

Produzione di bioetanolo di seconda generazione dalla canna comune (*Arundo donax* L.)

Danilo Scordia,¹ Salvatore L. Cosentino,¹ Venera Copani,¹ Giorgio Testa,¹ Thomas W. Jeffries²

¹Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), Università di Catania, Catania, Italia; ²Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA

Abstract

Lo scopo del presente lavoro è stato studiare l'effetto di temperatura, tempo di reazione e concentrazione di acido ossalico durante il pretrattamento della canna comune (*Arundo donax* L.), su i) rilascio di zuccheri e composti inibitori dall'emicellulosa, ii) idrolisi enzimatica della cellulosa e iii) simultanea saccarificazione e fermentazione (SSF) della cellulosa utilizzando un complesso cellulase/ β -glucosidase ed il ceppo di lievito *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 6054. La fase di pretrattamento è stata ottimizzata utilizzando un disegno fattoriale completo (central composite design) con due parametri come input – Severity Factor (SF) e concentrazione di acido ossalico (OA). La temperatura di reazione è variata da 150 a 190°C, il tempo di reazione da 10 a 40 minuti e la concentrazione di acido dal 2 all'8% (peso/peso). La concentrazione di xilosio (g L^{-1}) nell'idrolizzato emicellulosico è cresciuta fino a valori medi di SF e OA; a più alte severità di trattamento, l'acido acetico ed i composti di degradazione degli zuccheri sono aumentati linearmente all'aumentare del SF o della OA. L'idrolizzato emicellulosico pretrattato a SF 2,87 e 5,0% OA è stato utilizzato come substrato per la fermentazione ad opera di *S. stipitis* CBS6054. A pH 6,0, circa il 100% degli zuccheri presenti sono stati fermentati ad etanolo, ottenendo una concentrazione di $8,20 \text{ g L}^{-1}$ dopo 48 ore di incubazione. Il tasso di conversione dei glucani a glucosio seguendo l'idrolisi enzimatica della cellulosa ha raggiunto il valore massimo di 95% a 4,05 SF e 5,0% OA. Analogamente la SSF alle più alte severità di pretrattamento ha fatto registrare sia la resa che la concentrazione più elevata in etanolo, rispettivamente 75,3% e $18,0 \text{ g L}^{-1}$.

Corrispondente: Danilo Scordia, Dipartimento di Scienze delle Produzioni, Agrarie e Alimentari – DISPA, via Valdisavoia 5, 95123 Catania, Italia.
Tel. +39.095.234496 - Fax: +39.095.234449.
E-mail: dscordia@unict.it

Key words: *Arundo donax*, canna comune, bioetanolo, pretrattamento, idrolisi enzimatica, simultanea saccarificazione e fermentazione.

Ringraziamenti: si ringrazia il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MiPAAF) che ha finanziato il progetto BIOSEA, Ottimizzazione delle filiere Bioenergetiche per una Sostenibilità Economica ed Ambientale.

©Copyright D. Scordia et al., 2013

Licensee PAGEPress, Italy

Italian Journal of Agronomy 2013; 8(s1):e5

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 3.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

Introduzione

La biomassa lignocellulosica include residui agricoli, residui di specie arboree e forestali, rifiuti solidi urbani, residui dell'industria cartaria e del legno, e colture dedicate *no-food*. In quasi tutti i casi, la loro componente principale è la cellulosa, seguita dall'emicellulosa e dalla lignina. Proteine, pectine, lipidi e ceneri chiudono il bilancio (Wyman, 1994).

La cellulosa e l'emicellulosa sono i substrati principali per la produzione di bioetanolo di seconda generazione. Essi sono i carboidrati più abbondanti in natura e la loro bioconversione ad etanolo potrebbe avere diversi vantaggi, tra cui la riduzione delle emissioni di gas a effetto serra e la riduzione della dipendenza dai carburanti fossili (Tilman *et al.*, 2006). Tuttavia, la naturale resistenza dei materiali lignocellulosici, spesso chiamata *recalcitranza*, è tra i maggiori ostacoli allo sviluppo economico di carburanti di seconda generazione. A causa della recalcitranza, è necessaria una fase di pretrattamento per idrolizzare le emicellulose e nel contempo rendere più accessibile la frazione della cellulosa all'attacco enzimatico. La lignina svolge un ruolo chiave nella bioconversione del materiale lignocellulosico in quanto riduce l'idrolisi della cellulosa formando una barriera fisica tra gli enzimi cellulasi e β -glucosidasi ed il substrato (Pan *et al.*, 2005).

Negli studi effettuati sul pretrattamento della biomassa lignocellulosica sono state utilizzate temperature superiori a 150°C in acqua, ammoniaca, acidi e basi con diversi livelli di diluizione, solo in pochi casi si è fatto ricorso ad acidi dicarbossilici quali vettori di catalisi per l'idrolisi della biomassa lignocellulosica (Lee *et al.*, 2009; Lee e Jeffries, 2011; Scordia *et al.*, 2010, 2011, 2012; Kim *et al.*, 2011). Precedenti ricerche hanno dimostrato, infatti, che gli acidi dicarbossilici hanno una maggiore selettività nell'idrolisi dei legami β -(1,4) rispetto all'acido solforico (Lee and Jeffries, 2011), quest'ultimo da tempo considerato come lo stato dell'arte della tecnologia di pretrattamento.

La canna comune ha dimostrato di essere un materiale d'elezione per la bioconversione a bioetanolo di seconda generazione, grazie alla sua alta resa in biomassa secca e al relativamente alto contenuto in polisaccaridi strutturali (Cosentino *et al.*, 2006; Scordia *et al.*, 2011, 2012, 2013a). Inoltre, è una coltura *no-food* con la capacità di crescere in terreni marginali, rispondendo alle attuali questioni etiche sul *food vs fuel*.

Nel presente lavoro si riferisce dei risultati ottenuti pretrattando la canna comune (*Arundo donax* L.) con acido ossalico diluito (Scordia *et al.*, 2012, 2013a). In particolare, il lavoro svolto in collaborazione con l'*USDA Forest Products Laboratory* di Madison, WI, USA, è stato quello di studiare l'effetto della temperatura, tempo di reazione e concentrazione di acido ossalico durante il pretrattamento della canna comune, e la risposta di queste variabili indipendenti su i) rilascio di zuccheri e composti inibitori dall'emicellulosa, ii) idrolisi enzimatica della cellulosa e iii) simultanea saccarificazione e fermentazione della cellulosa utilizzando un complesso cellulase/ β -glucosidase ed il ceppo di lie-

vito *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 6054 che ha la peculiarità di metabolizzare sia zuccheri C5 che C6. Viene anche illustrata la fermentazione dell'idrolizzato emicellulosico a determinate condizioni di pre-trattamento.

