150 rpm.

Sterilizzazione e regolazione del pH sono effettuati come spiegato al paragrafo 2.9. Le condizioni operative delle fermentazioni 16 e 17 sono riportate in Tabella 2.10.

Tabella 2.10 Condizioni operative della prova 16 e 17

| Fermentazione | Tipologia medium | pH | Regolazione pH | T, °C | Anaerobiosi |
|---------------|---------------------------------------|-----|-----------------|-------|-------------|
| 16 | E, con 4.3 g/l di xilosio da idrolisi | 7.3 | Tampone fosfato | 55 | si |
| 17 | E, con 4.4 g/l di xilosio da idrolisi | 7.3 | Tampone fosfato | 55 | si |

Terminata la fermentazione, si prosegue col campionamento del medium secondo la procedura descritta al paragrafo 2.7.2.

3. Risultati e discussione

3.1 Curva di calibrazione della soluzione standard

In Figura 3.1 sono riportati i grafici delle curve di calibrazione relative a glucosio, furfurale, acido formico e levulinico, in Figura 3.2 quelle di xilosio, HMF, acido lattico e acetico.

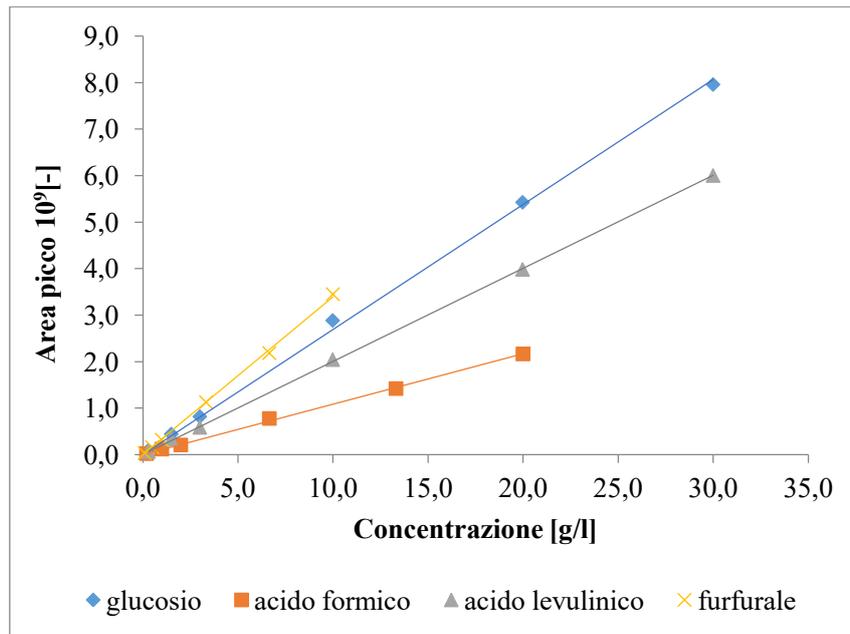


Figura 3.1 Curve di calibrazione relative a glucosio, furfurale, acido formico e levulinico

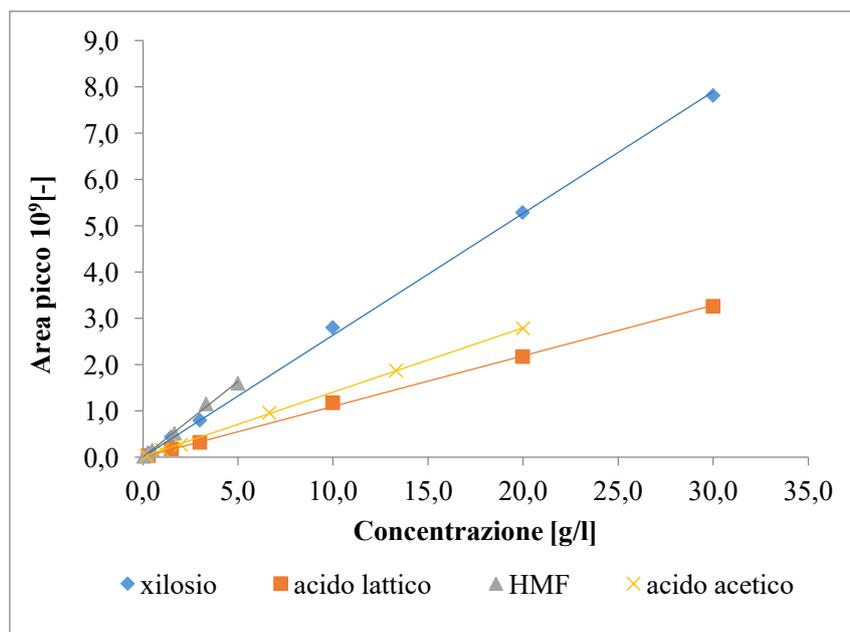


Figura 3.2 Curve di calibrazione relative a xilosio, HMF, acido lattico e acetico

L'analisi HPLC effettuata permette di ricavare il coefficiente di proporzionalità della curva di calibrazione (C) ed il tempo di ritenzione (τ) di ciascun componente presente nella soluzione standard (vedi paragrafo 2.3). Il primo lega la concentrazione dell'analita all'area del picco dello spettro HPLC. Il secondo, invece, permette di identificare i componenti della soluzione, dato che ognuno di essi presenta un tempo di ritenzione differente. Questi due parametri permetteranno di analizzare un qualunque spettro HPLC ottenuto nei successivi esperimenti, al fine di identificare e quantificare i componenti presenti nell'idrolizzato o nel brodo di fermentazione. In Tabella 3.1 sono stati riportati i coefficienti di proporzionalità ed i tempi di ritenzione ottenuti.

Tabella 3.1 Coefficienti di proporzionalità area-concentrazione e tempi di ritenzione

| | Xilosio | Glucosio | Acido lattico | Acido formico | Acido levulinico | Acido acetico | Furfurale | HMF |
|-------------------------------|----------------|-----------------|----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|------------------|------------|
| C, l/g | 269781 | 275686 | 110965 | 109884 | 202961 | 141934 | 344128 | 368722 |
| τ, min | 10.1 | 9.4 | 13.4 | 14.3 | 16.9 | 15.6 | 49.2 | 32.2 |

3.2 Idrolisi di xilano in reattore a microonde

L'esperimento di idrolisi dello xilano non ha dato i risultati sperati in quanto non è stato possibile produrre xilosio. Il quantitativo di xilano in soluzione è rimasto praticamente invariato, anche a valori elevati di temperatura e tempo di esposizione.

Uno dei motivi che può spiegare un risultato simile è l'assenza di acido acetico nella soluzione contenente lo xilano. L'emicellulosa di fatto presenta gruppi acetile che si idrolizzano formando acido acetico (Jönsson *et al.*, 2013), il quale ha un effetto catalitico sull'idrolisi dei polisaccaridi favorendo la produzione di xilosio (Yan *et al.*, 2017). Facendo riferimento alla composizione fornita dal produttore, lo xilano utilizzato nell'esperimento non presenta alcun gruppo acetile e di conseguenza durante l'idrolisi non si ha produzione di acido acetico a catalizzare la reazione. Si è proceduto dunque aggiungendo acido acetico o acido solforico all'acqua contenente lo xilano da idrolizzare, nel tentativo di ottenere l'effetto catalitico necessario. L'analisi dell'idrolizzato ha confermato il verificarsi della reazione, dato che lo xilano è stato parzialmente o totalmente consumato, ma non vi è stata produzione di xilosio. Lo spettro HPLC ha dato come risultati picchi di natura sconosciuta; i prodotti formati non sono stati quelli previsti e non è stato possibile identificarli con la strumentazione a disposizione.

3.3 Idrolisi del guscio di noce in reattore a microonde

3.3.1 Prodotti di idrolisi ottenuti

Come descritto nel capitolo introduttivo (paragrafo 1.4.2), xilosio, acido acetico, acido formico e furfurale sono sostanze derivanti dall'idrolisi dell'emicellulosa, mentre glucosio, HMF e acido levulinico derivano dalla componente cellulosica (Jönsson *et al.*, 2013). Dall'analisi HPLC dell'idrolizzato di guscio di noce, di cui un esempio è riportato in Tabella

3.2, si osserva che i principali prodotti ottenuti sono quelli derivanti dall'idrolisi dell'emicellulosa, mentre glucosio, acido levulinico e HMF sono stati ottenuti in concentrazione trascurabile.

Tabella 3.2 Composizione idrolizzato ottenuto a 190°C per 20 minuti

| | xilosio | furfurale | acido formico | acido acetico | glucosio | acido levulinico | HMF |
|----------------|---------|-----------|---------------|---------------|----------|------------------|------|
| C [g/l] | 11.5 | 2.56 | 0.96 | 3.76 | 0.45 | 0.15 | 0.26 |

Tale risultato permette di dire che l'emicellulosa è l'unico dei due polisaccaridi lignocellulosici ad essere stato convertito dal trattamento con microonde. Questo è dovuto al fatto che le condizioni utilizzate negli esperimenti effettuati non sono sufficienti alla degradazione della cellulosa la quale, essendo parzialmente cristallina, richiede l'utilizzo di acidi forti (Gavilà *et al.*, 2015).

3.3.2 Influenza della dimensione dei granuli sulla composizione dell'idrolizzato

È stato valutato anzitutto l'effetto della dimensione dei granuli di guscio di noce sulla composizione dell'idrolizzato ottenuto a 190°C per 20 minuti. Come mostrato in Figura 3.3, la concentrazione di xilosio nell'idrolizzato diminuisce notevolmente con la dimensione dei granuli del guscio di noce. Il quantitativo dello zucchero nell'idrolizzato rimane circa costante e pari a 11.2 g/l per diametro dei granuli compreso tra 1 e 2 mm. A valori inferiori a 0.8 mm, la concentrazione di xilosio da 10.4 g/l diminuisce sino ad arrivare ad un valore di 4 g/l quando la dimensione del granulo è pari a 0.2 mm.

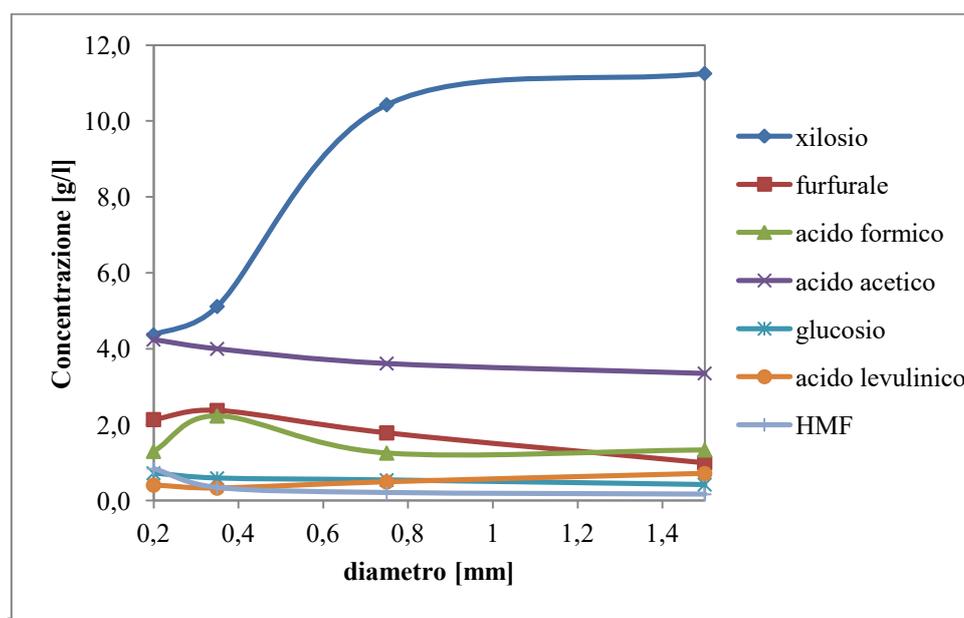


Figura 3.3 Composizione idrolizzato in funzione della dimensione dei granuli di noce

Questo risultato si può spiegare considerando che dati due granuli di dimensione diversa, quello più piccolo, contenendo una massa di emicellulosa minore, necessita di un apporto energetico inferiore per essere idrolizzato. Di conseguenza, a parità tempo di esposizione e di energia fornita tramite le microonde, il granulo di dimensione inferiore subisce un'idrolisi più spinta che porta ad un consumo maggiore dello xilosio ottenuto, a favore dei suoi prodotti di degradazione furfurale e acido formico. Minore è la dimensione del granulo, maggiore è la degradazione dello xilosio, infatti, la concentrazione di furfurale aumenta da 0.99 g/l (d=1.5mm) a 2.4 g/l (d=0.2mm), allo stesso modo, quella di acido formico aumenta da 1.2 g/l (d=1.5mm) a 2.3 g/l (d=0.2mm).

