Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
125° (2007), Vol. XXXI, P. II, t. I, pp. 145-155

GIOVANNI GIOVANNOZZI SERMANNI*

Biotecnologie bianche e sostenibilità biologica

Riassunto – Nel presente contributo sono riassunti alcuni aspetti delle nostre ricerche basate su un approccio biochimico riguardanti la utilizzazione delle biomasse.

In particolare sono descritti un processo e una apparecchiatura del tutto innovativi per applicazioni biotecnologiche. È stata messa in evidenza la possibilità di applicazioni diverse quali la produzione di paste cellulosiche, la degradazione di pesticidi, il riciclo di carta da macero, la produzione di antibiotici etc.

Abstract – This paper suggests the role of the utilization of biomasses, mainly agricultural residues, to produce goods by an innovative technology described for the first time by the author more then 40 years ago. This technology is more efficient if a special designed bioreactor for solid state fermentation (SSF) is adopted. With this bioreactor different applications can be developed such as production of paper pulps, pesticides biodegradation, antibiotics production, waste paper recycle, pollution controls, et coetera.

Parole chiave: Bioreactors, solid state fermentation, lignocellulose.

Introduzione

Nella problematica delle fonti rinnovabili è inclusa quella che fa genericamente riferimento alle biomasse. Rispetto alle altre fonti rinnovabili, tuttavia, le biomasse si distinguono per un aspetto fondamentale non sempre tenuto in debito conto e cioè che la relativa tecnologia è l'unica che permette la formazione di legami di energia chimica, con la biosintesi di composti organici e quindi dei presupposti per lo sviluppo della vita. Infatti va ricordato che il Pianeta si arricchisce di energia biologica sotto forma di legami chimici attraverso il processo fotosintetico, unica possibilità di formazione delle molecole organiche.

* Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. Camillo De Lellis, 01100 Viterbo. CNR-IBAF, Pianabella, Montelibretti. E-mail: ggsorama@gmail.com

Oltre che mediante l'uso di carbonio fossile, il rifornimento di energia chimica al Pianeta avviene pertanto attraverso la radiazione solare che può essere utilizzata mediante processi chimico-fisici.

I composti organici cosi formatisi rendono possibili le infinite possibilità di vita mediante l'ossidazione della sostanza organica con formazione finale di nuovo di anidride carbonica.

Di conseguenza uno dei più importanti aspetti delle società moderne è costituito dalla necessità di mantenere in equilibrio il rapporto fra richiesta e disponibilità di energia biologica.

Nel presente contributo sono riassunti alcuni tra i principali risultati ottenuti in 40 anni di ricerca, volti a completare lo sviluppo di processi innovativi riconducibili alle biotecnologie bianche ed a sviluppare applicazioni finalizzate a soddisfare le necessità della sostenibilità biologica.

Formazione delle biomasse utilizzabili

L'efficienza della cattura di CO_2, oltre che dai ben noti meccanismi fotosintetici C3, C4 e CAM, è aumentata anche dall'assorbimento della CO_2 per via radicale, mediante la PEP carbossilasi presente nelle radici, come è stato messo in evidenza da noi numerosi anni fa.

Se la utilizzazione e la formazione della CO_2 in questi processi sono equilibrate nell'atmosfera, il sistema, dal punto di vista biologico, è sostenibile.

Se si limitano tali considerazioni al settore agricolo, che permette più facilmente l'impostazione di sistemi produttivi innovativi, una migliore sostenibilità è legata alla migliore utilizzazione della sostanza organica. Pur tuttavia, malgrado la migliore utilizzazione della biomassa vegetale per ottenere i composti richiesti, una parte inutilizzata costituita essenzialmente dalle pareti cellulari degli organismi vegetali, può rappresentare una quantità paragonabile a quella del prodotto utile (harvest index = 0.5).

Di conseguenza, diventa opportuno utilizzare i residui vegetali, costituiti essenzialmente da lignocellulose, al fine di evitare la perdita di ingenti quantità di energia chimica. Le potenzialità applicative.di questi materiali sono di solito ritenute di scarso interesse, ma qualora una appropriata tecnologia innovativa ne renda possibile una efficiente utilizzazione, essi possono rivelarsi di grande interesse ed aiuto nei diversi settori agrario, industriale, ambientale.