Materiali e metodi

Materia prima

La biomassa di *Arundo donax* (foglie e culmi), clone Capo d'Orlando (Cosentino *et al.*, 2006), è stata raccolta nel febbraio 2008 presso l'azienda didattico-sperimentale dell'Università degli Studi di Catania (10 m slm, 37°25' N lat., 15° 30' E long.). L'umidità della biomassa è stata stabilizzata al 4.0±0.72%, ponendo i campioni in stufa a 65±1°C fino a peso costante. Successivamente, la biomassa secca è stata macinata riducendola in porzioni non più lunghe di 2 cm (Wiley Mill model No 2, Philadelphia, PA, USA), omogeneizzata e conservata a temperatura ambiente.

Pretrattamento

Le varie combinazioni tra la biomassa della canna comune e le soluzioni di pretrattamento sono state poste in recipienti di acciaio inossidabile (approssimativamente 1 litro in volume) e montate all'interno di un digestore pilota riscaldato esternamente con vapore e capace di ruotare alla velocità di 2 giri al minuto. La soluzione comprendeva acido ossalico (OA), acqua e biomassa secca nel rapporto liquido:solido di 4:1 (peso/peso). La temperatura di pretrattamento ed il tempo di reazione sono stati combinati in un unico parametro, *Severity Factor* (SF), secondo la formula di Overend e Chornet (1987):

$$SF = \text{Log} (R_0) = \text{Log} \left[t \cdot \exp \left(\frac{T_p - T_{ref}}{14.75} \right) \right] \quad (1)$$

dove t è il tempo di reazione (min), T_p è la temperatura di pretrattamento (°C), T_{ref} è la temperatura di riferimento posta a 100°C e 14,75 si riferisce all'energia di attivazione della reazione (113 KJ mol⁻¹).

I valori di temperatura utilizzati andavano da 150 a 190°C, il tempo di reazione da 10 a 40 min e la concentrazione di OA diluito da 2 a 8% (peso/peso).

Successivamente al pretrattamento, la frazione liquida, composta principalmente da zuccheri C5, è stata separata da quella solida (C6 + lignina) mediante filtrazione a vuoto e le diverse frazioni sono state conservate a 4°C.

Idrolisi enzimatica

La frazione solida dopo pretrattamento è stata idrolizzata in beute da 125 mL contenenti il 10% (p/v) di biomassa secca e 50 mL di sodio citrato a pH 5,0 come soluzione tampone. È stata utilizzata una preparazione commerciale di enzimi cellulasi/β-glucosidasi (Accelerase 1000, Genencor Inc., A Danisco division) alla concentrazione di 0,50 mL/g cellulosa ed un'attività di 1000 CMC/g cellulosa (carboxymethylcellulose/g cellulosa) e 160 PNG/g cellulosa (para-nitrofenil-β-D-glucopiranoside/g cellulosa).

Una unità CMC libera 1 μmol min⁻¹ di zuccheri riduttori (essessi come glucosio equivalente) in condizioni specifiche di temperatura e pH (50°C e 4,8 rispettivamente). Una unità pNPG libera 1 μmol di nitrofenolo dal para-nitrofenile-β-D-glucopiranoside in 10 min a 50°C e pH 4,8 (Genencor Inc., informazioni sul prodotto).

Tabella 1. Condizioni sperimentali e relativo *Severity Factor* [Log (R₀)] del pretrattamento di canna comune con acido ossalico diluito (*Arundo donax* L.), secondo il *central composite design* (Tradotto da Scordia *et al.*, 2012, 2013a).

Esperimento Run	Codici			Temperatura (°C)	Fattori		<i>Severity Factor</i> Log (R ₀)
	X ₁	X ₂	X ₃		OA (% w/w)	Tempo (min)	
1	-1	-1	-1	158,1	3,21	16,07	2,93
2	1	-1	-1	181,9	3,21	16,07	3,59
3	-1	1	-1	158,1	6,79	16,07	2,93
4	1	1	-1	181,9	6,79	16,07	3,59
5	-1	-1	1	158,1	3,21	34,33	3,24
6	1	-1	1	181,9	3,21	34,33	3,93
7	-1	1	1	158,1	6,79	34,33	3,24
8	1	1	1	181,9	6,79	34,33	3,93
9	-1,68	0	0	150,0	5,00	25,00	2,87
10	1,68	0	0	190,0	5,00	25,00	4,05
11	0	-1,68	0	170,0	2,00	25,00	3,46
12	0	1,68	0	170,0	8,00	25,00	3,46
13	0	0	-1,68	170,0	5,00	10,00	3,06
14	0	0	1,68	170,0	5,00	40,00	3,66
15	0	0	0	170,0	5,00	25,00	3,46
16	0	0	0	170,0	5,00	25,00	3,46
17	0	0	0	170,0	5,00	25,00	3,46

X₁, X₂ e X₃ rappresentano i codici dei valori di temperatura (°C), concentrazione di acido ossalico (%p/p) e tempo di reazione (min), rispettivamente. OA, acido ossalico.

Microorganismi e condizioni di crescita

Per fermentare la frazione liquida comprendente zuccheri provenienti dall'idrolisi dell'emicellulosa e per la simultanea saccarificazione e fermentazione (SSF) della frazione solida, comprendente cellulosa e lignina, è stato utilizzato il ceppo di lievito *Schefferomyces (Pichia) stipitis* CBS6054. Le condizioni di crescita del primo esperimento sono riportate in Scordia *et al.*, 2012, mentre quelle del secondo esperimento in Scordia *et al.*, 2011 e 2013a.

Preparazione della frazione emicellulosica ed inoculo

Il pH iniziale della frazione emicellulosica dopo pretrattamento è stato aumentato con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 5,0, successivamente aggiustato a 5,5, 6,0 e 6,5 con NaOH, centrifugato, sterilizzato, e trasferito in beute da 125 mL contenete l'idrolizzato ed i nutrienti per i lieviti (Scordia *et al.*, 2012).