La diminuzione della dimensione del granulo, portando ad una maggiore esposizione della emicellulosa alle radiazioni, incrementa lievemente la produzione di acido acetico la cui concentrazione aumenta da 3.4 g/l (d=1.5mm) a 4.2 g/l (d=0.2mm). Inoltre, non influisce sulla produzione di glucosio e dei suoi prodotti di degradazione, acido levulinico e HMF, la cui concentrazione rimane circa costante a valori prossimi allo zero.

3.3.3 Influenza della temperatura sulla composizione dell'idrolizzato

L'esperimento successivo è stato effettuato al fine di valutare l'influenza della temperatura (indice dell'energia fornita dalle microonde) sulla composizione dell'idrolizzato. I granuli del guscio di noce (dimensione compresa fra 1 e 2 mm) sono stati esposti a 170, 190 e 210°C per 20 minuti in reattore a microonde. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 3.4.

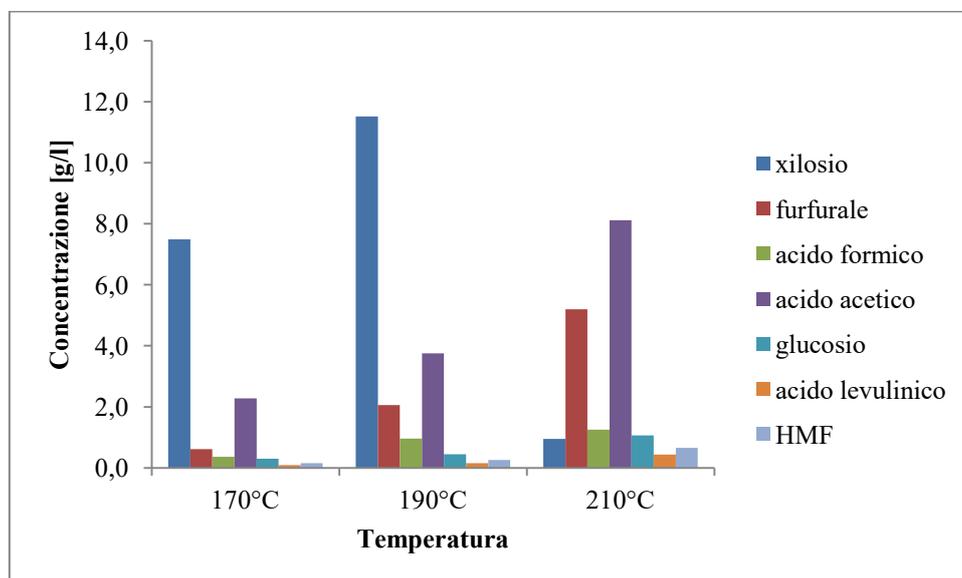


Figura 3.4 Composizione idrolizzato ottenuto a 170, 190 e 210°C per 20 minuti

La concentrazione di xilosio presenta un massimo a 190°C pari a 11.5 g/l; sono stati ottenuti inoltre 3.8 g/l di acido acetico, 2.1 g/l di furfurale e 0.9 g/l circa di acido formico. A 170°C sono stati prodotti principalmente xilosio (7.5 g/l) e acido acetico (2.3 g/l). A 210°C, invece, è stato prodotto più furfurale (5.2 g/l) che xilosio (0.9 g/l).

Secondo quanto riportato da Verardi *et al.* (2012) e Ricci *et al.* (2001), la temperatura è determinante ai fini della composizione dell'idrolizzato, in quanto un suo aumento favorisce l'idrolisi ma allo stesso tempo incrementa la degradazione dello xilosio in furfurale. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto riportato dagli autori sopra citati: fino a 190°C l'energia permette l'idrolisi dell'emicellulosa con formazione di xilosio senza un'eccessiva degradazione dello stesso. A temperature maggiori, invece, l'energia fornita è tale da generare una velocità di degradazione dello zucchero maggiore di quella della sua produzione.

Il furfurale aumenta in concentrazione quando l'idrolisi è condotta a temperature sempre maggiori, per effetto della degradazione dello xilosio, passando da 0.6 g/l a 170°C ad un valore di 5.2 g/l a 210°C. L'acido formico, invece, derivante dalla degradazione del furfurale, aumenta da 170 a 210°C ma di soli 0.9 g/l. Nello stesso range di temperatura, l'acido acetico passa da 1.2 a 8.3 g/l, perché questa favorisce l'idrolisi dei gruppi acetile presenti nell'emicellulosa, in accordo con quanto riportato da Jönsson *et al.* (2013).

Infine, è importante notare come i prodotti derivanti dall'idrolisi della cellulosa e cioè glucosio, acido levulinico e HMF sono in concentrazione prossima allo zero. Solo a 210°C la loro concentrazione non è più trascurabile, infatti vengono prodotti 1 g/l di glucosio, 0.7 g/l di HMF e 0.5 g/l di acido levulinico. Questo perché l'idrolisi della cellulosa in reattore a microonde, senza l'ausilio di acidi, risulta molto difficile. Ad esempio, Fan *et al.* (2013) riportano che esponendo alle microonde 10 g di cellulosa microcristallina in 20 ml di acqua, alla temperatura di 240 °C per 15 minuti, la conversione ottenuta è molto bassa e pari al 14%.

3.3.4 Influenza del tempo di esposizione sulla composizione dell'idrolizzato

Consideriamo adesso l'effetto del tempo di esposizione alle microonde (t) rispetto a xilosio (Figura 3.5) e furfurale (Figura 3.6), componenti presenti nell'idrolizzato in maggiore concentrazione.

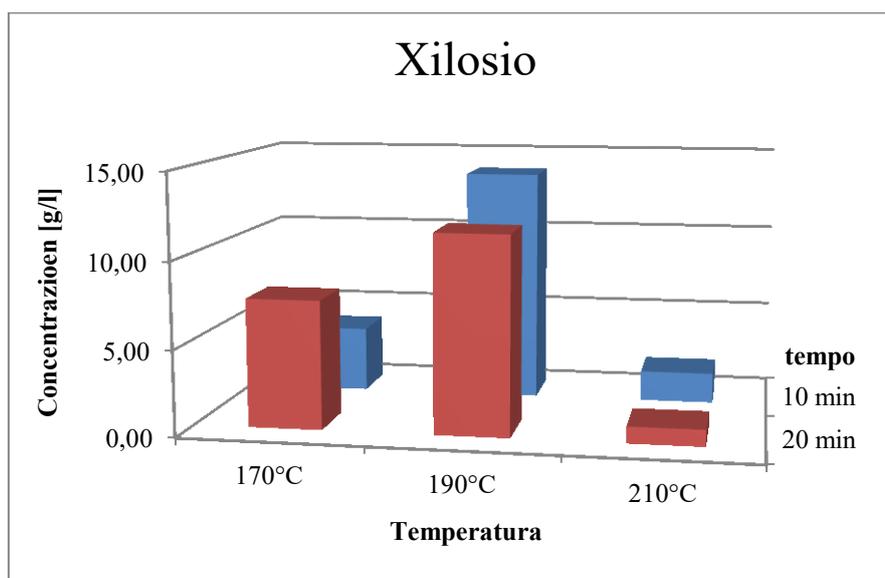


Figura 3.5 Concentrazione di xilosio nell'idrolizzato ottenuto a 170, 190 e 210°C per 10 e 20 minuti

Alla temperatura di 170°C, l'aumento del tempo di esposizione da 10 a 20 minuti incrementa la produzione di xilosio da 3.9 a 7.5 g/l. Al contrario, a 190°C e 210°C, l'aumento del tempo di esposizione influenza negativamente la produzione di xilosio, infatti, a 190 °C la sua concentrazione diminuisce da 13.8 a 11.5 g/l, mentre a 210 °C diminuisce da 1.8 a 0.9 g/l. Questo perché a tali temperature l'idrolisi della emicellulosa avviene più velocemente e dunque lo xilosio passa più velocemente in soluzione. In queste condizioni, esporlo alle microonde per un tempo t maggiore si traduce in una maggiore degradazione.

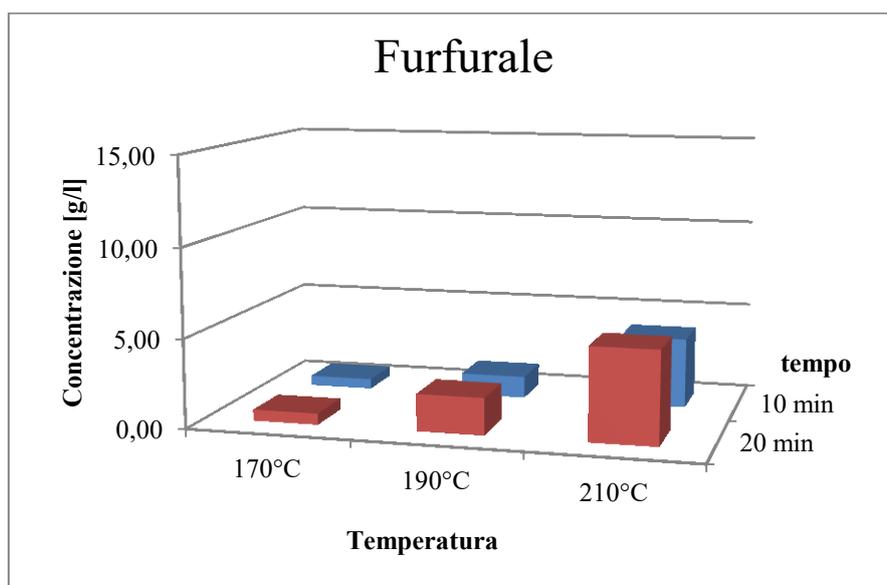


Figura 3.6 Concentrazione di furfurale nell'idrolizzato ottenuto a 170, 190 e 210°C per 10 e 20 minuti

L'aumento del tempo di esposizione a 170°C è quasi influente sul contenuto di furfurale, infatti la concentrazione è circa costante e pari a 0.6 g/l. È evidente che a questa temperatura il tempo necessario alla degradazione dello xilosio è maggiore dell'incremento del tempo di esposizione, dunque il sistema non risente dell'effetto. Alle temperature di 190°C e 210°C, invece, la velocità di degradazione dello xilosio diventa rilevante e l'aumento del tempo di esposizione porta ad una maggiore conversione dello zucchero in furfurale, la cui concentrazione aumenta rispettivamente di 0.8 g/l e 1.3 g/l.