Pertanto, il miglioramento della sostenibilità è favorito dalla utilizzazione biologica delle lignocellulose.

In agricoltura vengono utilizzate le diverse specie domesticate, con diversi tipi di ripartizione (fig. 1) permettono ottenere prodotti diversi, quali amidi da cereali e tuberi, olii da semi, quali il girasole, o da frutti, quale l'olivo, proteine da legumi, foraggio da specie foraggiere, etc., prevalentemente destinati alla alimentazione umana e animale.

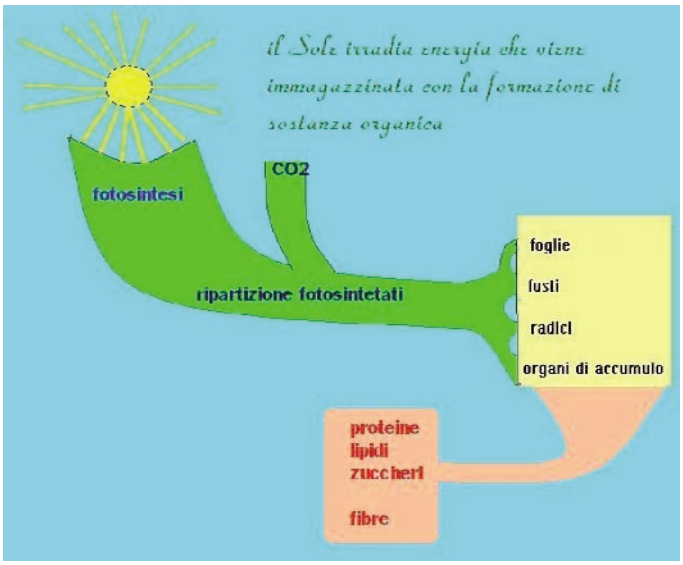

Fig. 1. Variabilità della composizione della biomassa secondo le diverse specie vegetali.

La biomassa inutilizzata, costituita da milioni di tonnellate che ogni anno si riforma come conseguenza delle coltivazioni (fig. 2), è spesso ancora classificata come residuo agricolo, ma in realtà può essere considerata materia prima secondaria se possono essere sviluppati processi innovativi efficienti.

La utilizzazione delle lignocellulose può avvenire mediante fermentazione sommersa (SmF) o in fase solida (SSF), utilizzando microrganismi in grado di degradare cellulose, emicellulose e lignine.

La SSF è indicata come alternativa promettente per diversi processi di bioconversione, come dimostra la ormai abbondante letteratura scientifica internazionale, ed è caratterizzata dallo sviluppo dei microorganismi su substrati solidi in assenza di acqua libera. La bioconversione, è ottenuta esclusivamente mediante l'impiego di miceli di funghi eduli (fig. 3), al fine di evitare la presenza di sostanze tossiche che potrebbero altrimenti essere rilasciate nell'ambiente.

La metodologia descritta, caratterizzata da un elevato grado di innovazione tecnologica, è stata proposta fin dal 1956, con la descrizione di un bioreattore SSF (fig. 4).

Una tecnica più semplice per le fermentazioni in fase solida è stata ottenuta utilizzando secchetti di plastica termoresisitenti e quindi sterilizzabili che si possono definire beute a volume variabile (fig. 4b).

A tal fine, utilizzando agenti biologici diversi quali microrganismi, cellule, o enzimi, è possibile sviluppare tecnologie innovative dalle notevoli potenzialità.