Le beute sono state chiuse con tappi in cotone per consentire una microaerazione ed incubati a 30°C, 150 giri al minuto per 96 ore. I campioni sono stati prelevati a 0, 24, 48, 72 e 96 ore per quantificare i prodotti consumati e generati.

Determinazioni analitiche

La composizione in carboidrati strutturali della materia prima e dei solidi dopo pretrattamento sono stati misurati mediante cromatografia a scambio anionico (ICS-3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) con rilevazione amperometrica pulsata (HPAEC-PAD), secondo il metodo di Davis (1998).

Gli zuccheri semplici, l'acido acetico e l'etanolo sono stati misurati con cromatografia liquida ad alta prestazione (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) (Gilson 307 system, Villiers-le-Bel, France) equipaggiato con indice di rifrazione RID (Hitachi High Technologies Corporation model L-2490, Japan) utilizzando una colonna HPX-87H (Bio-rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) operante a 55°C, H_2SO_4 (5 mM) come fase mobile e $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ come flusso.

I composti inibitori generati dalla degradazione degli zuccheri semplici nella frazione emicellulosica, ossia l'idrossimetilfurfurale (HMF)

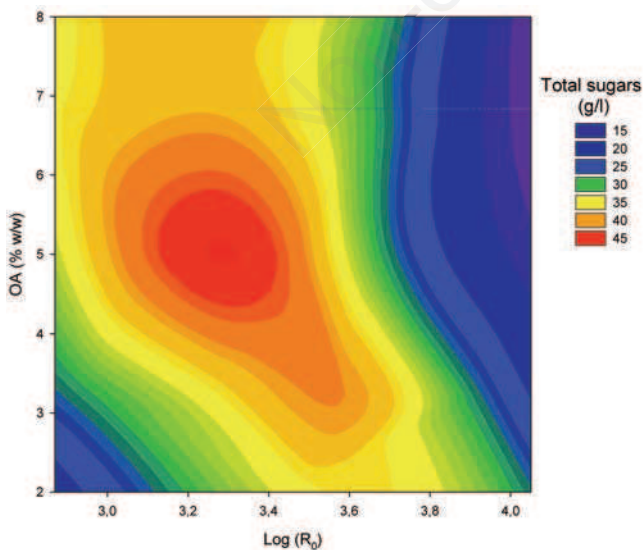


Figura 1. Risposta degli zuccheri totali in funzione del Severity Factor [Log (R_0)] rispetto alla concentrazione di acido ossalico (OA) durante il pretrattamento di canna comune (*Arundo donax* L.) (Modificato da Scordia *et al.*, 2012).

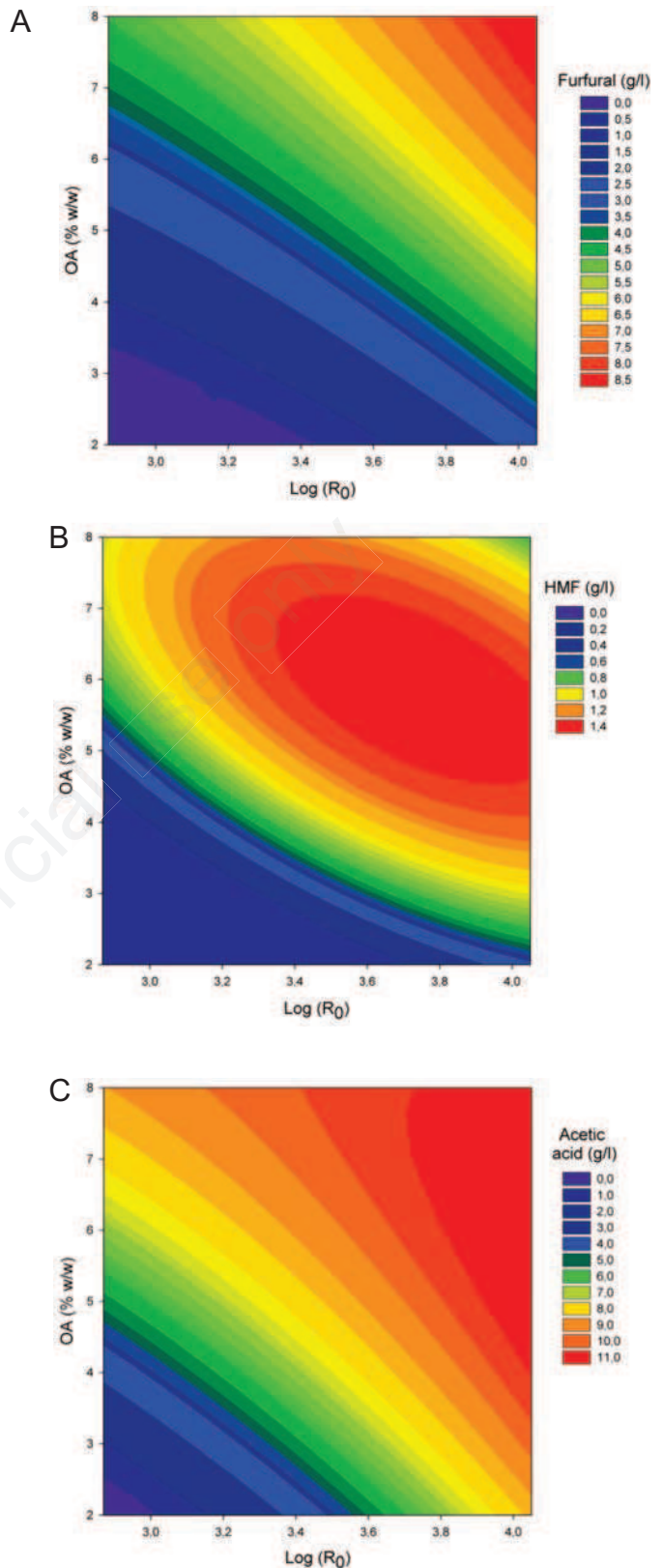


Figura 2. Risposta del rilascio di (A) furfurale, (B) idrossimetilfurfurale (HMF) e (C) acido acetico in funzione del Severity Factor [Log (R_0)] rispetto alla concentrazione di acido ossalico (OA) durante il pretrattamento di canna comune (*Arundo donax* L.) (Modificato da Scordia *et al.*, 2012).

ed il furfurale sono stati misurati con HPLC (HP, 1090 Series II, Hewlett-Packard, Now Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con indice di rifrazione UV equipaggiato con una colonna Phenomenex C18(2) e acetonitrile (ACN), acqua ed acido acetico (1%) come fase mobile ad un flusso di 0,8 mL min⁻¹ (Scordia *et al.*, 2010, 2011, 2012).