3.3.5 Resa di conversione della emicellulosa

Le analisi al TOC sui campioni della fase liquida di idrolizzato permettono di valutare il quantitativo di guscio di noce convertito e passato in soluzione, espresso in grammi di carbonio al litro (gC/l). Nell'idrolisi condotta a T=190°C e t=20 minuti è stato ottenuto un valore di TOC pari a 5.184 gC/l. Da questo, è possibile passare alla massa di carbonio contenuta nel volume ($V_i=20$ ml) di idrolizzato tramite la formula (3.1).

$$gC_{\text{soluzione}} = TOC \times V_i \quad (3.1)$$

Si ottiene $gC_{\text{soluzione}}=0.104$ gC. Come descritto al paragrafo 3.3.1, l'emicellulosa è l'unica componente lignocellulosica ad essere stata convertita. Di conseguenza è lecito considerare che il carbonio passato in soluzione, valutato tramite TOC, derivi esclusivamente dalla emicellulosa contenuta nel guscio di noce. Dunque $gC_{\text{soluzione}}$ rappresenta i grammi di carbonio di emicellulosa convertiti e passati in soluzione.

Tabella 3.3 Composizione media del guscio di noce, Verardi *et al.* (2012)

| | Cellulosa, % | Emicellulosa, % | Lignina, % |
|----------------|--------------|-----------------|------------|
| Guscio di noce | 25-30 | 25-30 | 30-40 |

Noto $gC_{\text{soluzione}}$, per valutare la conversione è necessario stimare i grammi totali di carbonio emicellulosico contenuti in 1g di guscio di noce ($gC_{\text{emicellulosa}}$). Si procede considerando per semplicità che l'emicellulosa sia costituita da solo xilosio:



Si calcola $gC_{\text{emicellulosa}}$ tramite la seguente relazione (3.2):

$$gC_{\text{emicellulosa}} = h \times m_g \times \frac{(nC \times mC) \times DP}{(nC \times mC + nH \times mH + nO \times mO) \times DP} \quad (3.2)$$

Dove:

- h è la percentuale in peso di emicellulosa contenuta nel guscio di noce, presa pari a 25% (Tabella 3.3)
- m_g è la massa di guscio di noce sottoposto ad idrolisi
- DP = grado di polimerizzazione (ininfluente ai fini del calcolo)
- $nC=5$ (n. atomi di carbonio nell'unità monomerica), $mC=12$ g/mol
- $nH=8$ (n. atomi di idrogeno nell'unità monomerica), $mH=1$ g/mol
- $nO=4$ (n. atomi di ossigeno nell'unità monomerica), $mO=16$ g/mol

Si ottiene $gC_{\text{emicellulosa}}=0.114$ gC. Adesso, tramite la (3.3) è possibile calcolare la conversione di emicellulosa:

$$\zeta = \frac{gC_{\text{soluzione}}}{gC_{\text{emicellulosa}}} \quad (3.3)$$

Si ottiene una conversione di emicellulosa pari a $\zeta=91\%$ e di questa il 60% in peso in xilosio, valore ottenuto facendo riferimento alle componenti note dalle analisi HPLC (Tabella 3.5).

I valori di conversione ottenuta negli esperimenti effettuati sono state riportate in Tabella 3.4.

Tabella 3.4 Conversione di emicellulosa a 170, 190 e 210°C per 10 e 20 minuti

| tempo, min | Temperatura, °C | | |
|------------|-----------------|-----|-----|
| | 170 | 190 | 210 |
| 10 | 46% | 85% | 73% |
| 20 | 64% | 91% | 65% |

Fino a 190 °C la conversione aumenta all'aumentare del tempo di esposizione. A T=210°C invece, la percentuale di emicellulosa convertita e presente nell'idrolizzato sottoforma di xilosio, furfurale e acido formico e acetico è minore, perché a questa temperatura iniziano a formarsi dei prodotti di degradazione solidi che, essendo insolubili, non vengono misurati dal TOC.

La percentuale in peso di xilosio nell'idrolizzato (riferita ai componenti noti) è stata riportata in Tabella 3.5.

Tabella 3.5 % in peso di xilosio nell'idrolizzato ottenuto a 170, 190 e 210°C per 10 e 20 minuti

| tempo, min | Temperatura, °C | | |
|------------|-----------------|-----|-----|
| | 170 | 190 | 210 |
| 10 | 56% | 66% | 11% |
| 20 | 68% | 60% | 6% |

A 170 e 190 °C lo xilosio è il componente maggiormente presente in soluzione, in particolare, il valore massimo di percentuale in peso di xilosio nell'idrolizzato (68%) è stato ottenuto alle condizioni di 170°C e 20 minuti, alle quali, però, la conversione dell'emicellulosa è pari solo al 64%. Tenendo conto della necessità di convertire la maggiore quantità di emicellulosa possibile e considerando l'effetto tossico dei prodotti di degradazione dello xilosio sul batterio impiegato nel successivo "step" di fermentazione, è conveniente condurre l'idrolisi del guscio di noce a 190°C per 10 o 20 minuti, condizioni alle quali si ottiene una conversione di emicellulosa pari all'85% o 91% ed una percentuale in peso di xilosio del 66% o 60%, rispettivamente.

3.4 Fermentazione di xilosio commerciale con *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* CECT 286

Il terreno di fermentazione utilizzato è il **Medium A**: peptone 10 g/L, estratto di carne 10 g/L, estratto di lievito 5 g/L, citrato di ammonio 2 g/L, acetato di sodio 5 g/L, MgSO₄-7H₂O 0.2 g/L, MnSO₄-H₂O 0.005 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, idrocloruro di cisteina 1 g/L, hepes 11 g/L, xilosio 10 g/L.

3.4.1 Fermentazione 1

Le condizioni operative della fermentazione 1 sono riportate in Tabella 3.6.

Tabella 3.6 Condizioni operative fermentazione 1

| Fermentazione n. | 1 |
|----------------------------|--|
| Tipo di microrganismo | <i>Lactobacillus delbrueckii delbrueckii</i> |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium A |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 12 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 10.0 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 3.3 g/l |
| pH di lavoro | 7 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

Gli andamenti della densità ottica (600 nm) e della concentrazione di acido lattico, xilosio e glucosio sono riportati in Figura 3.7. Al tempo zero è già presente acido lattico con una concentrazione di 2.5 g/l. Esso deriva dalla precultura, utilizzata come inoculo. Anche il glucosio presente nel brodo è dovuto all'inoculo. Durante le 72 ore, la concentrazione di xilosio è costante e pari al valore iniziale (10 g/l), indice della totale incapacità del batterio di metabolizzarlo. Il glucosio (3.3 g/l) presente nel terreno, invece, è stato completamente convertito in acido lattico (3.1 g/l). I dati ottenuti sono in accordo con quanto riportato da Castillo Martinez *et al.* (2013), i quali affermano che i batteri LAB capaci di fermentare il glucosio mediante la via omolattica, dei quali fa parte il *Lactobacillus delbrueckii*, non sono capaci di metabolizzare lo xilosio.

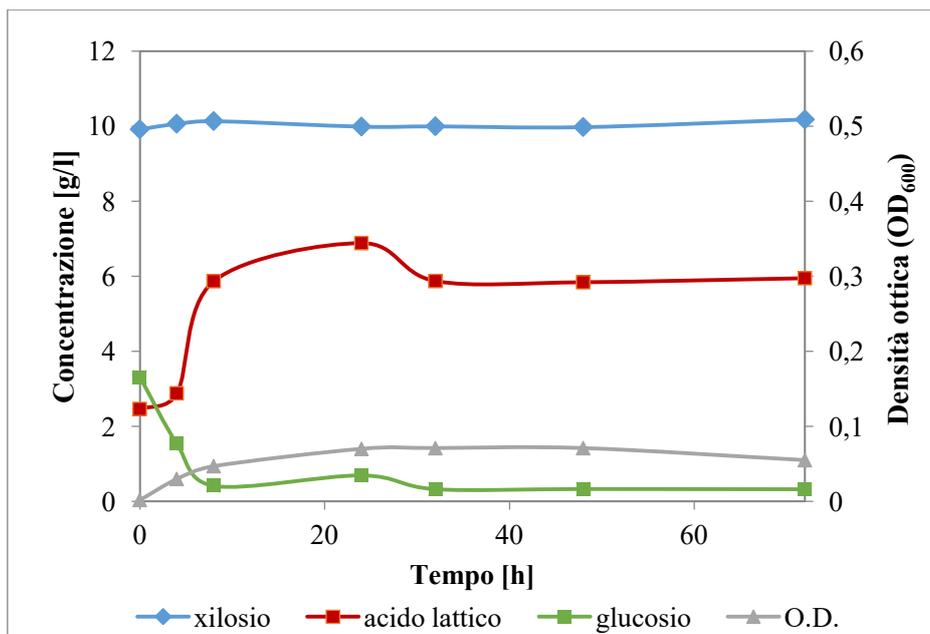


Figura 3.7 OD₆₀₀ e concentrazione di xiloso, glucosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 1

3.5 Fermentazione di xiloso commerciale con *Bacillus coagulans* CECT 561

Il terreno di fermentazione utilizzato è il **Medium B**: (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, NaCl 2 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l, estratto di lievito 10 g/l, xiloso 20 g/l.

3.5.1 Fermentazione 2

Gli esperimenti 2, 3, 4, 5 e 6, che si differenziano fra loro per le condizioni riportate in Tabella 3.7, hanno dato gli stessi risultati. A titolo di esempio, sono stati riportati i risultati del solo esperimento 2; quelli relativi agli esperimenti 3-6 sono disponibili in Appendice.

Tabella 3.7 Condizioni operative fermentazioni 2-6

| Esperimento | Tipologia medium | pH | T, °C | Anaerobiosi |
|-------------|---|------------|-----------|-------------|
| 2 | B | 7.2 | 37 | si |
| 3 | B, con 5.0 g/l di estratto di lievito | 7.2 | 37 | si |
| 4 | B, con aggiunta di 0.05 g/l di MnSO ₄ ·7H ₂ O | 7.2 | 37 | si |
| 5 | B | 6.0 | 37 | si |
| 6 | B | 7.2 | 50 | si |

Le condizioni operative della fermentazione 2 sono riassunte in Tabella 3.8.

Tabella 3.8 Condizioni operative fermentazione 2

| Fermentazione n. | 2 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium B |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 14.1 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.2 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

Come si può osservare dalla Figura 3.8, il *Bacillus coagulans* CECT 561 è stato capace di metabolizzare solo una piccolissima parte dello xilosio, infatti, dopo 120 ore è stata ottenuta una conversione dello zucchero pari al 3%. Di conseguenza, anche la crescita della biomassa e la produzione di acido lattico risultano molto limitate, infatti è stata raggiunta una densità ottica pari a 0.07 e sono stati prodotti 1.9 g/l di acido lattico.

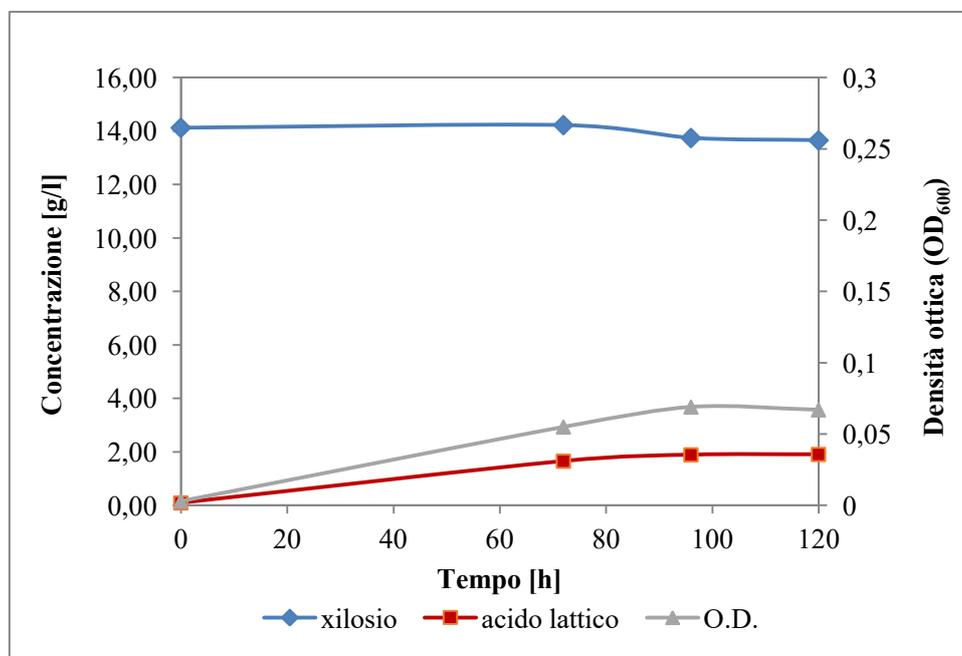


Figura 3.8 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 2

3.5.2 Fermentazione 7

Le condizioni operative adottate nella fermentazione 7 sono riportate in Tabella 3.9.