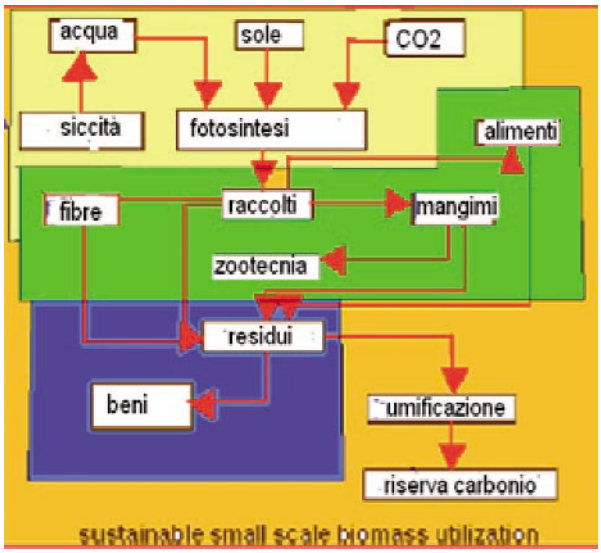

Fig. 2. Principali aspetti della biodegradazione dei polimeri lignocellulosici.

Le possibili applicazioni della SSF utilizzando residui agroindustriali hanno riguardato positivi risultati: nella degradazione delle sostanze aromatiche recalcitranti presenti nei reflui oleari, della degradazione di composti aromatici clorurati e pesticidi, nella purificazione delle acque di impianti petrolochimici, nell'utilizzazioni dei residui per la produzione di composti ad alto valore aggiunto, quali pesticidi naturali, coloranti, tensioattivi biodegradabili, enzimi a fini industriali (fitasi, laccasi. Mn-perossidasi, emicellulasi etc.), fibre vegetali ad uso cartario e tessile. Al fine di studiare su scala più ampia le potenzialità offerte dalla bioconversione SSF,

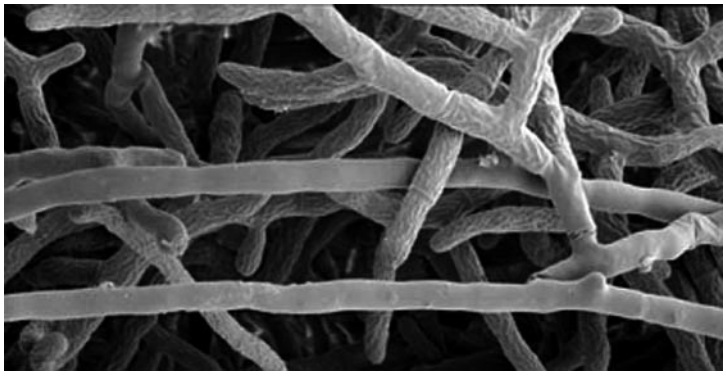

Fig. 3. Ife di micelio.

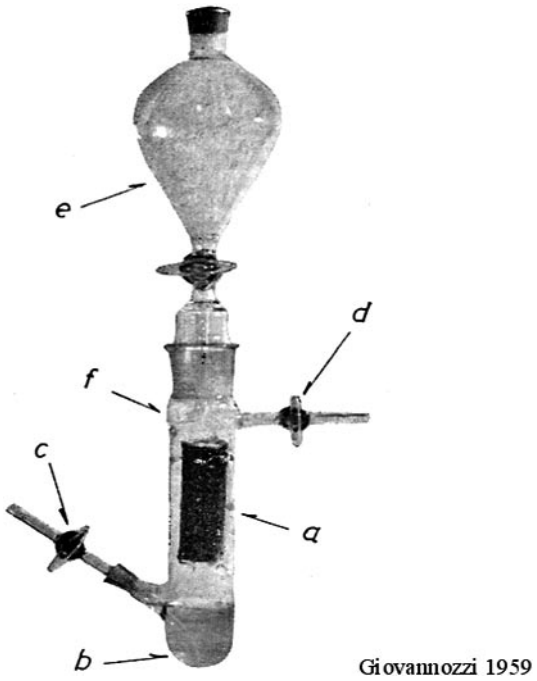

Fig. 4. Primo bioreattore in fase solida descritto nella letteratura scientifica.

