

*Marco Orlandi
Dipartimento di Scienze
dell'Ambiente e Del Territorio
Università Milano-Bicocca
marco.orlandi@unimib.it*

ITALIC 4: BIOTECNOLOGIE E MATERIALI LIGNOCELLULOSICI

Sul tema delle potenzialità delle biotecnologie per il trattamento delle biomasse lignocellulosiche, si è tenuta una sessione nell'ambito del Convegno Italic 4. In questa sessione si sono messe in evidenza le potenzialità, la versatilità ed il basso impatto ambientale dei trattamenti biotecnologici per la produzione di materiali biodegradabili e di chemicals dai materiali lignocellulosici, anche da quelli di scarto. Alcuni dei trattamenti proposti sono stati applicati su scala industriale, altri possono essere un'importante alternativa per sostituire i processi attualmente utilizzati.

Nell'ambito Convegno "Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger", tenutosi a Villa Mondragone, centro congressuale dell'Università "Tor Vergata" di Roma, lo scorso maggio, una sessione è stata dedicata all'impiego delle biotecnologie per il trattamento dei materiali lignocellulosici.

L'abbinamento delle biotecnologie con i materiali lignocellulosici è uno degli obiettivi strategici della ricerca europea e mondiale in quanto risponde alla richiesta di incrementare l'utilizzo sostenibile di risorse rinnovabili utilizzando tecnologie ambientalmente compatibili [1]. In

particolare alcune tra le più importanti applicazioni delle biotecnologie alle bio-masse riguardano la produzione di bio-energia, di bio-materiali e di fine chemicals [2]. In un moderno approccio biotecnologico integrato è necessario che la qualità dei materiali lignocellulosici venga valutata sin dal momento di piantare nuove foreste, infatti un'appropriata selezione di specie arboree, di tecniche di coltivazione e di produzione è in grado di rifornire l'industria con una biomassa abbondante e soprattutto di alta qualità. Questo è dovuto al fatto che tutti i componenti della biomassa di interesse industriale sono prodotti del metabolismo primario o secondario. In breve la biosintesi dei

carboidrati incomincia con il processo di fotosintesi nei cloroplasti, dell'amido nei plastidi e del sucrosio nel citoplasma. I prodotti di fotosintesi sono poi utilizzati sia per la sintesi dei metabolici cellulari sia per la respirazione. Questo vuole dire che il carbonio organico ha la possibilità di entrare in diverse vie metaboliche, quali la sintesi dell'amido, il ciclo della glicolisi, la sintesi della parete cellulare, o attraverso il metabolismo secondario verso la sintesi dei fenoli costituenti la lignina ed altri estrattivi del legno [2]. Esiste quindi la possibilità, modulando opportunamente le diverse vie metaboliche attraverso le biotecnologie, di ottenere biomasse con proprietà specifiche per determinate applicazioni industriali.

In questa linea di ricerca si inserisce il lavoro di Battistelli *et al.* [3] che riguarda la variabilità nella caratteristica delle biomasse di cloni di pioppo dovute all'ambiente di coltivazione, alle specie, al genotipo. Due cloni di pioppo sono stati coltivati in due diversi siti, uno in Lombardia e l'altro in Veneto. Dai risultati riportati nella ricerca si vede come la produzione di biomasse nel sito del Veneto sia doppia rispetto al sito situato in Lombardia. La variabilità genetica dei cloni è altrettanto importante in quanto il clone migliore ha una produttività superiore al 100% rispetto al clone peggiore. Questo dato vale solo per il sito migliore, infatti per quanto riguarda i pioppi piantati in Lombardia non si sono osservate differenze di produttività tra i cloni. Altre informazioni interessanti hanno riguardato la differente produzione di amido e zuccheri solubili nei differenti siti. In conclusione una corretta selezione dei cloni di una pianta abbinata ad una corretta scelta del sito consente di avere un netto miglioramento della produzione sia dal punto di vista qualitativo sia quantitativo.