Tabella 3.9 Condizioni operative fermentazione 7

| Fermentazione n. | 7 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | <i>Batch</i> |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium B |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 16.1 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.2 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | No |

L'esperimento 7, condotto in condizioni aerobiche, ha permesso di ottenere un consumo di xilosio maggiore rispetto a quello condotto in anaerobiosi (fermentazione 2). Si osserva infatti (Figura 3.9) una diminuzione della sua concentrazione da 16.1 a 14.2 g/l in 72 ore, corrispondente ad una conversione di xilosio pari a circa il 13%. Come si può notare dal grafico, non è stato prodotto acido lattico ed il substrato consumato è stato convertito esclusivamente in biomassa, raggiungendo una OD₆₀₀ pari a 0.455.

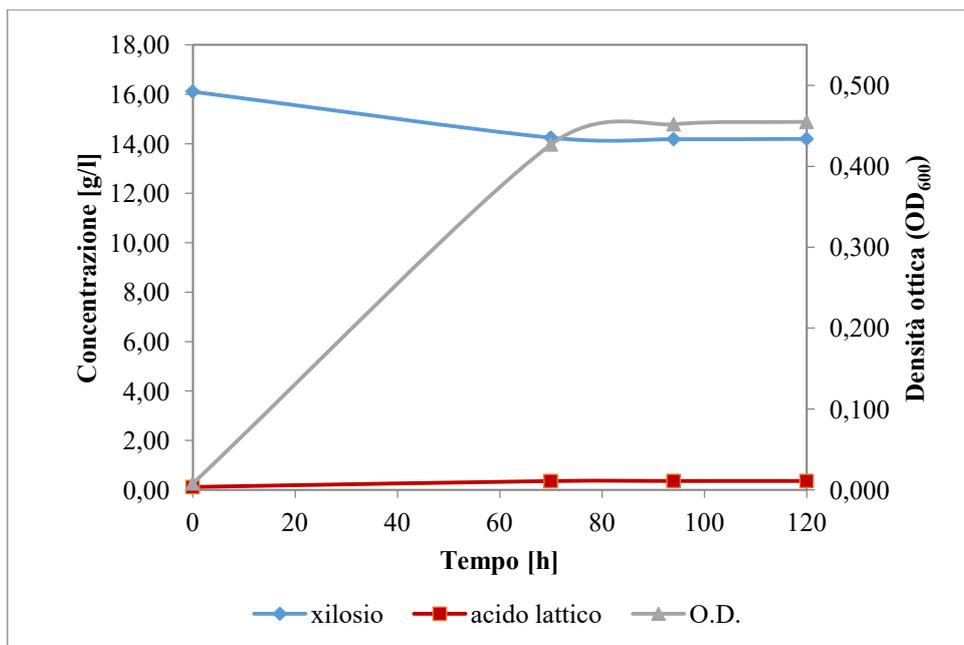


Figura 3.9 OD₆₀₀ e concentrazione di xiloso e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione

7

3.5.3 Fermentazione 8

In questo esperimento si è voluto testare un medium più ricco rispetto al medium B, con l'obiettivo di migliorare la resa del *Bacillus coagulans* CECT 561. È stato dunque utilizzato il **Medium A** con l'aggiunta di 5 g/l di glucosio. Le condizioni operative sono riassunte in Tabella 3.10.

Tabella 3.10 Condizioni operative fermentazione 8

| Fermentazione n. | 8 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium A + 5 g/l di glucosio |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xiloso | 7.4 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 4.2 g/l |
| pH di lavoro | 6.5 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

Come si può vedere dalla Figura 3.10, il batterio è stato capace di consumare completamente i 4.2 g/l iniziali di glucosio, convertendone il 100% dopo circa 72 ore. L'introduzione del glucosio nel medium ha permesso un ottimo sviluppo del batterio che ha raggiunto un valore di OD₆₀₀ pari a 0.220. Grazie a questo, dopo 120 ore la percentuale di xilosio consumato nella fermentazione 8 (19%) è stata maggiore di quella della fermentazione 2 (13%), la quale era caratterizzata da una OD₆₀₀ del batterio pari solamente a 0.07. Lo stesso esperimento, condotto in condizioni aerobiche (fermentazione 9), ha dato risultati praticamente identici (vedi Appendice).

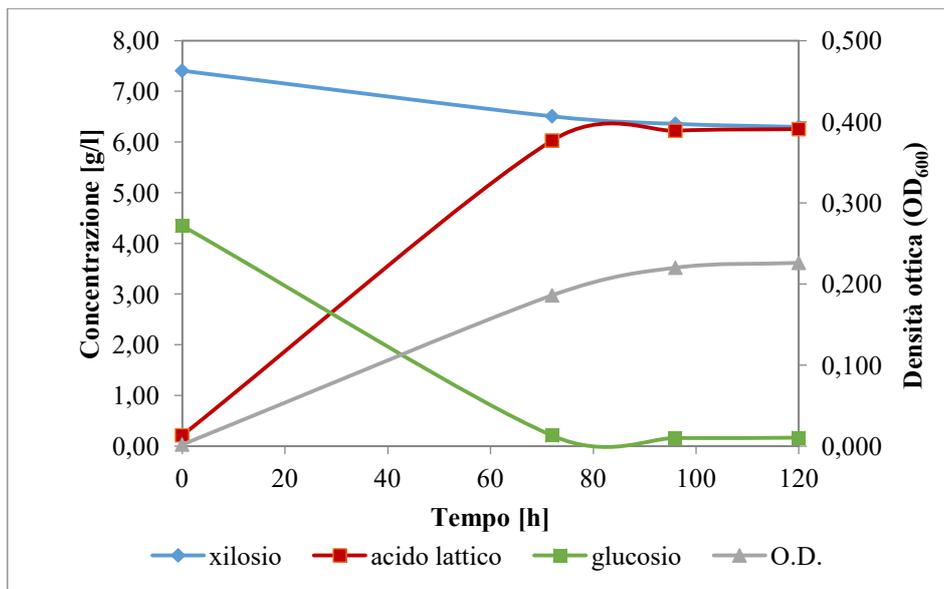


Figura 3.10 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio, glucosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 8

L'obiettivo finale di questo lavoro è quello di fermentare la soluzione prodotta dall'idrolisi del guscio di noce. Come descritto in Tabella 3.2, l'idrolizzato ottenuto contiene quasi esclusivamente xilosio (11.5 g/l) come substrato di fermentazione, infatti, il glucosio è presente solo in quantità trascurabili (0.45 g/l). Di conseguenza, è necessario che il batterio sia capace di raggiungere elevate rese di acido lattico disponendo di xilosio come unico substrato di fermentazione. Come evidenziato dagli esperimenti condotti in presenza del solo pentoso (fermentazioni 2-7), però, la massima resa di acido lattico da xilosio ($Y_{AL/S}$) raggiunta è stata pari al 14% (fermentazione 2), corrispondente ad una produzione di soli 1.9 g/l di acido lattico a partire da 14 g/l di xilosio. Una resa $Y_{AL/S}$ così bassa esclude la possibilità di impiegare il *Bacillus coagulans* CECT 561 ai fini del conseguimento dell'obiettivo prefissato.

3.6 Fermentazione di xilosio commerciale con *Bacillus coagulans* DSM 2314

Medium di fermentazione utilizzati:

- **Medium D:** estratto di lievito 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/l, xilosio 10 g/L.
- **Medium E:** estratto di lievito 10 g/L, peptone 10 g/L, xilosio 10 g/L.

3.6.1 Fermentazione 12

Le condizioni operative adottate nella fermentazione 12 sono riassunte in Tabella 3.11.

Tabella 3.11 Condizioni operative fermentazione 12

| Fermentazione n. | 12 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium E |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 7.1 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

La figura 3.11 mostra che a partire dai 7.1 g/l di xilosio iniziali, lo zucchero viene consumato per il 29% sino ad arrivare a 5.0 g/l in corrispondenza delle 20 ore, tempo a cui si arresta la crescita batterica ed in cui il valore di densità ottica a 600 nm rimane costante e pari a 0.195. Anche la produzione di acido lattico si arresta a 20 ore, raggiungendo un valore di circa 2.3 g/l, corrispondente ad una resa $Y_{AL/S}$ pari a circa il 33%.

Risultati simili sono stati ottenuti nella fermentazione del medium D (fermentazione 10, vedi Appendice), condotta nelle stesse condizioni operative descritte in Tabella 3.11. Lo xilosio è stato consumato in quantità inferiore (19%) e la resa $Y_{AL/S}$ ottenuta è stata pari al 23%.

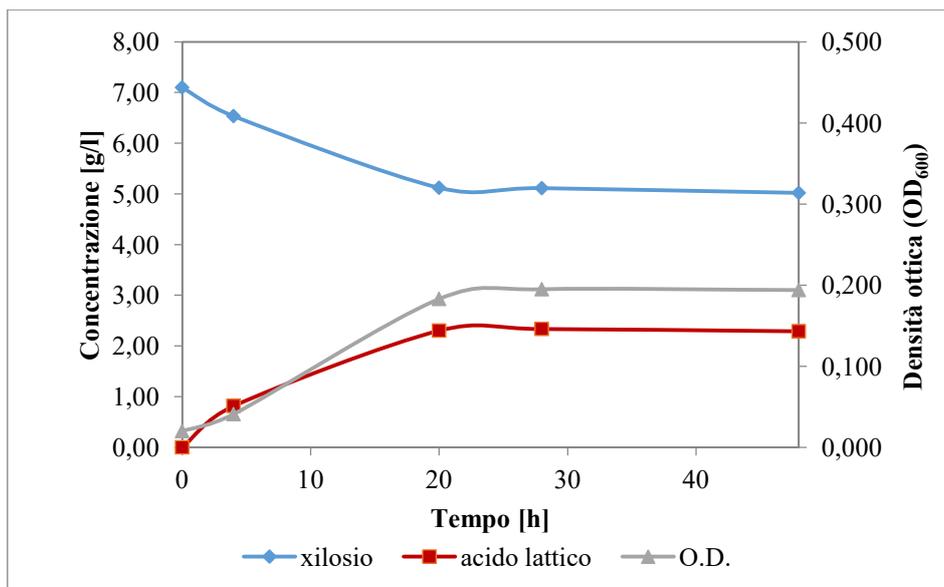


Figura 3.11 OD₆₀₀ e concentrazione di xiliosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 12

3.6.2 Fermentazione 13

Le condizioni operative adottate nella fermentazione 13 sono riassunte in Tabella 3.12.