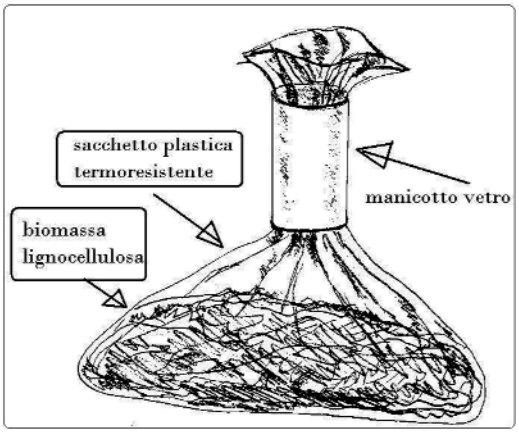

Fig. 4b.

è stato progettato e costruito un bioreattore a tamburo rotante della capacità di circa 4 m^3 (Fig. 5).

La utilizzazione della SSF al fine di produrre sostanze utili ed attivare processi di bioconversione richiede un'opportuna tecnologia, date le caratteristiche chimico-fisiche dei residui lignocellulosici, in particolare la loro insolubilità in acqua, e la loro recalcitranza alla biodegradazione, che richiede attività metaboliche presenti in alcuni tipi di organismi, quali i funghi.

Infatti, le pareti cellulari sono costituite essenzialmente da cellulose, lignine ed emicellulose, le quali formano copolimeri con una grande varietà di strutture chimiche che a loro volta costituiscono strutture morfologiche diverse.

La demolizione di queste molecole avviene mediante le ife fungine (fig. 3 e 6), che sono in grado di attaccare queste strutture insolubili e degradarle, mediante attività enzimatiche quali le cellulasi per degradare le cellulose, le emicellulasi per degradare le emicellulose ed enzimi ligninolitici per degradare le lignine. La fig. 7 mostra come i pesi molecolari dei residui lignocellulosici riportati in ascisse risultino totalmente degradati dall'azione degli enzimi fungini.

I vantaggi della SSF, rispetto alle Sm, dovuti all'assenza di grandi quantità di acqua, comportano una notevole riduzione dei volumi di fermentazione per unità di massa di substrato rispetto alla fermentazione liquida. Pertanto, alla fine della fermentazione SSF la concentrazione del prodotto è notevolmente maggiore e ciò, abbassando i successivi costi, rende più efficiente l'ottenimento del prodotto.

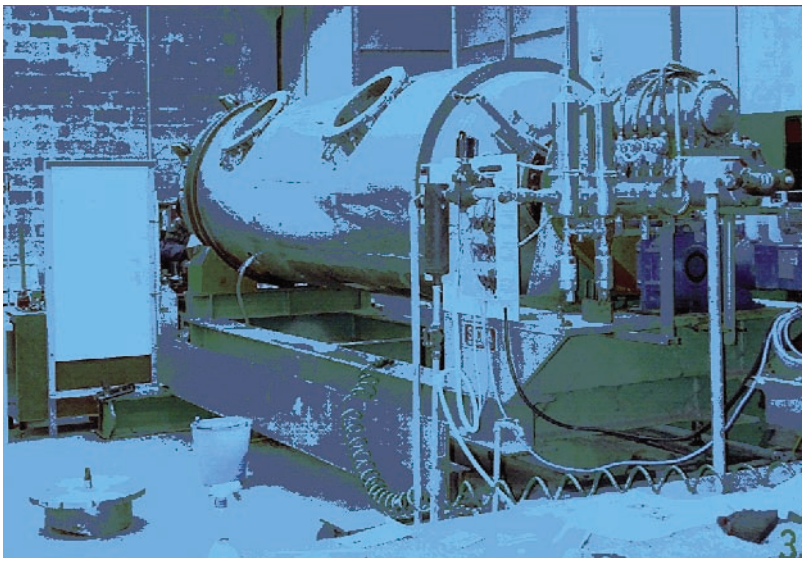

Fig. 5. Bioreattore prepilota SSF 4000 litri.