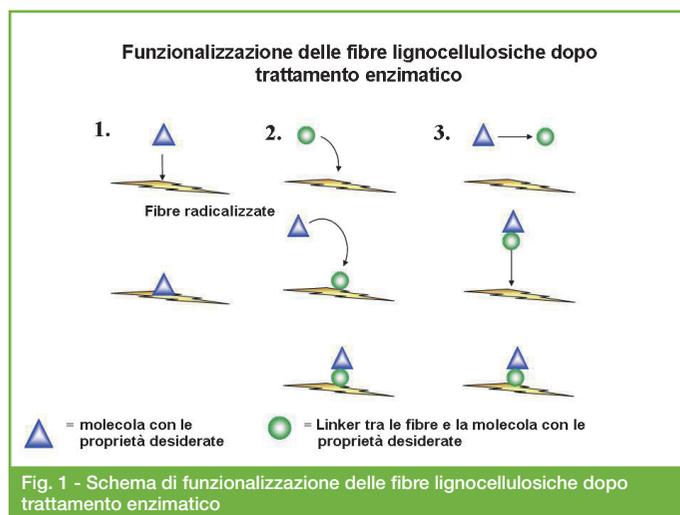
Altrettanto necessario per lo sviluppo di bioprocessi è la comprensione del rapporto tra struttura e funzione negli enzimi. È importante avere un'ampia varietà di enzimi con differenti caratteristiche dovute alla presenza di proteine "ad hoc" per specifiche applicazioni indu-

striali [4]. In particolare il gruppo Giardina e Sanna [5] ha studiato e caratterizzato le laccasi prodotte da *Pleurotus ostreatus*.

Lo studio e lo screening delle mutagenesi e delle ricombinazioni casuali delle laccasi prodotte da *Pleurotus ostreatus* ha consentito di ottenere informazioni importanti sul rapporto struttura-reattività di questi enzimi. Dai dati riportati da Sanna è emerso che l'eterogeneità delle laccasi da funghi è certamente dovuta ai geni codificatori, ma il pool di isoenzimi risulta essere molto più complesso a seguito di modificazioni post traslazionali. Questo lavoro ha portato inoltre alla costruzione di una libreria di 2.300 laccasi mutate e all'identificazione di quattro nuove laccasi più attive e stabili di quelle utilizzate come punto di partenza. Sulla base della selezione dei materiali di partenza e degli enzimi è stato quindi possibile modificare i materiali lignocellulosici in modo da aumentarne il valore e/o per utilizzarli in nuove applicazioni biotecnologiche.

Le fibre lignocellulosiche ottenute dal pulp si prestano particolarmente bene per queste nuove applicazioni dal momento che la presenza della lignina sulla loro superficie offre delle interessanti possibilità di utilizzare le laccasi per procedere all'attivazione delle fibre, primo passaggio per la modifica delle fibre. Il vantaggio nell'uso delle laccasi riguarda le blande condizioni di reazione, la selettività e la specificità delle reazioni. Un altro punto interessante e vantaggioso nell'utilizzo delle laccasi è riconducibile al fatto che le reazioni avvengono sulla superficie delle fibre e portano alla formazione di radicali stabili, ma sufficientemente reattivi, quali i fenossi-radicali. Un possibile schema di funzionalizzazione delle fibre è riportato nella Fig. 1. Nell'ambito di questa linea di ricerca sono stati presentati due lavori il primo dei quali, presentato da Anna Suurnakki, riassumeva alcuni dei risultati di un progetto europeo del V programma quadro (Biocompac) [6] ed il secondo, presentato da Elegir, riassumeva alcuni dei risultati scientifici di un altro progetto europeo del VI programma quadro (Sustainpack) [7].