Tabella 3.12 Condizioni operative fermentazione 13

| Fermentazione n. | 13 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | <i>Batch</i> |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium E + 5 g/l di glucosio |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xiliosio | 7.1 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 4.3 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

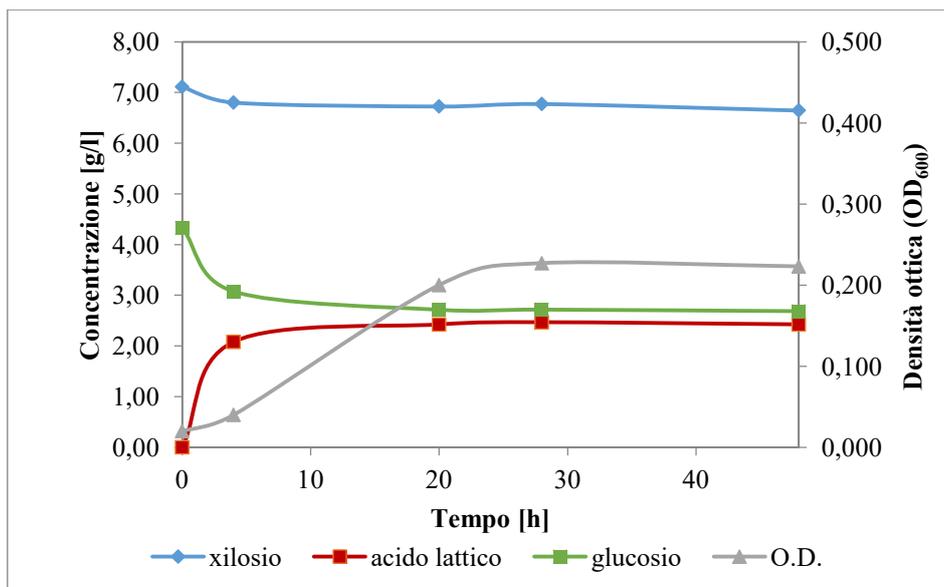


Figura 3.12 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio, glucosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 13

Come mostrato in Figura 3.12, il glucosio è stato convertito per il 37% (da 4.3 a 2.7 g/l) dopo circa 10 ore, per poi non essere più consumato. A 10 ore si arrestano anche la produzione di acido lattico (2.4 g/l prodotti) e il consumo di xilosio, il quale, invece, è stato convertito solo per il 7% (da 7 a 6.6 g/l). Come nell'esperimento precedente, la crescita batterica termina in corrispondenza delle 20 ore, dopo aver raggiunto un OD₆₀₀ pari a 0.227. Risultati simili sono stati ottenuti nella fermentazione 11, vedi Appendice.

Si è osservato che in tutti gli esperimenti effettuati con *Bacillus coagulans* DSM 2314, la produzione di acido lattico ha subito un arresto dopo sole 10 ore, nonostante fosse ancora disponibile gran parte del substrato. Si è proceduto quindi alla valutazione del pH dei brodi di fermentazione (10-13), ed è stato misurato per ognuno di essi un valore di circa 4. Molto probabilmente, un valore di pH pari a 4 risulta essere inibente il batterio. Inoltre, sono state effettuate analisi sul pH del medium di fermentazione dopo la sterilizzazione in autoclave e si è osservato come questo procedimento portasse ad una diminuzione del pH da 7.2 a 6.0. Di conseguenza, come spiegato al paragrafo 2.9, negli esperimenti successivi (14,15) si è proseguito regolando il pH di fermentazione tramite aggiunte di NaOH 6M (esperimento 14) o utilizzando un tampone fosfato (esperimento 15); inoltre, la sterilizzazione in autoclave è stata sostituita con sterilizzazione mediante filtrazione (PVDF, porosità 0.22 µm).

3.6.3 Fermentazione 14 e 15

Le condizioni operative adottate nelle fermentazioni 14 e 15 sono riportate in Tabella 3.13.

Tabella 3.13 Condizioni operative Fermentazione 14 e 15

| Fermentazione n. | 14 e 15 |
|----------------------------|---|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | <i>Batch</i> |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium E |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 10.1 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 controllato con tampone fosfato(14) o con aggiunte di NaOH 6M (15) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

Come si può osservare dalle figure 3.13 e 3.14, la regolazione del pH durante la fermentazione ha permesso di ottenere una conversione di xilosio e una produzione di acido lattico maggiori rispetto agli esperimenti a pH non controllato (fermentazioni 12 e 13). Nell'esperimento 14, infatti, è stata ottenuta una conversione dello xilosio pari all'85% dopo 48 ore e sono stati prodotti circa 8 g/l di acido lattico a partire da 10.1 g/l di pentoso iniziali, corrispondenti ad una resa di acido lattico da xilosio $Y_{AL/S}$ pari al 79%. Nell'esperimento 15 invece, è stata raggiunta una conversione di xilosio del 100% dopo sole 24 h, con una concentrazione di acido lattico prodotto pari a circa 9 g/l e una resa $Y_{AL/S}$ dell'89%. La differenza di risultato fra i due esperimenti è probabilmente legata al metodo di regolazione del pH, in particolare ai tempi di regolazione. Nell'esperimento 15, la regolazione è effettuata dal tampone fosfato in maniera continua e dunque è possibile mantenere il pH ad un valore circa costante durante la fermentazione. Nell'esperimento 14 invece, la regolazione è manuale e dunque discontinua essendo effettuata a diverse ore di distanza (4, 8, 12, 24h). Questo porta inevitabilmente a notevoli escursioni del pH dal valore ottimale. Così facendo, il batterio è costretto ad adattarsi continuamente a nuove condizioni e viene meno la sua capacità produttiva.

Dati gli ottimi risultati ottenuti nella fermentazione 15, la fermentazione dell'idrolizzato del guscio di noce (esperimenti 16 e 17) è stata condotta utilizzando lo stesso medium (adottando la medesima procedura di sterilizzazione), stesse condizioni operative e regolando il pH tramite tampone fosfato.

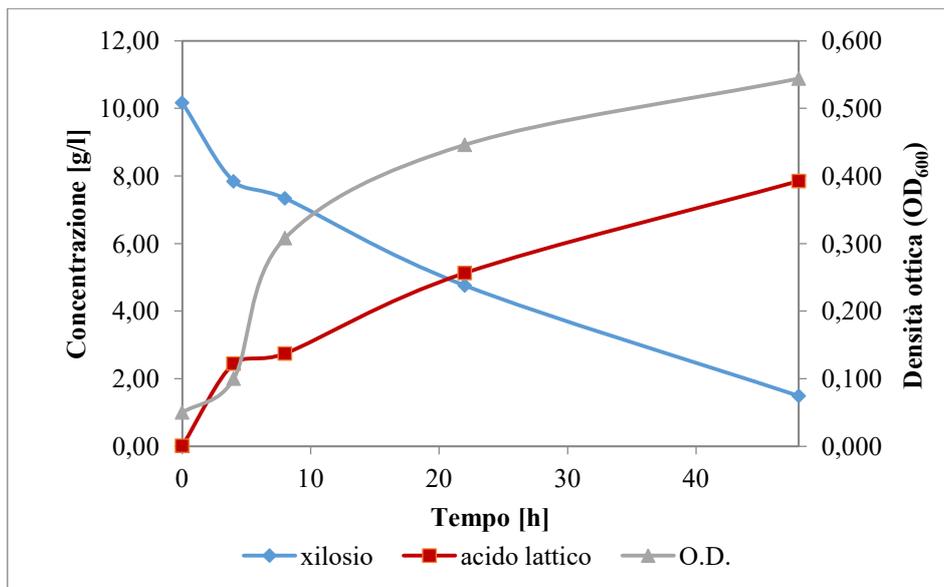


Figura 3.13 OD_{600} e concentrazione di xiliosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 14

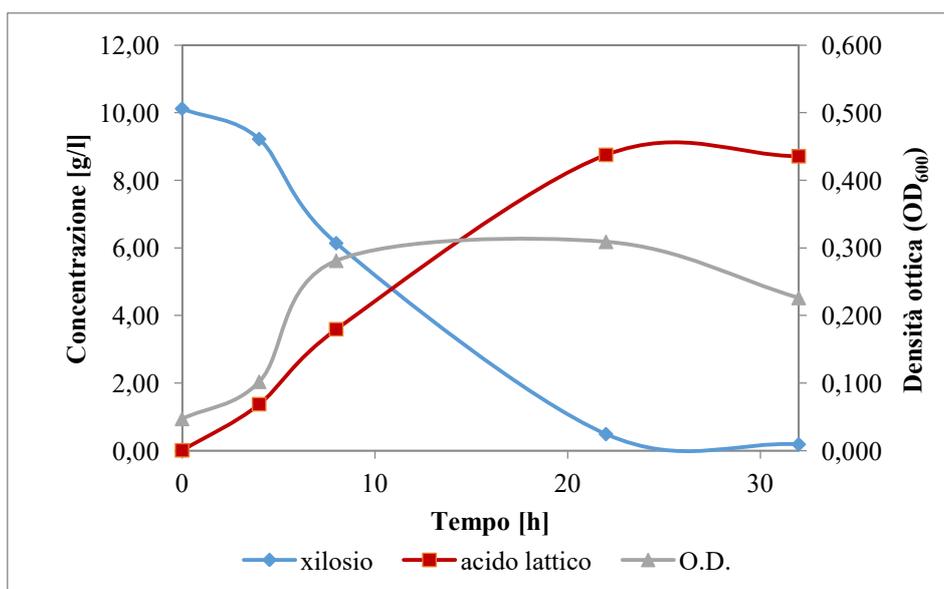


Figura 3.14 OD_{600} e concentrazione di xiliosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 15

3.7 Fermentazione di xilosio da idrolisi con *Bacillus coagulans* DSM 2314

Una volta verificata la capacità del *Bacillus coagulans* DSM 2314 di utilizzare lo xilosio commerciale per la produzione di acido lattico, si è proceduto testando il batterio nella fermentazione di xilosio ottenuto dall'idrolisi (190°C, 20 minuti) del guscio di noce. Oltre al pentoso, l'idrolizzato liquido contiene una certa quantità di acido acetico, acido formico, acido levulinico, furfurale e HMF. Queste sostanze potrebbero inibire la crescita del microrganismo perché tossiche (van der Pol *et al.*, 2016; Jönsson *et al.*, 2013). Il medium di fermentazione è ottenuto miscelando in parti uguali l'idrolizzato del guscio di noce e la soluzione contenente peptone, estratto di lievito e tampone fosfato (vedi preparazione a paragrafo 2.10.1), di conseguenza presenta anch'esso le sostanze suddette ma in concentrazione dimezzata (Tabella 3.14).

Tabella 3.14 Concentrazione di sostanze tossiche nel medium di fermentazione preparato a partire dall'idrolizzato ottenuto a 190°C e 20 min

| | Acido acetico | Acido formico | Acido levulinico | Furfurale | HMF |
|---------|---------------|---------------|------------------|-----------|------|
| C [g/l] | 1,7 | 0.49 | 0.12 | 0,98 | 0,09 |

3.7.1 Fermentazione 16

Le condizioni operative della fermentazione 16 sono riportate in Tabella 3.15.

Tabella 3.15 Condizioni operative fermentazione 16

| Fermentazione n. | 16 |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | <i>Batch</i> |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium E (da idrolizzato) |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 12 ore |
| Conc. Iniziale xilosio | 4.3 g/l |
| Conc. Iniziale glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 (controllato con tampone fosfato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

I risultati ottenuti (Figura 3.15) dimostrano la capacità del batterio di utilizzare lo xilosio derivante dall'idrolisi del guscio di noce. Lo zucchero, infatti, è stato consumato per il 76% ed è stata ottenuta una resa di acido lattico da xilosio $Y_{AL/S}$ pari all'85%. Sono stati prodotti 3.7 g/l di acido lattico a partire da una concentrazione iniziale del pentoso di 4.3 g/l. I sottoprodotti dell'idrolisi del guscio di noce (Tabella 3.14) presenti nel medium di fermentazione potrebbero essere la causa della non completa conversione dello xilosio. A supporto di quanto appena ipotizzato, van der Pol *et al.* (2016) riportano che, in una fermentazione batch a pH controllato con *Bacillus coagulans* DSM 2314, i 20 g/l iniziali di xilosio (commerciale) sono stati consumati per il 55% in presenza di tali sostanze (Tabella 3.16), mentre, se non presenti, la conversione di xilosio raggiunta è stata quasi del 100%.