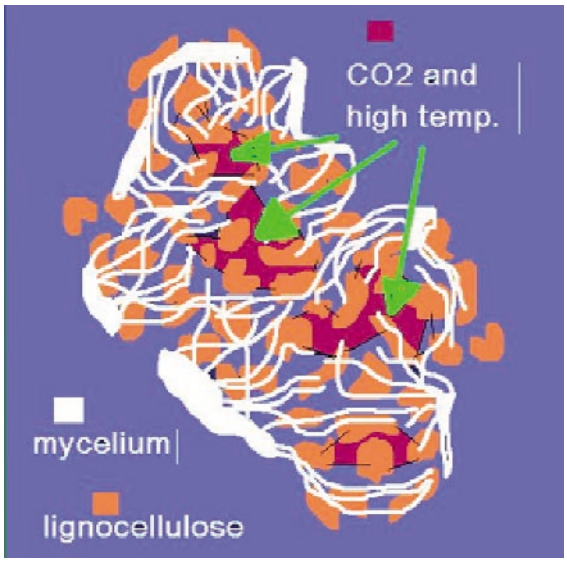

Fig. 6. Glomerulo lignocellulosico colonizzato da ife e interazioni con temperatura e concentrazione CO_2.

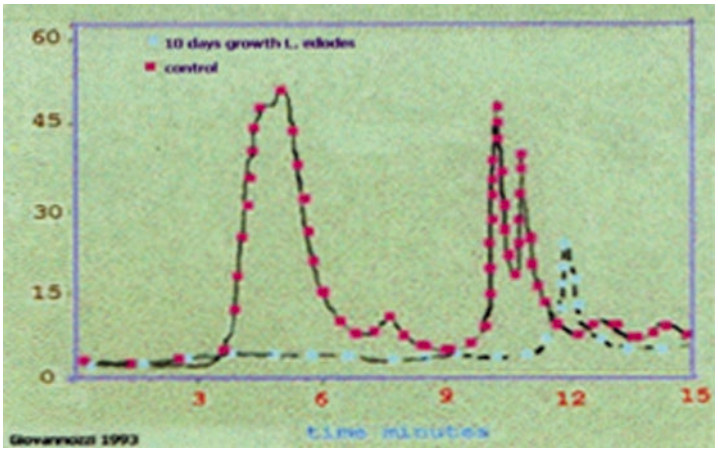

Fig. 7. Distribuzione pesi molecolari prima e dopo il trattamento enzimato.

La fermentazione SSF è una tecnologia attraente specialmente in quelle situazioni dove le risorse finanziarie sono limitate e vi è abbondanza di residui lignocellulosici. Inoltre, l'uso dei residui agricoli come substrati aumenta il reddito dei coltivatori locali e fa diminuire i costi di eliminazione.

Per ciò che riguarda gli effluenti di processo, l'assenza di grandi volumi di acqua di scarico ne riduce inoltre l'entità, abbassando gli eventuali costi dei trattamenti di disinquinamento. Anche la sterilizzazione ed il costo dei bioreattori, a parità di volume, sono più limitati.

È essenziale mantenere in equilibrio i ricambi gassosi e le condizioni colturali in tutta la biomassa che si vuole utilizzare, mediante l'impiego di idonei bioreattori che permettano, attraverso un rimescolamento della biomassa, di mantenere in equilibrio e costanti gli scambi termici e gassosi.

Tali accorgimenti tecnici permettono di ottimizzare le attività metaboliche degli organismi che realizzano la bioconversione, consentendo di ottenere risultati interessanti per efficienza, riproducibilità e tempi di trasformazione. Ciò, in definitiva, attraverso processi industriali, fa sì che materiali secondari di scarto diventino vere sorgenti di materie prime rinnovabili.

Alcune applicazioni

Con la disponibilità di una tecnologia innovativa quale quella descritta si possono attivare nuovi processi e produzioni, dei quali si riportano alcuni esempi:

Compostaggio – È un processo basato sulla interazione di moltissime specie di microrganismi che trasformano la sostanza organica di origine cellulare in composti molto complessi chimicamente e che vanno sotto il nome generico di humus. Questa tecnologia razionalizza processi biologici naturali esistenti sul pianeta Terra da milioni di anni, da quando è iniziata la vita. Attualmente, il processo di compostaggio è visto come una tecnologia largamente applicabile per produrre fertilizzanti ed ammendanti, utilizzando residui lignocellulosici. Con la tecnologia SSF il compostaggio può avvenire più rapidamente ed in maniera controllata, al fine di ottenere formazione di humus con caratteristiche migliorate.