Disegno sperimentale

La fase di pretrattamento è stata ottimizzata utilizzando un disegno fattoriale completo (central composite design) con due parametri come input, SF e OA, con lo scopo di valutare l'effetto di queste variabili indipendenti (SF e OA) sulla composizione della biomassa dopo pretrattamento (contenuto in xilani, glucani e lignina), il rilascio di zuccheri e composti inibitori nell'idrolizzato emicellulosico, l'idrolisi enzimatica e la SSF della cellulosa. Le condizioni sperimentali effettuate in maniera completamente randomizzata sono riportate in Tabella 1.

L'analisi della varianza è stata condotta utilizzando il software Minitab® 15.0 con un livello di confidenza del 99% (P≤0.001).

Risultati e discussione

Biomassa di canna comune pre e post trattamento, recupero degli zuccheri e generazione di composti inibitori nell'idrolizzato emicellulosico

La biomassa di canna comune è composta per il 57,6% da polisaccaridi strutturali, 20,4% da lignina, 5,9% da ceneri, di cui 1,7% di ceneri della lignina acido-insolubile (Tabella 2). La cellulosa, composta esclusivamente da glucani, ammonta al 34,6%, mentre le emicellulose sono composte da xilani (20,4%), arabinani (1,81%), mannani (0,12%), galattani (0,66%) e ramnani (0,06%).

Il rapporto trovato tra cellulosa, emicellulosa e lignina della canna comune è simile a quello di altre monocotiledoni come il *Saccharum spontaneum*, il *Miscanthus ssp.*, la paglia di frumento, gli stocchi di

mais, ed altri residui erbacei (Scordia *et al.*, 2010, 2013b; Kim *et al.*, 2012). Successivamente al pretrattamento, la biomassa è andata incontro ad idrolisi dell'emicellulosa, questa, secondo la severità adottata è stata più o meno idrolizzata, come mostrato in Tabella 3. Nel contempo, il contenuto in glucani e lignina è aumentato, da una parte perché l'emicellulosa è stata solubilizzata, dall'altra per la maggiore recalcitranza di questi due composti rispetto all'emicellulosa stessa. Mentre la concentrazione in emicellulosa è andata linearmente diminuendo al crescere della severità del trattamento (SF e OA), la concentrazione in glucani e lignina è cresciuta al crescere della severità e della concentrazione di acido.

È stato riportato che la rimozione degli xilani durante il pretrattamento è un buon indicatore dell'efficacia del pretrattamento. Maggiore rimozione degli xilani conduce ad una minore resistenza nella successiva idrolisi della cellulosa all'attacco enzimatico (Kabel *et al.*, 2007).

Tabella 2. Composizione della biomassa secca di canna comune (*Arundo donax* L.) (Tradotto da Scordia *et al.*, 2012).

Componente	Biomassa secca (%)
Glucani	34,60±0,14
Xilani	20,41±0,02
Arabinani	1,81±0,03
Galattani	0,66±0,06
Mannani	0,12±0,01
Ramnani	0,06±0,00
K. Lignina	20,44±0,07
Ceneri	5,90±0,10
Ceneri (acido-insolubili)	1,67±0,08

Valore medio di tre determinazioni±deviazione standard.

Tabella 3. Composizione della biomassa di canna comune (*Arundo donax* L.) dopo pretrattamento in funzione del Severity Factor [Log (R₀)] e concentrazione di acido ossalico (Tradotto da Scordia *et al.*, 2013a).

Log (R ₀)	[OA] (% p/p)	Glucani (% p/p)	Xilani (% p/p)	Lignina (% p/p)
2,87	5,00	43,35	14,63	26,60
2,93	3,20	42,45	13,39	25,10
2,93	6,70	49,34	8,87	29,50
3,06	5,00	48,33	9,94	29,10
3,24	3,20	45,79	14,34	27,00
3,24	6,70	50,16	7,26	30,50
3,46	2,00	46,20	12,64	27,70
3,46	5,00	51,68	6,66	31,10
3,46	5,00	51,79	5,48	31,50
3,46	5,00	51,83	5,89	31,38
3,46	8,00	54,48	3,87	32,40
3,59	3,20	50,90	6,23	31,50
3,59	6,70	54,09	3,31	33,00
3,66	5,00	53,99	5,74	33,30
3,93	3,20	52,17	3,76	34,30
3,93	6,70	53,72	2,11	35,50
4,05	5,00	53,70	1,63	36,47

OA, acido ossalico.

L'ANOVA condotta sui carboidrati strutturali residui dopo pretrattamento (xilani e glucani) e sulla lignina ha messo in evidenza che le due variabili indipendenti hanno significativamente influenzato le risposte di tali composti. Un coefficiente di determinazione di 0,95-0,99 in ragionevole accordo con l' R^2 aggiustato (0,92-0,98) mostra che gran parte della varianza nella risposta è stata spiegata dalle variabili indipendenti (Tabella 4).