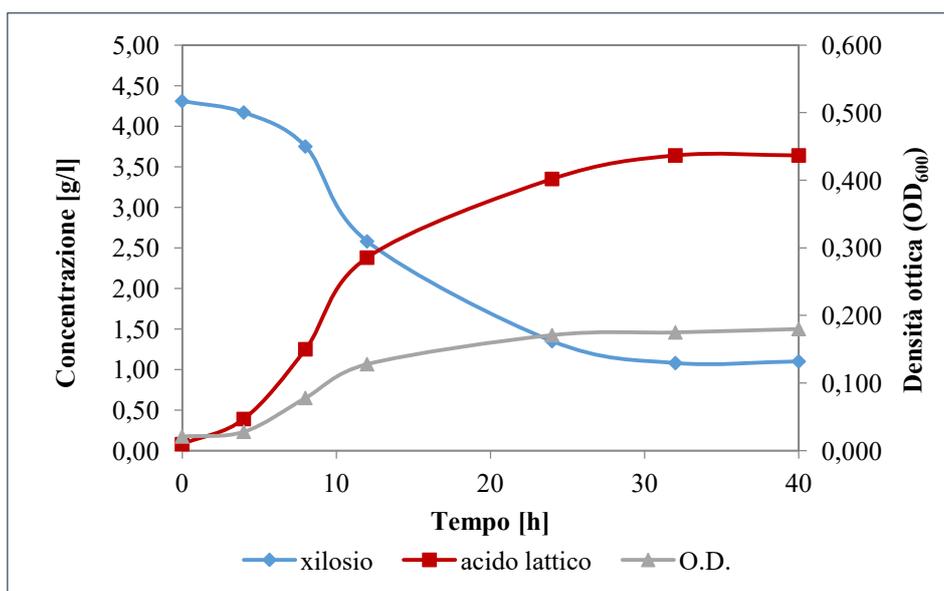


Figura 3.15 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 16

Tabella 3.16 Concentrazione di sostanze tossiche nel medium di fermentazione riportate da van der Pol *et al.* (2016)

| | Acido acetico | Acido formico | Acido levulinico | Furfurale | HMF |
|---------|---------------|---------------|------------------|-----------|------|
| C [g/l] | 3.13 | 0.29 | 2.06 | 1.63 | 0,19 |

3.7.2 Fermentazione 17

Le condizioni operative della fermentazione 17 sono riportate in Tabella 3.17.

Tabella 3.17 Condizioni operative fermentazione 17

| Fermentazione n. | 16 |
|-------------------------|---|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da precoltura con xilosio commerciale |
| Modalità di coltura | <i>Batch</i> |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium E (da idrolizzato) |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.3 |
| Età inoculo | 12 ore |
| Conc. Iniziale xilosio | 4.4 g/l |
| Conc. Iniziale glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 (controllato con tampone fosfato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

Come detto al paragrafo 2.10.2, nell'esperimento 17 la fermentazione del medium contenente xilosio da idrolisi è stata preceduta dall'adattamento del batterio nel medium contenente xilosio commerciale. Dalla Figura 3.16 si può notare l'assenza della fase di latenza nella curva di crescita del batterio, la quale inizia subito in fase esponenziale. Al tempo zero è già presente acido lattico con una concentrazione di 0.8 g/l. Esso deriva dalla precoltura con xilosio commerciale, utilizzata come inoculo. La resa $Y_{AL/S}$ ottenuta è stata pari al 91% e sono stati prodotti 4.0 g/l di acido lattico a partire da 4.4 g/l di xilosio. Come nella fermentazione 16, la conversione dello xilosio è stata parziale e pari al 79%.

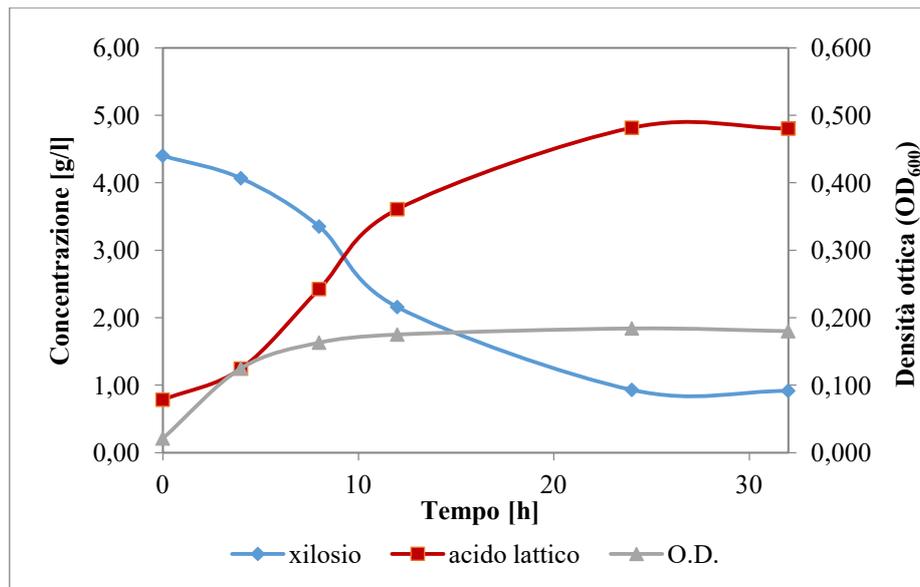


Figura 3.16 OD₆₀₀ e concentrazione di xiliosio e acido lattico in funzione del tempo nella fermentazione 17

Negli esperimenti condotti con *Bacillus coagulans* DSM 2314, sia lo xiliosio commerciale che quello ottenuto dall'idrolisi del guscio di noce sono stati convertiti principalmente in acido lattico, mentre l'acido acetico è stato prodotto in quantità trascurabili. Ad esempio, nell'esperimento 16 sono stati prodotti soli 0,2 g/l di acido acetico contro 4,0 g/l di acido lattico. Questo risultato indica la capacità del batterio di utilizzare lo xiliosio per produrre acido lattico mediante la via omolattica. Quanto appena detto è confermato dal fatto che la resa di acido lattico da xiliosio ottenuta è stata al minimo pari al 79%, superiore al valore di massima resa teorica della fermentazione di xiliosio mediante la via eterolattica (60%). A supporto di tale ipotesi, Otto (2004) riporta che il *Bacillus coagulans* DSM 2314 è in grado di convertire gli zuccheri pentosi in acido lattico tramite la via omolattica.

3.7.3 Confronto tra le fermentazioni 15 e 16

L'esperimento 15 prevede la fermentazione di xiliosio commerciale per la produzione di acido lattico, mentre nell'esperimento 16 è stato fermentato lo xiliosio ottenuto dall'idrolisi (190°C, 20 minuti) del guscio di noce.

Le formule utilizzate per ricavare la conversione di xiliosio (ζ_x), la resa di acido lattico da xiliosio ($Y_{AL/S}$), la produttività di acido lattico Q_{AL} e la produttività specifica di acido lattico ($q_{AL/S}$) sono di seguito elencate:

$$\zeta_x = \frac{\text{Xiliosio iniziale (g/l)} - \text{xiliosio finale (g/l)}}{\text{Xiliosio iniziale (g/l)}} \quad (3.4)$$

$$Y_{AL/S} = \frac{\text{Acido lattico finale (g/l)} - \text{acido lattico iniziale (g/l)}}{\text{Xiliosio iniziale (g/l)}} \quad (3.5)$$

$$Q_{AL} = \frac{\text{Acido lattico finale (g/l)} - \text{acido lattico iniziale (g/l)}}{\text{Durata fermentazione (ore)}} \quad (3.6)$$

$$q_{AL} = \frac{\text{Acido lattico finale (g/l)} - \text{acido lattico iniziale (g/l)}}{\text{Durata fermentazione (ore)} \times \text{xilosio iniziale (g/l)}} \quad (3.7)$$

Per quanto riguarda la concentrazione finale di acido lattico ottenuta, non è possibile mettere a confronto i due esperimenti, in quanto il quantitativo di xilosio iniziale è molto diverso. Per la stessa ragione, è necessario ragionare in termini di produttività specifica di acido lattico q_{AL} (riferita alla concentrazione di xilosio iniziale). Come mostrato in Tabella 3.18, nella fermentazione 16 la conversione di xilosio ζ_x , la resa $Y_{AL/S}$ e la produttività specifica q_{AL} ottenute sono inferiori rispetto all'esperimento 15 e questo, molto probabilmente, a causa della presenza di sostanze tossiche derivanti dall'idrolisi del guscio di noce, come spiegato all'inizio del paragrafo 3.7.

Tabella 3.18 Confronto fra le fermentazioni 15 e 16

| # | X iniziale (g/l) | ζ_x | AL prodotto (g/l) | $Y_{AL/S}$ (g/g) | q_{AL} [(g/l·h)/(g/l)] | Q_{AL} (g/l·h) |
|----|------------------|-----------|-------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| 15 | 10.0 | 100% | 8.86 | 89% | 0.040 | 0.40 |
| 16 | 4.31 | 76% | 3.65 | 85% | 0.026 | 0.11 |

X: xilosio, AL: acido lattico

3.7.4 Confronto tra le fermentazioni 16 e 17

La conversione ζ_x , la resa $Y_{AL/S}$ e le produttività Q_{AL} e q_{AL} sono state calcolate rispettivamente tramite la (3.4), (3.5), (3.6) e (3.7).

Entrambi gli esperimenti consistono nella fermentazione dello xilosio ottenuto per idrolisi del guscio di noce (190°C, 20 minuti). Nell'esperimento 17, però, è stata effettuata una precoltura in un medium contenente xilosio commerciale. Come si può vedere dalla Tabella 3.19, questo passaggio ha migliorato principalmente la produttività Q_{AL} (da 0.11 a 0.17 g/l), in quanto è stata eliminata la fase di latenza della curva di crescita del batterio. Inoltre, sono aumentate la conversione dello xilosio ζ_x , la produzione di acido lattico e la resa $Y_{AL/S}$.

Tabella 3.19 Confronto fra le fermentazioni 16 e 17

| # | X iniziale (g/l) | ζ_x | AL prodotto (g/l) | $Y_{AL/S}$ (g/g) | q_{AL} [(g/l·h)/(g/l)] | Q_{AL} (g/l·h) |
|----|------------------|-----------|-------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| 15 | 4.31 | 76% | 3.65 | 85% | 0.026 | 0.11 |
| 16 | 4.40 | 79% | 4.01 | 91% | 0.039 | 0.17 |

X: xilosio, AL: acido lattico

4. Conclusioni

L'obiettivo del seguente lavoro di tesi è stato quello di definire un processo *ex novo* per la produzione di acido lattico a partire da guscio di noce. Il processo consiste di due "step" distinti: l'idrolisi del guscio di noce tramite reattore a microonde al fine di ottenere xilosio e la successiva fermentazione batterica dell'idrolizzato per produrre acido lattico.

I risultati raggiunti idrolizzando il guscio di noce dimostrano l'effettiva possibilità di ottenere xilosio a partire da biomassa emicellulosica. Operando in reattore a microonde a 190°C per 20 minuti, con granuli di dimensione pari a 1-2 mm e senza l'ausilio di catalizzatori acidi, l'emicellulosa contenuta nel guscio di noce è stata idrolizzata per il 91%, con una percentuale in peso di xilosio nell'idrolizzato pari al 60% del totale.