Nel lavoro di Suurnakki *et al.* è stato descritto un trattamento chemoenzimatico per l'idrofobizzazione delle fibre lignocellulosiche ottenute dal processo termomeccanico (TMP fibers) [8]. Per effettuare questo trattamento si sono utilizzate delle laccasi ottenute da *T. irsu-ta*. Le migliori condizioni di radicalizzazione sono state studiate utilizzando la risonanza elettronica di spin (EPR) per valutare la massima formazione di fenossi radicali sulle fibre al variare dei tempi di reazione, della concentrazione di enzima e del pH della soluzione. Attraverso analisi in risonanza magnetica nucleare (^{13}C -NMR, ^{31}P -NMR, 2D-HSQC) della lignina estratta dalle fibre dopo il trattamento enzimatico è stato possibile concludere che la lignina presente nelle fibre TMP non subisce reazioni degradative. Dopo il trattamento enzimatico con la laccasi le fibre sono state fatte reagire con il dodecil galato in modo da impartire proprietà idrofobiche. I risultati del tratta-



mento sono stati valutati tramite misure di angolo di contatto su alcuni foglietti preparati con fibre idrofobizzate. I principali risultati sono riportati in Fig. 2. Da questa figura si evidenzia come dopo il trattamento enzimatico si ottiene una buona idrofobizzazione del foglio: questa metodologia è stata brevettata [9].

Sulla stessa linea di intervento si inserisce il lavoro di Elegir *et al.* [10]. In questo caso il problema che si è voluto affrontare riguarda la possibilità di avere dei materiali da imballaggio più leggeri, ma con le stesse proprietà fisico-meccaniche senza impiegare resine formaldeide/AOX. In letteratura sono presenti alcuni studi che mostrano significativi incrementi delle proprietà di resistenza ad umido trattando delle fibre con enzimi e particolari mediatori [11]. Questi studi risultano comunque non ancora maturi per un possibile impiego industriale. Il trattamento proposto da Elegir prevede dapprima il trattamento delle fibre con una laccasi da *T. pubescens* per ottenere la formazione di fenossi radicali da utilizzare per legare alle fibre acidi *p*-idrossi-benzoici o caffeici. I gruppi acidi legati sono stati successivamente utilizzati per legare chimicamente un polimero contenente gruppi amminici. Le fibre così funzionalizzate sono state utilizzate per ottenere dei fogli su cui sono state valutate le proprietà meccaniche. I risultati sono riportati nella Fig. 3 e si osserva come il parametro di Scott Bond raddoppi in relazione alle fibre non trattate, mentre per quanto riguarda l'indice "wet tensile" questo risulta essere 15 volte superiore rispetto a quello ottenuto dalle fibre non trattate ed il doppio rispetto a quanto riportato in letteratura per i trattamenti enzimatici con o senza mediatori [11].

Il trattamento di reflui lignocellulosici per l'ottenimento di prodotti e polimeri ad alto valore aggiunto è stato il terzo punto rilevante discusso nel congresso Italic 4. E.S. Barbosa [12] ha affrontato il problema di ottenere la vanillina dai reflui delle principali industrie agro-alimentari del Brasile. Il vantaggio di ottenere aromi utilizzando processi biotecnologici riguarda il fatto che gli aromi prodotti da bio-trasformazio-