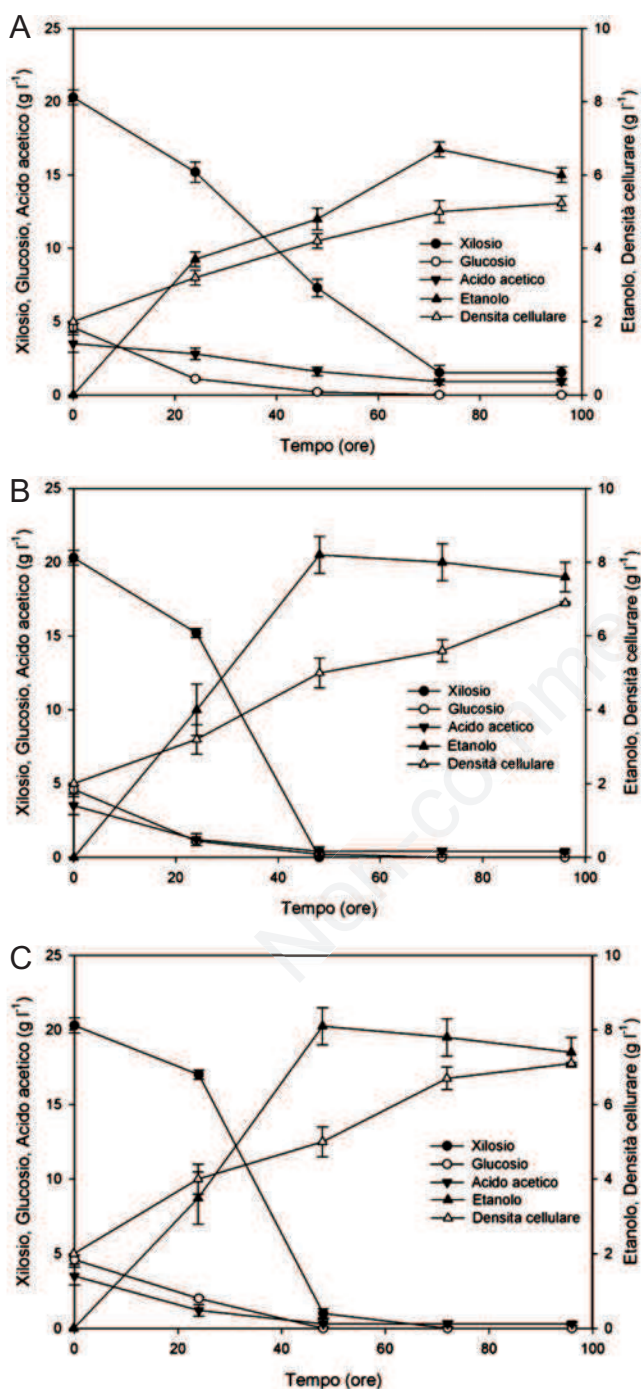


Figura 3. Fermentazione della frazione emicellulosica di canna comune a (A) pH 5,5; (B) pH 6,0 e (C) pH 6,5 (Modificato e tradotto da Scordia *et al.*, 2012).

La resa in monosaccaridi rilasciati nella frazione idrolizzata (g L^{-1}) dipende dal SF o dalla OA durante il pretrattamento. Lo xiliosio è stato lo zucchero maggiormente rilevato nell'idrolizzato, corrispondente all'80% degli zuccheri totali, nella media di tutte le condizioni studiate. Il glucosio è stato trovato in quantità significative ad alti valori di SF o OA, rappresentando, in media, il 18% degli zuccheri totali rilasciati. Quest'ultimo aspetto è in accordo con la recalcitranza dei glucani nelle condizioni di pretrattamento utilizzate. L'arabinosio è stato rilevato in quantità trascurabili (2%), mentre il galattosio, mannosio e ramnosio erano pressoché assenti. Tuttavia, gli xilani rimossi dalla frazione solida e collezionati nella frazione liquida come xiliosio (sia in forma di monomeri che oligomeri) non corrisponde completamente alla quantità rilasciata dalla materia prima. Queste osservazioni sono state comunemente riscontrate in altri studi sul pretrattamento di altri substrati dal momento che alte temperature e lunghi tempi di reazione, durante il pretrattamento, inducono alla degradazione degli zuccheri C6 a HMF e di quelli C5 a furfurale (Palmqvist *et al.*, 2000). La concentrazione di xiliosio (g L^{-1}) nell'idrolizzato emicellulosico cresce fino a valori medi di SF e OA (Figura 1); ad alte severità di trattamento, l'acido acetico ed i composti inibitori crescono linearmente all'aumentare di SF o della OA (Figura 2A, 2B, 2C).

SF è il fattore dominante nel rilascio di zuccheri, seguito dalla OA. Quando SF viene analizzato separatamente, la temperatura ha un effetto significativamente maggiore rispetto al tempo, che si riflette nel SF in cui la temperatura viene elevata ad un valore esponenziale (Scordia *et al.*, 2012).

L'ANOVA condotta sul rilascio di monomeri e composti inibitori nella frazione emicellulosica è mostrata in Tabella 5. Le due variabili indipendenti hanno significativamente influenzato le risposte di tali composti con un coefficiente di determinazione di 0,78-0,97 in ragionevole accordo con l' R^2 aggiustato (0,68-0,95).

Fermentazione della frazione emicellulosica di canna comune

L'idrolizzato emicellulosico prattato a SF 2,87 e 5,0% OA è stato utilizzato come substrato per la fermentazione ad opera di *S. stipitis* CBS6054. Gli zuccheri collezionati erano composti da xiliosio (78%),

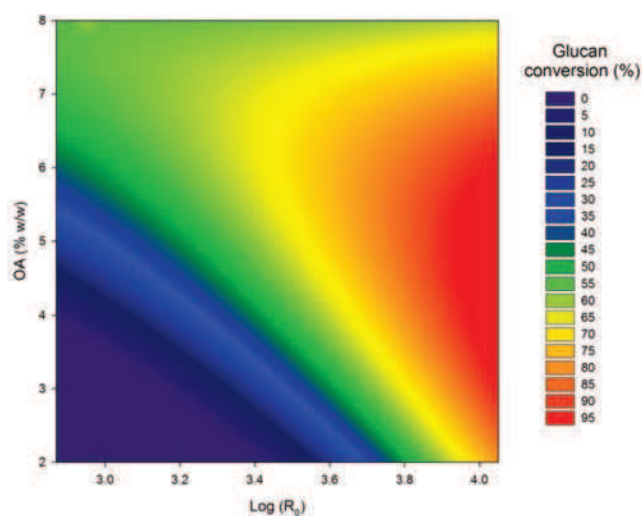


Figura 4. Risposta della conversioni di glucani in funzione del Severity Factor [$\text{Log}(R_0)$] rispetto alla concentrazione di acido ossalico (OA) durante il pretrattamento di canna comune (*Arundo donax* L.) (Modificato da Scordia *et al.*, 2013a).