Per quanto riguarda la fermentazione dello xilosio commerciale per la produzione di acido lattico, sono stati testati tre differenti ceppi batterici: *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* CECT 286, *Bacillus coagulans* CECT 561 e *Bacillus coagulans* DSM 2314. Quest'ultimo è stato l'unico batterio capace di metabolizzare lo xilosio commerciale e produrre acido lattico. È stata condotta una fermentazione "batch", in condizioni anaerobiche a 55°C e pH=7.2 (controllato). Lo xilosio è stato convertito per il 98% in 22 h, ottenendo 9 g/l di acido lattico e soli 0,4 g/l di acido acetico (fermentazione omolattica), una produttività (Q_{AL}) e una resa di acido lattico da xilosio ($Y_{AL/S}$) rispettivamente di 0.4 g/lh e 89%.

Successivamente, *Bacillus coagulans* DSM 2314 è stato testato nella fermentazione dello xilosio ottenuto per idrolisi del guscio di noce. Il medium di fermentazione è stato realizzato a partire dall'idrolizzato ottenuto a 190°C e 20 minuti. Come per l'esperimento con xilosio commerciale, è stata condotta una fermentazione "batch", in anaerobiosi, 55°C e pH=7.2 (controllato). Lo xilosio iniziale (4.4 g/l) è stato convertito per il 79% e sono stati prodotti 4 g/l di acido lattico e 0.2 g/l di acido acetico, ottenendo una produttività Q_{AL} ed una resa $Y_{AL/S}$ di 0.17 g/lh e 91%, rispettivamente. A differenza della fermentazione di xilosio commerciale, lo xilosio da idrolisi non è stato totalmente convertito e questo è dovuto molto probabilmente alla presenza dei sottoprodotti di idrolisi nel medium di fermentazione, i quali risultano inibire la crescita di *Bacillus coagulans* DSM 2314.

5. Bibliografia

- Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y. and Sonomoto K., 2013, Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. **31** (6), 877-902.
- Bai D., Zhao X., Li X. and Xu S., 2004, Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochemical Engineering Journal*. **18** (1), 41-48.
- Bayitse R., 2015, Lactic Acid Production from Biomass: Prospect for Bioresidue Utilization in Ghana: Technological Review. *International Journal of Applied Science and Technology*. **5**.
- Biophoretics.com, 2016, Xylan Hemicellulose, available online at:
<http://biophoretics.com/biochemicals-a-z/1506-xylan-cas-9014-63-5.html>.
- Cai J., He Y., Yu X., Banks S. W., Yang Y., Zhang X., Yu Y., Liu R. and Bridgwater A. V., 2017, Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **76** (C), 309-322.
- Castillo Martinez F. A., Balciunasa E. M., Salgado J.M., Domínguez Gonzalez J.M., Converti A. and Oliveira R. P., 2013, Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **30**, 70-83.
- Castro-Aguirre E., Iñiguez-Franco F., Samsudin H., Fang X. and Auras R., 2016, Poly(lactic acid). Mass production, processing, industrial. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **107**, 333-366.
- Fan J., De bruyn M., Zhu Z., Budarin V., Gronnow M., Gomez L. D., Macquarrie D. and Clark J., 2013, Microwave-enhanced formation of glucose from cellulosic waste. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. **71** (C), 37-42.
- Farah S., Anderson D.G. and Langer R., 2016, Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications. A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **107**, 367-392.
- Gavilá L., Constantí M. and Medina F., 2015, D-Lactic acid production from cellulose: dilute acid treatment of cellulose assisted by microwave followed by microbial fermentation. *Cellulose*. **22** (5), 3089-3098.
- Ghaffar T., Irshad M., Anwar Z., Aqil T., Zulifqar Z., Tariq A., Kamran M., Ehsan N. and Mehmood S., 2014, Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. **7**, 222-229.
- Global Market Insights, Lactic Acid and Polylactic Acid (PLA) Market, 2016, available online at:
<https://www.gminsights.com/industry-analysis/lactic-acid-and-polylactic-acid-market>.

- Hricovíniová Z., 2013, Xylans are a valuable alternative resource: Production of d-xylose, d-lyxose and furfural under microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*. **98**, 1416-1421.
- Jamshidian M., Tehrani E. A., Imran M., Jacquot M. and Desobry S., 2010, Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **9**, 552-571.
- Jönsson L. J., Alriksson B. and Nilvebrant N.O., 2013, Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. **6** (1), 16.
- Lasprilla A.J.R., Martinez, G.A.R., Lunelli B.H., Jardini A.L. and Filho R.M., 2012, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology Advances*. **30** (1), 321-328.
- Maki M., Leung K. T. and Qin W., 2009, The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*. **5** (5), 500-516.
- Meng Y., Xue Y., Yu B., Gao C. and Ma Y., 2012, Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp WL-S20. *Bioresource technology*. **116**, 334-9.
- Microbewiki.kenyon.edu, 2012, Lignocellulose biodegradation in Asian long-horned beetle, available online at:
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lignocellulose_biodegradation_in_Asian_long-horned_beetle.
- Otto R., 2004, *Preparation of lactic acid from a pentose-containing substrate*. International application No US 10/755,392. International Publication No. US20040203122 A1.
- Patel M. A., Ou M. S., Harbrucker R., Aldrich H. C., Buszko M. L., Ingram L. O. and Shanmugam K. T., 2006, Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*. **72** (5), 3228-3235.
- Ramot Y., Haim-Zada M., Domb A.J. and Nyska A., 2016, Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **107**, 153-162.
- Ricci E., Viola E., Zimbardi F. e Braccio G., Etanolo da biomasse lignocellulosiche: produzione di etanolo da paglia di grano mediante pretrattamento di steam explosion, idrolisi enzimatica e fermentazione. Progetto ISSN/1124/7932. ENEA - Divisione Fonti Rinnovabili di Energia Centro Ricerche Trisaia, Policoro (MT), Maggio 2001.
- Seidl P. R. and Goulart A. K., 2016, Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. **2** (C), 48-53.
- Shrestha S., Fonoll X., Khanal S. K. and Raskin L., 2017, Biological strategies for enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass during anaerobic digestion: Current status and future perspectives. *Bioresource Technology*. **245** (A), 1245-1257.

- Taskila S. and Ojamo, H., 2013, The Current Status and Future Expectations in Industrial Production of Lactic Acid by Lactic Acid Bacteria, in “*Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*”, (J. M. Kongo, Ed.), Chap. 26, InTech, Rijeka, Croatia, [ISBN 978-953-51-0955-6].
- van der Pol E., Springer J., Vriesendorp B., Weusthuis R. and Eggink G., 2016, Precultivation of *Bacillus coagulans* DSM2314 in the presence of furfural decreases inhibitory effects of lignocellulosic by-products during L(+)-lactic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **100** (24), 10307-10319.
- Veluchamy C. and Kalamdhad A.S., 2017, Enhancement of hydrolysis of lignocellulose waste pulp and paper mill sludge through different heating processes on thermal pretreatment. *Journal of Cleaner Production*. **168** (C), 219-226.
- Verardi A., De Bari I., Ricca E. and Calabrò V., 2012, Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives, in “*Bioethanol*”, (M. A. P. Lima, A. P. P. Natalense, Eds.), Chap. 5, InTech, Rijeka, Croatia, [ISBN: 978-953-51-0008-9].
- Vink E. T. H. and Davies S., 2015, Life Cycle Inventory and Impact Assessment Data for 2014 Ingeo™ Polylactide Production. *Industrial Biotechnology*. **11** (3), 167-180.
- Wang Y., Tashiro Y. and Sonomoto K., 2015, Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **119** (1), 10-18.
- Wee, Y., Kim, J. and Ryu, H., 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*. **44** (2), 163-172.
- Wong J.W.C., Tyagi R.D. and Pandey, A., 2016, *Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management*, Chap. 1, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands.
- Yan Y.H., Li H.L., Ren J.L., Lin Q.X., Peng F., Sun R.C. and Chen K.F., 2017, Xylo-sugars production by microwave-induced hydrothermal treatment of corncob: Trace sodium hydroxide addition for suppression of side effects. *Industrial Crops and Products*. **101**, 36-45.
- Ye L., Zhou X., Hudari M. S. B., Li Z. and Wu J.C., 2013, Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*. **132** (C), 38-44.

5. Appendice

Tabella 5.1 Condizioni operative fermentazione 3

| Fermentazione n. | 3 |
|----------------------------|---|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium B con 5.0 g/l di estratto di lievito |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 13.7 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.2 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

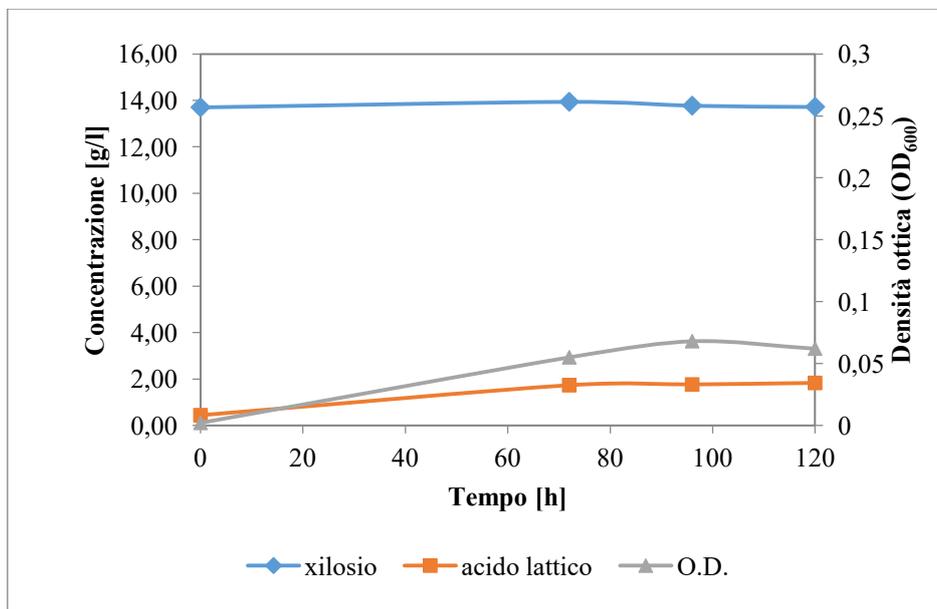


Figura 5.1 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 3

Tabella 5.2 Condizioni operative fermentazione 4

| Fermentazione n. | 4 |
|----------------------------|---|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium B con aggiunta di 0.05 g/l di MnSO ₄ •7H ₂ O |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 13.5 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.2 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

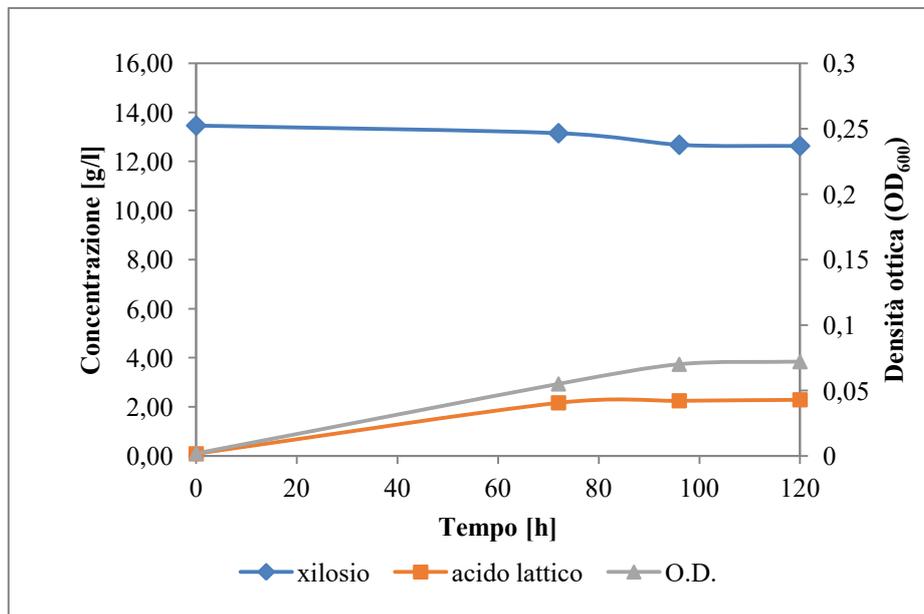


Figura 5.2 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 4

Tabella 5.3 Condizioni operative fermentazione 5

| Fermentazione n. | 5 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium B |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 16.5 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 6.0 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

