

Titolo del progetto di ricerca

Conversione della biomassa lignocellulosica in energia, combustibili e prodotti chimici

Inquadramento del Progetto di ricerca

L'attività di ricerca e sperimentale è inquadrata all'interno del progetto ORIGAMI ARS01_00881, CUP J46C18000370008, che ha tra i suoi scopi l'utilizzo di biomasse di scarto come risorse promettenti per la produzione di energia e biocombustibili costituisce una delle tematiche di punta per ridurre l'impatto antropico sul pianeta e per contrastare i cambiamenti climatici mediante la riduzione dell'emissione in atmosfera di gas serra. Di fatto la biomassa derivante dalle piante è rinnovabile e l'uso dell'energia in essa contenuta è considerato "carbon neutral" in ragione del fatto che le biomasse vegetali possono restituire in atmosfera tanta anidride carbonica (CO₂) quanta ne hanno sottratta per compiere la fotosintesi.

Tuttavia, la complessa struttura fisica e la composizione chimica della biomassa vegetale ostacolano notevolmente la sua conversione in energia, combustibili e prodotti chimici. Due principali categorie di processi di conversione sono utilizzate nella trasformazione di biomassa lignocellulosica: i processi termochimici e i processi biochimici. I primi includono combustione, pirolisi, gassificazione e liquefazione termica, mentre i secondi comprendono fermentazione e digestione [1,2]. Entrambi i processi presentano svantaggi e vantaggi in termini di resa ed impatto ambientale, conseguenza delle caratteristiche chimiche del materiale di partenza.

Il legno è composto da cellulosa, emicellulosa, pectina e lignine, le prime tre generate dalla polimerizzazione di monosaccaridi a 6 o 5 atomi di carbonio mentre il terzo, la lignina, costituisce un fitto e stabile reticolo di molecole aromatiche insolubili estremamente difficili da scomporre nelle singole componenti monomeriche [3]. Sebbene i metodi termochimici siano stati migliorati, il loro impatto sull'ambiente è ancora estremamente elevato e attualmente si guarda alla conversione enzimatica della biomassa vegetale come il processo chiave verso una transizione ecologica nella produzione di energia, combustibili e prodotti chimici.

Piano di Attività

Il piano dell'attività prevede l'espressione di proteine ricombinanti di origine fungina per la conversione di biomasse vegetali di scarto in zuccheri semplici.

I lieviti utilizzati per la produzione di proteine ricombinanti come il ceppo *Kluyveromyces lactis* sono classificati come organismi "GRAS - Generally Recognized As Safe". In aggiunta *K. lactis*, a differenza del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, non presenta l'indesiderato "effetto Crabtree", che consiste nella conversione del glucosio in etanolo anche in condizioni aerobiche, sottraendo così

scheletri carboniosi alla produzione di biomassa attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici [4]. Infine il ceppo *Kluyveromyces lactis* permette di produrre contemporaneamente più proteine, rendendolo adatto come sistema d'espressione per la progettazione di cocktails enzimatici che possono contribuire, in modo eco-sostenibile, alla degradazione del materiale lignocellulosico.

Cinque enzimi fungini ad attività idrolitica ed ossidasica in grado di agire sulle diverse componenti strutturali della parete vegetale sono stati identificazione *in silico* e clonati all'interno del genoma di *K. lactis*. Il progetto prevede la messa a punto dei sistemi d'espressione, la caratterizzazione biochimica dei singoli enzimi, l'eventuale ottimizzazione delle condizioni di catalisi e la produzione di cocktail enzimatici da testare su materiale di scarto di natura vegetale.

1. Degradazione della componente cellulosica

L'endoglucanasi C di *Aspergillus niger* e la cellobiosoidrolasi 12A di *Gloephyllum trabeum*, entrambi appartenenti alla famiglia delle glicoidrolasi, sono state selezionate in quanto in grado di idrolizzare i legami glicosidici β (1 \rightarrow 4) che tengono uniti i monomeri di glucosio all'interno delle fibrille di cellulosa. Le endoglucanasi agiscono sulle fibrille di cellulosa rilasciando glucani di lunghezza variabile; le cellobiosoidrolasi, invece, rilasciano β -cellobiosio attaccando la catena lineare di cellulosa a una delle sue estremità (a seconda della classe di appartenenza le cellobiosoidrolasi agiscono all'estremità riducente o non riducente delle microfibrille di cellulosa). Per entrambi le proteine è richiesta l'individuazione delle condizioni di crescita più adatte alla produzione degli enzimi ricombinanti, che saranno successivamente analizzati per le loro proprietà biochimiche e stabilità a pH e temperatura (due parametri rilevanti nei processi di degradazione di biomasse lignocellulosiche).

2. Degradazione della componente pectica

Le pectine costituiscono la componente meno abbondante e più facilmente estraibile dalle biomasse vegetali. Per tale motivo, dopo la messa a punto del sistema d'espressione, l'attività richiesta è quella di produrre mutanti con performance catalitiche migliorate attraverso un approccio di mutagenesi sito-specifica basandosi sulla conoscenza della struttura cristallografica della pectina liasi A di *Aspergillus niger* [5].

3. Degradazione della lignina

La degradazione della lignina è un processo ossidoriduttivo che vede principalmente coinvolte laccasi e Mn-perossidasi [6]. Per questo motivo la Mn-perossidasi di *Ceriporiopsis rivulosa* e la Laccasi 2 di *Botrytis cinerea* sono state selezionate per l'espressione in lievito. Per entrambi le proteine viene richiesta l'individuazione delle condizioni di crescita più adatte alla produzione degli enzimi ricombinanti e la successiva analisi biochimica con particolare riferimento alla stabilità a pH e temperatura.

4. Produzione di cocktail enzimatici

Scopo ultimo dell'attività è produrre cocktail enzimatici a diversa composizione da testare su biomasse di scarto di origine agricola.

Bibliografia

- [1] Pang, S. (2019) Advances in thermochemical conversion of woody biomass to energy, fuels and chemicals. *Biotechnology Advances*. 37: 589-597.
- [2] Østby, H., Hansen, L. and Horn, S. (2020). Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 47: 623–657.
- [3] Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 301–307.
- [4] Spohner, S., Schaum, V., Quitmann, H. and Czermak, P. (2016). *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 222: 104-116.
- [5] Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R. and Jenkins, J. (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*. 15: 677-689.
- [6] Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Swiderska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A. and Paszczynski, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 41: 941-962.

Programma formativo

Il programma formativo prevede che l'assegnista sviluppi l'autonomia sufficiente per procedere in maniera indipendente e pro-attiva allo svolgimento del progetto descritto nel paragrafo precedente.

L'assegnista dovrà essere in grado di gestire, organizzare ed interpretare i dati sperimentali. Inoltre, attraverso incontri mensili, l'assegnista dovrà essere in grado di presentare i risultati scientifici ottenuti ponendo particolare attenzione all'avanzamento dell'attività sperimentale svolta e al piano di sviluppo del lavoro.

Per questo è necessario che l'assegnista sia già in possesso delle seguenti competenze:

- i. Capacità di raccogliere e utilizzare informazioni già presenti in diverse banche dati
- ii. Capacità di clonare, esprimere e purificare proteine da sistemi ricombinanti
- iii. Capacità di condurre analisi biochimiche atte alla caratterizzazione degli enzimi
- iv. Capacità di condurre analisi *in silico* che guidino il processo d'ingegnerizzazione volto al miglioramento delle performance enzimatiche

Nel piano di formazione è prevista la partecipazione dell'assegnista a congressi nazionali e internazionali, workshop e seminari.