glucosio (15%) e arabinosio (7%), sul totale degli zuccheri rilasciati. La concentrazione di zuccheri corrisponde a 26,0 g L⁻¹, 5,0 g L⁻¹ e 2,4 g L⁻¹, rispettivamente per xilosio, glucosio e arabinosio (Tabella 6). Gli zuccheri nella forma di monomeri, collezionati nell'idrolizzato sono stati pari al 91% (xilosio), 83% (glucosio) e 94% (arabinosio), rispettivamente. L'acido acetico rappresenta il 44,3%, il furfurale e l'HMF rispettivamente il 5,6 e 5,7% dei composti inibitori rilasciati nell'idrolizzato. La concentrazione corrisponde a 4,80 g L⁻¹ per l'acido acetico, 0,61 e 0,62 g L⁻¹ per il furfurale e l'HMF, rispettivamente (Tabella 6). Prima dell'inoculo dei lieviti, il pH della frazione emicellulosica è stato aumentato a 5,0 con Ca(OH)₂ e successivamente regolata ad un pH finale di 5,5, 6,0 e 6,5 con NaOH. Dopo l'aggiunta di Ca(OH)₂ è stata osservata una riduzione della concentrazione degli zuccheri e dell'acido acetico. Lo xilosio ed il glucosio sono diminuiti del 22% e dell'8% rispettivamente, mentre l'acido acetico è diminuito del 27%. Non è stato riscontrato nessun effetto sul furfurale o sull'HMF.

A pH 5,0 l'acido acetico si trova ad essere nella forma dissociata; questo permette la diffusione all'interno del citoplasma cellulare dei microrganismi utilizzati dove decresce il pH intracellulare sotto il range fisiologico, risultando in una lunga fase stazionaria, inibizione della crescita e del consumo di xilosio e successivamente alla morte cellulare. L'incremento del pH da 5,0 a 5,5, 6,0 e 6,5 rispettivamente, ha significativamente migliorato le performance di fermentazione. A pH 5,5 la concentrazione di etanolo ha raggiunto 6,70 g L⁻¹ dopo 72 ore di fermentazione con una resa di 0,27 (g/g_z). Circa il 94% degli zuccheri totali (glucosio e xilosio) ed il 74% di acido acetico sono stati consumati (Figura 3A). L'incremento del pH a 6,0 e 6,5 ha migliorato significativamente la resa in etanolo. La concentrazione si è attestata a 8,20 e 8,10 g L⁻¹ dopo 48 ore di fermentazione, rispettivamente (Figura 3B e 3C) con una produttività di 0,33 (g/g_z), corrispondente al 65% della resa massima teorica. Quasi il 100% degli zuccheri e dell'acido acetico sono stati consumati. La produzione di xilitolo non ha mostrato differenze significative tra i diversi pH utilizzati (pH 5,5, 6,0 e 6,5), attestandosi a 0,40 g L⁻¹, come riportato da Scordia *et al.*, 2012.

Idrolisi enzimatica

La conversione della cellulosa a glucosio è aumentata al crescere di SF e della OA. La Figura 4 mostra l'andamento dell'idrolisi di glucani a glucosio di SF rispetto all'OA dopo 96 ore di incubazione a 200 giri al minuto e 50°C. La percentuale di cellulosa convertita in glucosio è passata dal 5%, utilizzando 2,93 SF e 3,21% OA, al 95% utilizzando 4,05 SF e 5,0% OA. Il minor contenuto in xilani nella frazione solida pretrattata ai più alti valori di SF (~1-2%) rispetto ai più bassi (~14%), ha aumentato il tasso di saccharificazione enzimatica, poiché è stato dimo-

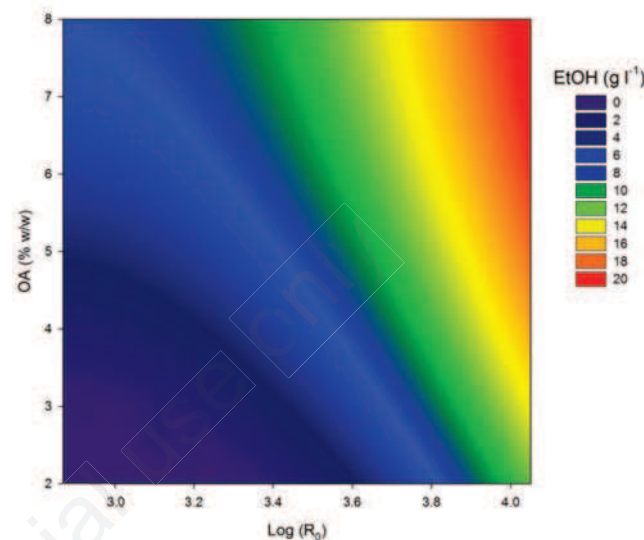


Figura 5. Risposta della produzione di etanolo in funzione del Severity Factor [Log (R₀)] rispetto alla concentrazione di acido ossalico (OA) durante il pretrattamento di canna comune (*Arundo donax* L.) (Modificato da Scordia *et al.*, 2013a).

Tabella 4. ANOVA condotta sui carboidrati strutturali residui dopo pretrattamento (xilani e glucani) e sulla lignina in funzione del Severity Factor e concentrazione di acido ossalico utilizzati durante il pretrattamento della canna comune (*Arundo donax* L.). Modificata da Scordia *et al.*, 2013a.

	DF	SS	Adj MS	F-value	P-value
Xilani (% p/p)					
Regressione	5	347,932	69,586	68,92	0,000
Residuo	11	11,106	1,010	-	-
Lack-of-Fit	9	10,388	1,154	3,22	0,260
Errore	2	0,718	0,359	-	-
Totale	16	359,038	-	-	-
R ²	0,97	R ² (adj)	0,95	-	-
Glucani (% p/p)					
Regressione	5	209,346	41,8692	40,38	0,000
Residuo	11	11,406	1,0369	-	-
Lack-of-Fit	9	11,394	1,2660	209,84	0,005
Errore	2	0,012	0,0060	-	-
Totale	16	220,752	-	-	-
R ²	0,95	R ² (adj)	0,92	-	-
Lignina (% p/p)					
Regressione	5	158,107	31,6214	177,15	0,000
Residuo	11	1,963	0,1785	-	-
Lack-of-Fit	9	1,879	0,2088	4,96	0,179
Errore	2	0,084	0,0421	-	-
Totale	16	160,070	-	-	-
R ²	0,99	R ² (adj)	0,98	-	-

DF, gradi di libertà; SS, somma degli scarti dalla media al quadrato; Adj MS, varianza; R²(adj), R² aggiustato.