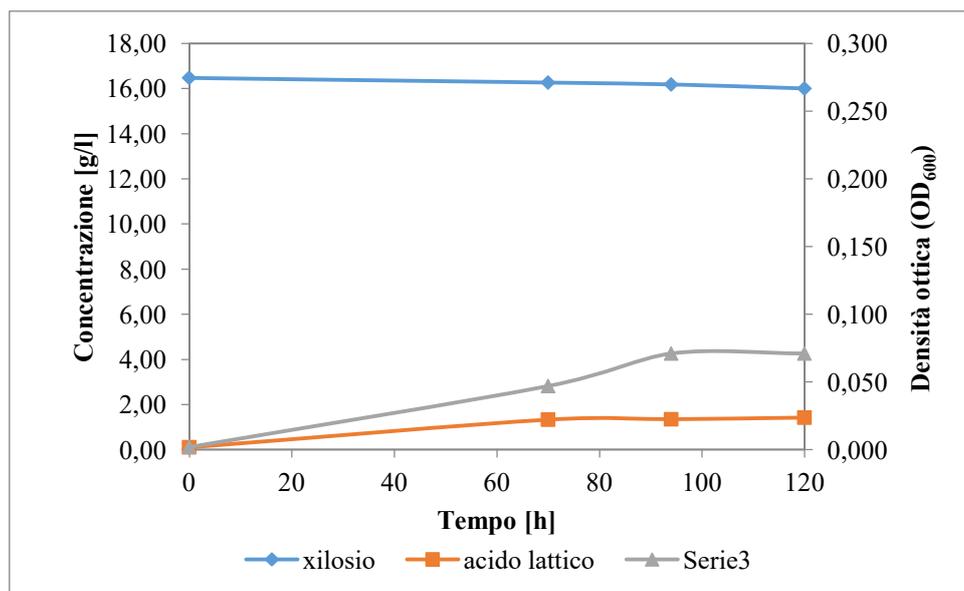


Figura 5.3 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 5

Tabella 5.4 Condizioni operative fermentazione 6

| Fermentazione n. | 6 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium B |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 16.0 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.2 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

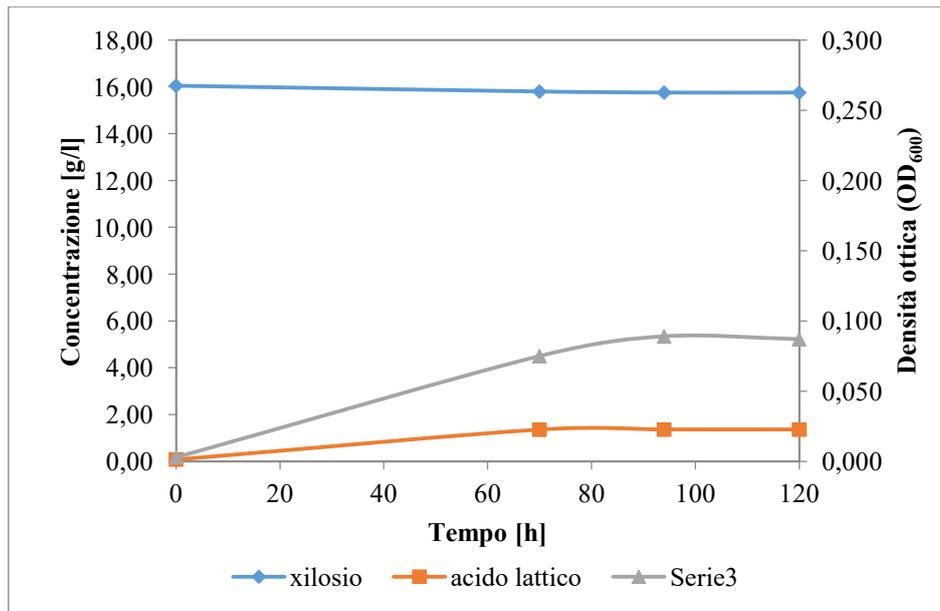


Figura 5.4 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 6

Tabella 5.5 Condizioni operative fermentazione 9

| Fermentazione n. | 9 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> CECT 561 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium A + 5 g/l di glucosio |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 4.8 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 4.0 g/l |
| pH di lavoro | 6.5 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 37 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | No |

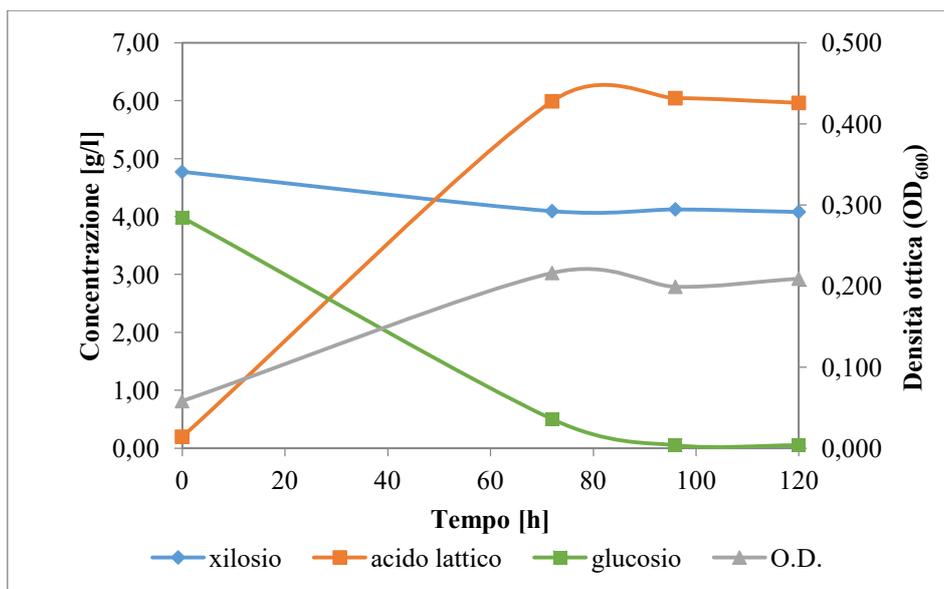


Figura 5.5 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio, glucosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 9

Tabella 5.6 Condizioni operative fermentazione 10

| Fermentazione n. | 10 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium D |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 6.2 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 0 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

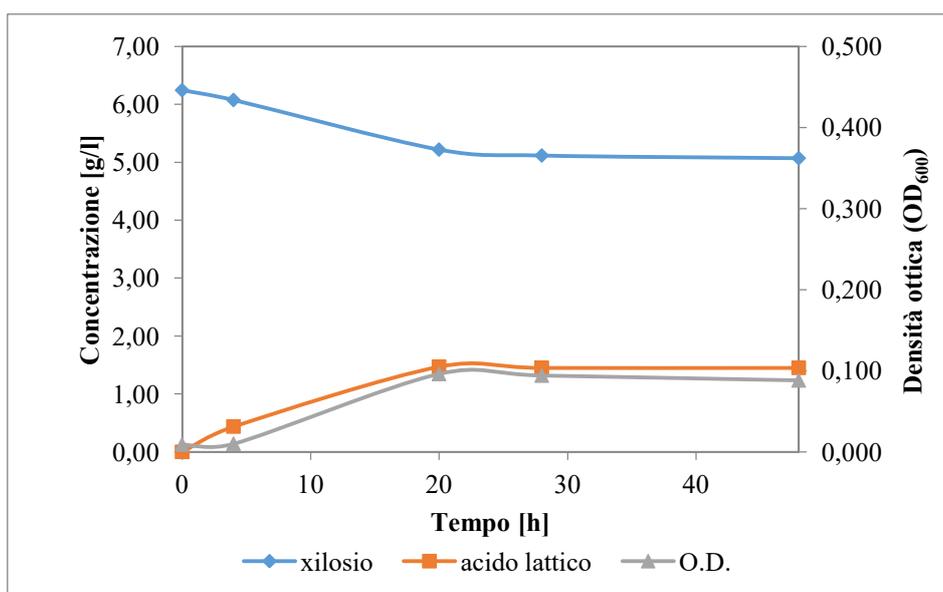


Figura 5.6 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 10

Tabella 5.7 Condizioni operative fermentazione 11

| Fermentazione n. | 11 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Tipo di microrganismo | <i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314 |
| Tipo di inoculo | Inoculo da medium di adattamento |
| Modalità di coltura | Batch |
| Volume di lavoro | 25 mL |
| Terreno di coltura | Medium D + 5 g/l di glucosio |
| Quantità di inoculo | 10% v/v |
| Assorbanza inoculo | 0.1 |
| Età inoculo | 24 ore |
| Conc. iniziale di xilosio | 6.2 g/l |
| Conc. iniziale di glucosio | 4.0 g/l |
| pH di lavoro | 7.3 (non controllato) |
| Temperatura di lavoro | 55 °C (controllato) |
| Agitazione | 150 rpm |
| Anaerobiosi | Si |

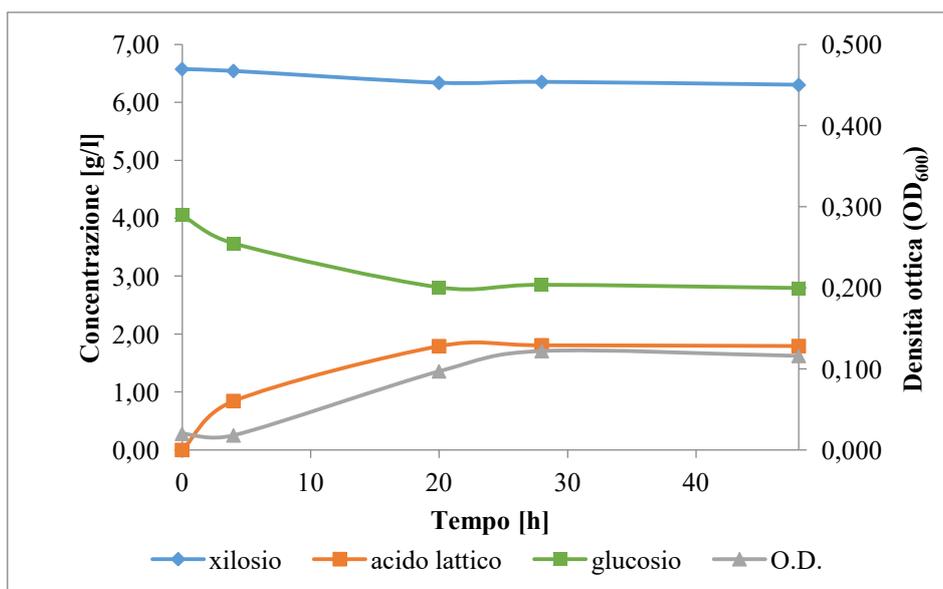


Figura 5.7 OD₆₀₀ e concentrazione di xilosio, glucosio e acido lattico in funzione del tempo nella Fermentazione 11