Degradazione di inquinanti e pesticidi – Un tipo di inquinamento è dovuto alla presenza di composti organici ed inorganici che, quali rifiuti di attività antropiche, vengono rilasciati nell'ambiente. La limitazione di queste conseguenze negative può essere ottenuta attraverso controllo e modifiche dei processi produttivi e mediante la degradazione delle molecole inquinanti, particolarmente quelle organiche, utilizzando organismi fungini estremamente versatili, come risulta dalla Tabella 1.

Limitatamente agli aspetti legati al mondo agricolo, i reflui inquinanti, quali quelli degli oleifici, ed i pesticidi, costituiscono una sfida tecnologica molto impegnativa. Attraverso la tecnologia SSF si può contribuire al disinquinamento, come avviene con i componenti fenolici dei reflui di oleificio.

% degradation of chemicals after 30 days in inoculated soils

SOLID STATE SYSTEM

mycelia	*				*	
Contaminants	NRRL 6361	CBS 664.97	CBS 347.63	CBS 577.79	DABA CP4	DABAC P82
Naphtalene	*100*	100	39,0	57,3	*44,5*	47,2
2,6-dichloroaniline	100	100	83,2	82,8	86,9	94,1
2,4-dichloroaniline	100	100	100	100	100	100
1,2,3,4 -tetrachlorobenzene	100	100	25,5	73,5	44,0	70,8
Diphenylether	100	100	51,8	78,0	67,7	79,3
2,3,4,5,6 -pentachloroaniline	N.D.§	5,3	N.D.	37,2	19,6	12,9
Diphenylsulfone	12,1	11,0	23,6	24,4	26,5	27,9
9,10-antracenedione	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1-cloro -9,10 -antracenedione	N.D.	2,5	N.D.	6,5	N.D.	N.D.
1,1-bisnaphtalene	N.D.	N.D.	N.D.	48,5	1,6	59,0
1-amino -9,10antracenedione	35,5	30,5	N.D.	3,1	5,5	23,8
1,2-bisnaphtalene	*N.D.*	N.D.	N.D.	50,2	*50,3*	100
7[H]-benz[DE] -antracen -7-one	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Tab. 1. Versatilità di attività di polifenolossidasi su molecole.

Disinquinamento di impianti zootecnici – Negli impianti zootecnici suinicoli esiste un grave problema di inquinamento dovuto all'impossibilità di utilizzare i fosfati contenuti nei fitati presenti nei mangimi. Mediante SSF è possibile ottenere l'enzima fitasi, con il quale trattare i mangimi per estrarne fosfato secondo la reazione descritta in fig. 8 e diminuire l'inquinamento da liquami.

Produzione di paste cellulosiche – Nel caso di residui agricoli ricchi di cordoni fibrosi cellulosici, quali gli steli delle piante erbacee, possono essere realizzate anche altre applicazioni innovative, quali ad esempio la preparazione di paste cellulosiche da destinare alla produzione della carta.

Sia piante arboree che erbacee possono essere utilizzate come sorgenti di fibre cellulosiche. Se come sorgenti di fibre vengono usate le prime, il materiale viene preparato sotto forma di frammenti (*chips*). Se vengono usati materiali erbacei, questi vengono puliti, eliminando le parti non fibrose, e quindi ridotti a dimensioni opportune.

Le biomasse così preparate subiscono trattamenti con reattivi chimici e cottura sotto pressione, per degradare la lignina e liberare intatte le fibre cellulosiche.