Tabella 5. ANOVA condotta sul rilascio di monomeri e composti inibitori nell'idrolizzato emicellulosico in funzione del *Severity Factor* e concentrazione di acido ossalico utilizzati durante il pretrattamento della canna comune (*Arundo donax* L.). Modificata da Scordia *et al.*, 2012.

	DF	SS	Adj MS	F-value	P-value
Zuccheri totali (g L⁻¹)					
Regressione	5	733,458	146,692	25,31	0,000
Residuo	11	58,468	5,315	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	58,301	6,478	77,73	0,013
Errore	2	0,167	0,083	-	-
Totale	16	791,925	-	-	-
R ²	0,93	R ² (adj)	0,89	-	-
Acido acetico (g L⁻¹)					
Regressione	5	74,2005	14,840	10,50	0,001
Residuo	11	15,5450	1,4132	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	15,5154	1,7239	116,48	0,091
Errore	2	0,0296	0,0148	-	-
Totale	16	89,7455	-	-	-
R ²	0,83	R ² (adj)	0,75	-	-
Furfurolo (g L⁻¹)					
Regressione	5	105,789	21,1578	67,03	0,000
Residuo	11	3,472	0,3156	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	3,471	0,3858	528,49	0,127
Errore	2	0,0014	0,00073	-	-
Totale	16	109,261	-	-	-
R ²	0,97	R ² (adj)	0,95	-	-
HMF (g L⁻¹)					
Regressione	5	1,60813	0,321627	28,28	0,000
Residuo	11	0,12508	0,011371	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	0,11848	0,013165	3,99	0,216
Errore	2	0,00660	0,003299	-	-
Totale	16	1,73322	-	-	-
R ²	0,93	R ² (adj)	0,90	-	-
Fenoli totali (g L⁻¹)					
Regressione	5	9,9061	1,98122	7,76	0,002
Residuo	11	2,8074	0,25521	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	2,7127	0,30141	6,37	0,143
Errore	2	0,0946	0,04732	-	-
Totale	16	12,7134	-	-	-
R ²	0,78	R ² (adj)	0,68	-	-

DF, gradi di libertà; SS, somma degli scarti dalla media al quadrato; Adj MS, varianza; R²(adj), R² aggiustato; HMF, idrossimetilfurfurale.

strato che la percentuale di xilani residui sembra essere un buon indicatore della digeribilità della cellulosa (Jeoh *et al.*, 2007; Scordia *et al.*, 2013b). Il maggior effetto sulla conversione è stato dato da SF rispetto alla OA, perché quando la OA è stata mantenuta costante al 5,0% ed il tempo di reazione costante a 25 minuti, aumentando la temperatura da 150 a 190°C (corrispondente a un SF di 2,87 e 4,05, rispettivamente), la conversione di glucani è aumentata di circa il 65%. Viceversa, quando è stata fissata la temperatura ed il tempo (170°C e 25 min, rispettivamente, corrispondenti a 3,46 SF), aumentando la OA da 2,0 a 8,0%, è stato osservato un aumento del 45%.

Il tempo di reazione ha avuto l'effetto più debole sulla conversione dei glucani. La conversione è aumentata dal 35 al 75% quando il tempo di reazione è aumentato da 10 a 40 minuti, mentre la temperatura e la OA sono stati fissati (170°C, 5% OA, corrispondenti a 3,06 e 3,66 SF, rispettivamente). L'ANOVA condotta sulla conversione di glucani a glucosio dopo idrolisi enzimatica è mostrata in Tabella 7. Le due variabili indipendenti hanno significativamente influenzato la risposta di tale composto con un coefficiente di determinazione di 0,90 in ragionevole accordo con l'R² aggiustato (0,85).

Tabella 6. Concentrazione di monomeri e composti inibitori nella frazione emicellulosica di canna comune (Tradotto da Scordia *et al.*, 2012).

Idrolizzato	Concentrazione (g/L)
Xilosio	26,0±0,56
Glucosio	5,00±0,41
Arabinosio	2,40±0,34
Acido acetico	4,80±0,43
Furfurale	0,61±0,09
HMF	0,62±0,07

Valore medio di tre determinazioni±deviazione standard. HMF, idrossimetilfurfurale.

Tabella 7. ANOVA condotta sulla conversione di glucani a glucosio dopo idrolisi enzimatica in funzione del *Severity Factor* e concentrazione di acido ossalico utilizzati durante il pretrattamento della canna comune (*Arundo donax* L.). Modificata da Scordia *et al.*, 2013a.

Conversione di glucani (% p/p)	DF	SS	Adj MS	F-value	P-value
Regressione	5	4774,63	954,93	19,38	0,000
Residuo	11	542,06	49,28	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	541,75	60,19	395,93	0,003
Errore	2	0,30	0,15	-	-
Totale	16	5316,69	-	-	-
R ²	0,90	R ² (adj)	0,85	-	-

DF, gradi di libertà; SS, somma degli scarti dalla media al quadrato; Adj MS, varianza; R²(adj), R² aggiustato.

Tabella 8. ANOVA condotta sulla produzione di bioetanolo dopo simultanea saccarificazione e fermentazione in funzione del *Severity Factor* e concentrazione di acido ossalico utilizzati durante il pretrattamento della canna comune (*Arundo donax* L.). Modificata da Scordia *et al.*, 2013a.

Produzione di etanolo (g L ⁻¹)	DF	SS	Adj MS	F-value	P-value
Regressione	5	286,030	57,206	33,52	0,000
Residuo	11	18,774	1,707	-	-
<i>Lack-of-Fit</i>	9	18,634	2,070	29,58	0,033
Errore	2	0,140	0,070	-	-
Totale	16	304,805	-	-	-
R ²	0,93	R ² (adj)	0,91	-	-

DF, gradi di libertà; SS, somma degli scarti dalla media al quadrato; Adj MS, varianza; R²(adj), R² aggiustato.