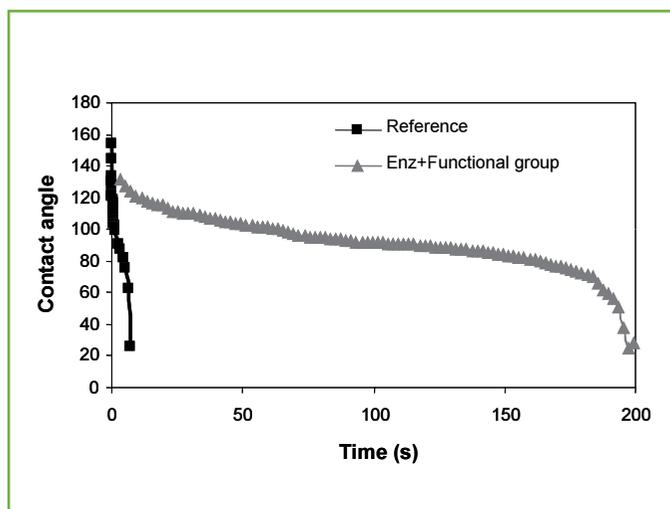


Fig. 2 - Idrofobicità delle fibre TMP prima del trattamento enzimatico (reference) e dopo il trattamento enzimatico con laccasi e dodecilgallato: reference = fibra TMP, Enz+Functional group = fibraTMP dopo la formazione del legame con il dodecilgallato

ni enzimatiche da fonti naturali vengono considerati dalla legislazione statunitense ed europea prodotti naturali, il che contribuisce ad una migliore accoglienza di questi prodotti da parte dei consumatori [13]. Come esempio di questa filosofia Barbosa ha riportato nel suo lavoro l'ottimizzazione del processo di produzione della vanillina (4-idrossi-3-metossi-benzaldeide) attraverso una fermentazione in stato solido di reflui dell'industria delle noci di cocco utilizzando il basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium*. Sono stati utilizzati due diversi tipi di paglia da noci di cocco: in un caso la paglia è stata asciugata al sole, nel secondo caso la paglia è stata pressata meccanicamente. La produzione di vanillina è stata seguita attraverso una cinetica e le condizioni di reazione sono state ottimizzate variando 19 parametri sperimentali. I risultati hanno consentito di osservare che la paglia ottenuta dall'asciugatura al sole fornisce risultati migliori e che ottimizzando le condizioni di reazione si è passati da una produzione di vanillina di 44 $\mu\text{g/g}$ ad una di 53 $\mu\text{g/g}$ con un aumento del 20%.

D. Dionisi [14] ha presentato un lavoro riguardante l'ottenimento di poliidrossialcanoati (PHAs) a partire dai reflui della spremitura dell'olio, cioè di uno dei principali prodotti delle industrie agroalimentari italiane attraverso un processo anaerobico-aerobico. Il processo presentato da Dionisi prevede l'impiego di quattro reattori in condizioni di batch per far fermentare i reflui acquosi della spremitura delle olive ed ottenere un effluente ricco acidi grassi volatili che rappresentano il punto di partenza per il secondo stadio anaerobico del processo che verrà sviluppato successivamente. Il maggiore componente tra gli acidi grassi volatili è risultato essere l'acido acetico insieme agli acido propionico e butirrico.

Gli acidi volatili sono il punto di partenza della fermentazione aerobica che non è stata descritta in questo lavoro.

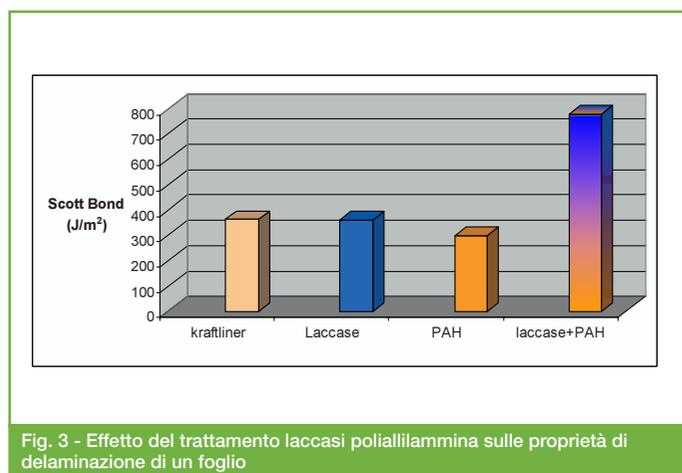


Fig. 3 - Effetto del trattamento laccasi poliallilamina sulle proprietà di delaminazione di un foglio