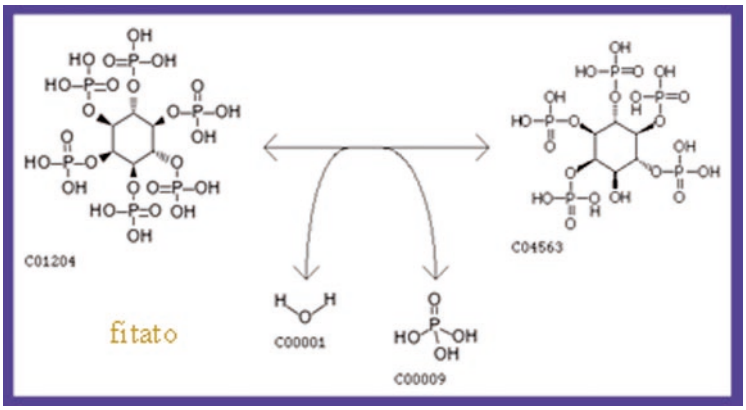

Fig. 8. Azione della fitasi sui fitati, con l'ottenimento di fosfato utile per la mangimistica.

La sospensione cellulosica è depositata omogeneamente su tele filtranti, quindi essiccata su cilindri riscaldati e la carta ottenuta immagazzinata sotto forma di rotoli.

Tale processo è fortemente inquinante, a causa dell'uso di prodotti chimici aggressivi, della ecotossicità degli effluenti di cartiera e della grande richiesta di energia, tutti aspetti che caratterizzano negativamente le produzione di paste di cellulosa.

Con la degradazione selettiva della lignina per via biologica (*biopulping*), mediata da enzimi ossidoriduttivi che vengono fatti agire prima dei trattamenti chimici e termici, la pasta cellulosica è ottenuta diminuendo fortemente sia l'uso di prodotti chimici che l'impiego di energia termica e meccanica, con la produzione di effluenti di cartiera molto meno inquinanti.

Poiché enorme è la disponibilità di residui vegetali ricchi di fibre, quali paglie di cereali, steli di piante diverse come cotone, canapa etc, la tecnologia sopra descritta, totalmente compatibile con l'ambiente, consente di ottenere carte con caratteristiche reologiche migliorate, buona resistenza all'invecchiamento, assoluta mancanza di tossicità, ed anche assenza di effluenti, data la particolarità che gli enzimi sono prodotti con lo stesso substrato utilizzato per produrre pasta cellulosica (Fig. 9).

Osservazioni finali

È risultato evidente in questi anni che la trasferibilità dell'innovazione tecnologica è possibile solo se sostenuta da una ricerca multidisciplinare di buon livello, dato che la utilizzazione integrata delle approfondite conoscenze nei settori biologici, chimici ed ingegneristici e di sofisticate apparecchiature di laboratorio, permette di individuare le modalità tecnologiche da sviluppare, con il continuo controllo della fattibilità economica.

Val la pena inoltre richiamare l'attenzione sul fatto che l'adozione di innovazioni tecnologiche crea un indotto, talvolta anch'esso innovativo, e quindi un river-

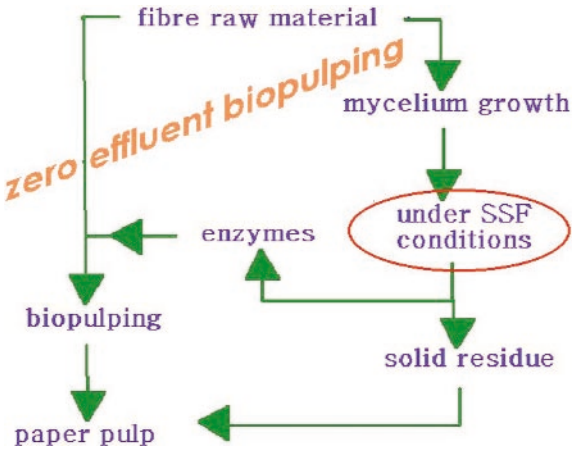

Fig. 9. Ottenimento di paste cellulosiche con controllo residui ed effluenti.

bero socio-economico, che in sostanza significa creazione di nuovi posti di lavoro e maggiore ricchezza.

A chiusura di questo breve riassunto dei principali risultati innovativi da noi ottenuti, che hanno effetto positivo sulla sostenibilità biologica e sul controllo dell'inquinamento chimico, si può concludere che i materiali lignocellulosici costituiscono un'impressionante vastissima riserva di energia chimica rinnovabile che con opportune tecnologie innovative può essere utilizzata come materia prima.