Simultanea saccarificazione e fermentazione

La SSF è stata condotta con un carico in solido del 10% (p/v) inoculando una concentrazione di 0,5 mL g⁻¹ cellulosa di enzimi cellulasi/β-glucosidasi e 2 g L⁻¹ di *S. stipitis* CBS 6054. Nel processo di SSF il glucosio rilasciato dagli enzimi cellulasi e β-glucosidasi viene contemporaneamente fermentato ad etanolo dai lieviti. Dopo 72 ore di incubazione a 150 giri al minuto e 30°C la produzione di etanolo è aumentata all'aumentare della severità del trattamento. Come detto in precedenza, ciò ha ridotto la quantità di xilani nel substrato permettendo un maggior accesso degli enzimi nella saccarificazione della cellulosa. La Figura 5 mostra la produzione di etanolo dopo 72 ore di SSF al variare del SF rispetto alla OA. La produzione di etanolo è passata da 0,80 g L⁻¹ a 2,93 SF e 3,21% OA al valore massimo di 18,0 g L⁻¹ a 4,05 SF e 5,0% OA.

L'ANOVA condotta sulla produzione di etanolo dopo la SSF è mostrata in Tabella 8. Le due variabili indipendenti hanno significativamente influenzato la risposta di tale composto con un coefficiente di determinazione di 0,93 in ragionevole accordo con l'R² aggiustato (0,91).

La resa teorica di etanolo, calcolata sulla base della massima produzione di etanolo ottenibile considerando il contenuto di glucani nel solido pre-SSF, è mostrata in Tabella 9. La resa teorica in etanolo è stata ottenuta attraverso la seguente formula:

$$\frac{E}{\left(\frac{Gn}{162}\right) \times 0.511} \times 100 \quad (2)$$

dove E è la concentrazione di etanolo espressa come g L⁻¹, Gn è il contenuto di glucani del substrato dopo pretrattamento espresso come g glucani/g substrato e 0,511 è lo stechiometrico della resa in etanolo per i lieviti (Scordia *et al.*, 2013a).

Tabella 9. Resa teorica in etanolo al variare del *Severity Factor* [Log (R₀)] e della [OA] dopo pretrattamento della canna comune (*Arundo donax* L.) (Tradotto da Scordia *et al.*, 2013a).

Run	Log (R ₀)	OA (% w/w)	Resa teorica in etanolo (%)
1	2,93	3,21	14,34
2	3,59	3,21	38,87
3	2,93	6,79	32,61
4	3,59	6,79	54,67
5	3,24	3,21	23,74
6	3,93	3,21	49,18
7	3,24	6,79	32,08
8	3,93	6,79	63,95
9	2,87	5,00	18,56
10	4,05	5,00	75,28
11	3,46	2,00	18,83
12	3,46	8,00	43,90
13	3,06	5,00	30,59
14	3,66	5,00	36,25
15	3,46	5,00	33,66
16	3,46	5,00	34,01
17	3,46	5,00	33,14

OA, acido ossalico.

Analogamente a quanto segnalato per la produzione di etanolo, la resa massima teorica a SF 2,93 e 3,21% OA ha fatto registrare il valore inferiore (14,3%), mentre a 4,05 SF e 5,0% OA il valore massimo (75,3%).

Conclusioni

I risultati mostrano che il pretrattamento della canna comune con acido ossalico diluito fornisce un substrato idoneo alla SSF della cellulosa e alla fermentazione della frazione emicellulosica. Tuttavia, la condizione ottimale di pretrattamento per la fermentazione della frazione emicellulosica non corrisponde alla condizione ottimale per la SSF.

Rilevanti criticità per rendere la produzione di bioetanolo di seconda generazione utilizzabile su scala industriale includono ulteriori studi per il massimo recupero dei pentosi, un basso livello di composti inibitori e lo sviluppo di robusti ceppi di microrganismi aventi la capacità di produrre etanolo da tutti gli zuccheri disponibili nel materiale lignocellulosico in un unico step. La canna comune, essendo una coltura no-food con elevate rese in biomassa secca e polisaccaridi strutturali, può essere indicata come specie promettente per la produzione di bioetanolo di seconda generazione.

Bibliografia

- Cosentino SL, Copani V, D'Agosta GM, Sanzone E, Mantineo M, 2006. First results on evaluation of *Arundo donax* L. clones collected in Southern Italy. *Indust. Crops Prod.* 23:212-22.
- Davis MW, 1998. A rapid modified method for compositional carbohydrate analysis of lignocellulosics by high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD). *J. Wood Chem. Technol.* 18:235-52.
- Jeoh T, Ishizawa CI, Davis MF, Himmel ME, Adney WS, Johnson DK, 2007. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol. Bioener.* 98:112-22.
- Kabel, MA, Bos G, Zeevalking J, Voragen AGJ, Schols HA, 2007. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 98:2034-42.
- Kim HY, Lee JW, Jeffries TW, Choi IG, 2011. Response surface optimization of oxalic acid pretreatment of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) for production of glucose and xylose monosaccharides. *Bioresour. Technol.* 102:1440-6.
- Kim SJ, Kim MY, Jeong SJ, Jang MS, Chung IM, 2012. Analysis of the biomass content of various *Miscanthus* genotypes for biofuel production in Korea. *Indust. Crops Prod.* 38:46-9.
- Lee JW, Jeffries TW, 2011. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresour. Technol.* 102:5884-90.
- Lee JW, Rodrigues RCLB, Jeffries TW, 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100:6307-11.
- Overend RP, Chornet E, 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R Soc. Lond. A* 321:523-36.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74:25-33.
- Pan X, Xie D, Gilkes N, Gregg DJ, Saddler JN, 2005. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121/124:1069-79.
- Scordia D, Cosentino SL, Jeffries TW, 2010. Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. *Bioresour. Technol.* 101:5358-65.
- Scordia D, Cosentino SL, Lee JW, Jeffries TW, 2011. Dilute oxalic acid pretreatment for biorefining giant reed (*Arundo donax* L.). *Biomass Bioener.* 35:3018-24.
- Scordia D, Cosentino SL, Lee JW, Jeffries TW, 2012. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass Bioener.* 39:296-305.
- Scordia D, Cosentino SL, Jeffries TW, 2013a. Enzymatic hydrolysis, simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated giant reed (*Arundo donax* L.). *Indust. Crops Prod.* 49:392-99.
- Scordia D, Cosentino SL, Jeffries TW, 2013b. Effectiveness of dilute oxalic acid pretreatment of *Miscanthus giganteus* biomass for ethanol production. *Biomass Bioener.* [In press].
- Tilman D, Hill J, Lehman C, 2006. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. *Science* 314:1598-600.
- Wyman CE, 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50:3-16.