Un'altra possibile applicazione dei sottoprodotti ottenuti dai materiali lignocellulosici è stata presentata da Sena-Martins [15], come uno dei risultati del progetto europeo Ecobinders [16]. In questo caso l'obiettivo del lavoro è stato quello di sviluppare nuovi leganti basati sulle biomasse con trattamenti ecologicamente compatibili in grado di sostituire gli adesivi sintetici comunemente usati nella produzione industriale. Come prodotti di partenza sono state utilizzate diverse lignine industriali trattate sia con laccasi sia con sistemi laccasi mediatori. I primi risultati sembrano essere promettenti per raggiungere l'obiettivo di ottenere delle resine basate sulle lignine in grado di ridurre i problemi di impatto ambientale generati dagli adesivi chimici.

Da ultimo il gruppo di Colao *et al.* [17] ha presentato un lavoro che prevede l'utilizzo di diversi tipi di laccasi ottenuti da funghi White Rot per il trattamento di effluenti industriali colorati. I risultati hanno dimostrato che una laccasi ottenuta da *T. trogii* ha un'elevata capacità di decolorare acque contaminate da coloranti sintetici contenenti una vasta gamma di gruppi funzionali. Questa capacità può venire aumentata utilizzando una versione ricombinata dell'enzima.

Conclusioni

Dai lavori del convegno sono emersi a giudizio dell'autore alcuni punti rilevanti per un impiego sempre maggiore delle biotecnologie nel campo dei materiali lignocellulosici. Tramite le biotecnologie si possono ottenere delle coltivazioni arboree con specifiche caratteristiche utili per i successivi trattamenti. L'importanza di conoscere chimicamente la composizione delle biomasse di partenza e di conoscere l'obiettivo finale consente di scegliere l'enzima più adatto per le biotrasformazioni. Come evidenziato dai lavori di Giardina, ma anche di Suurnakki e Colao non esiste una laccasi, ma una famiglia con potenziali di ossidazione, massimo di attività a differenti pH molto diversi, per cui ciascun processo necessita una particolare laccasi. Sulla base di queste conoscenze si può abbinare al trattamento enzimatico uno chimico specifico con una limitata quantità di prodotti chimici impiegati. I risultati di questa opzione sono molto vantaggiosi sia da un punto di vista del prodotto finito sia anche da un punto di vista ambientale. I trattamenti biotecnologici consentono inoltre un ottimo approccio per ottenere dai reflui dei prodotti ad alto valore aggiunto come aromi, tensioattivi, adesivi, etc con tecnologie ambientalmente compatibili ed a costi competitivi.

Bibliografia

- [1] M. Paster *et al.*, Industrial Bioproduct today and tomorrow, July 2003.
- [2] G.J. Seifert, *Current Opinion In Plant Biology*, 2004, **7**, 27.
- [3] A. Battistelli *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 151 and oral presentation.
- [4] G. Palmieri *et al.*, *Enz. Microb. Technol.*, 2003, **33**, 220.
- [5] P. Giardina *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 147 and oral presentation.
- [6] <http://virtual.vtt.fi/virtual/biocompac/>
- [7] www.sustainpack.com/index.php
- [8] A. Suurnakki *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 143 and oral presentation.
- [9] J. Buchert *et al.*, European patent WO2005071790 2005.
- [10] G. Elegir *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 159 and oral presentation.
- [11] M. Lund, C. Felby, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 760.
- [12] E.S. Barbosa *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 311 and poster presentation.
- [13] A. Lomascolo *et al.*, *Tib. Tech.*, 1999, **17**, 282.
- [14] D. Dionisi *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 155 and oral presentation.
- [15] G. Sena-Martins *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 319 and poster presentation.
- [16] www.ecobinders.net
- [17] M.C. Colao *et al.*, Italic 4 Science & Technology of Biomass: Advances and Challenger, 2007, May 8-10, Proc. Book, pag. 315 and poster presentation.

Italic 4. Biotechnology and Lignocellulosic Materials

The growing demand for the production of bio-materials, chemicals and bio-fuels from renewable materials has prompted a worldwide interest in the development of biotechnologies applied to agricultural and forest biomass. The wide scientific interest emerging in this field was well focalized in the Italic 4 congress held in Monte Porzio Catone from 8-10 June 2007.



NePI: il programma dimostrativo Il laboratorio e le tecnologie

24 settembre - 6 ottobre 2007

(lunedì-venerdì: dalle ore 9,00 alle ore 18,00
sabato:dalle ore 9,00 alle ore 12,00)

Presso il **Centro di Eccellenza PlasmaPrometeo**, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Viale dell'Innovazione 10, Milano, è attivo il demo-center del progetto NePI.

È possibile, visitare lo spazio adibito per le dimostrazioni sulle seguenti tecnologie:

▪ **le nanotecnologie**, basate principalmente sui **processi a plasma**, che servono per la funzionalizzazione della superficie dei materiali.

Sono disponibili reattori a plasma sia a bassa pressione sia a pressione atmosferica con cui si possono rendere idrorepellenti, oleorepellenti, antifiama e aumentare la resa di stampa sulle vostre carte e cartoni e compositi;

▪ **le biotecnologie**, basate principalmente su processi di tipo enzimatico, che si applicano per la modifica delle proprietà di volume (oleorepellenza, idrorepellenza, antibatterico, aumento della resistenza a umido, riciclabilità).

Sono disponibili reattori per effettuare i trattamenti enzimatici sulle paste per carta e reattori di flottazione per effettuare dei trattamenti di disinchiostrazione sulle vostre carte e cartoni;

▪ **i sistemi e i servizi basati sulla conoscenza** utilizzati per il supporto e la gestione dei processi produttivi che, attraverso l'introduzione di innovativo approccio basato sul Case Based Reasoning permettono di formalizzare, immagazzinare e rendere fruibile il know-how proprio dell'azienda;

▪ **le tecnologie a basso impatto ambientale** che riguardano sia l'abbattimento del carico organico delle acque reflue sia l'analisi dei micro-inquinanti organici in tutte le fasi della filiera.

Oltre alle visite illustrative sulle nuove tecnologie è possibile:

- eseguire trattamenti a plasma su carte e cartoni forniti direttamente dai visitatori per ottenere proprietà di idrorepellenza, oleorepellenza, antifiama, aumento della resa di stampa;
- valutare i problemi ambientali e predisporre le analisi e i trattamenti da effettuare;
- eseguire trattamenti enzimatici su paste cartarie fornite direttamente dai visitatori, e analizzare le proprietà della carta ottenuta dalle paste cartarie così modificate;
- eseguire trattamenti di disinchiostrazione su carte e cartoni forniti direttamente dai visitatori, e analizzare le proprietà della carta ottenuta dalle fibre derivanti dal processo di disinchiostrazione;
- visionare un esempio di simulazione 3D e predisporre la realizzazione su particolari esigenze.

È disponibile un programma per **"LA SIMULAZIONE 3D"** il supporto al training e alla manutenzione del bene strumentale attraverso l'utilizzo di tecniche di rappresentazione tridimensionale, che permette di proporre ai propri clienti una nuova dimensione nella documentazione tecnica. Un sistema così concepito permette di coniugare indubbi vantaggi per il costruttore di macchine (immagine innovativa, riutilizzo dei disegni CAD lungo tutto il ciclo di vita della macchina, minori call-out) con i vantaggi per l'end user (maggiore disponibilità della macchina, capacità di evitare errori costosi, continuo esercizio delle abilità dell'operatore tramite virtual mock-up

*Nel corso del periodo previsto per le dimostrazioni, si terranno dei **seminari finalizzati** sulle applicazioni delle tecnologie proposte per l'industria cartaria e cartotecnica. Il programma dettagliato verrà comunicato in seguito.*