

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102021000027761</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>29/10/2021</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>29/04/2023</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
C	12	P	19	02

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
C	12	P	19	14

Titolo

**PROCESSO PER IL RECUPERO DI ZUCCHERI DI SECONDA GENERAZIONE**

## PROCESSO PER IL RECUPERO DI ZUCCHERI DI SECONDA GENERAZIONE

La presente domanda riguarda un processo di valorizzazione di scarti dell'industria agro-alimentare con produzione di zuccheri di seconda generazione adatti ad essere impiegati in processi fermentativi e di altri prodotti a valore aggiunto quali pectine e antiossidanti.

Gli zuccheri definiti "di seconda generazione" sono zuccheri ottenibili dalle biomasse di scarto dell'industria agro-alimentare, quindi senza sottrarre all'uomo risorse alimentari.

Attraverso trattamenti di varia natura, chimici, chimico-fisici o enzimatici, la biomassa lignocellulosica può infatti essere scomposta nei componenti principali (cellulosa, emicellulosa e lignina) e, dalla componente polisaccaridica, si possono ottenere zuccheri semplici da utilizzare come building blocks per la produzione di composti chimici o carburanti da fonte rinnovabile. Inoltre, i prodotti di scarto dell'industria agro-alimentare possono includere vegetali ricchi di zuccheri, come la bagassa della canna da zucchero, le polpe di barbabietola, i tutoli del mais, la frutta di scarto ed i residui di lavorazione della frutta.

Durante la lavorazione della frutta per ottenerne il succo (di seguito indicata anche come "spremitura"), in particolare, vengono generate enormi quantità di scarti (buccia, torsolo, semi, pezzi di polpa, etc.) che sono generalmente rifiuti. Questi scarti nel caso delle mele rappresentano anche fino ad 1/4 del peso fresco del frutto da lavorare.

I prodotti di scarto presentano composizioni variabili in base al tipo di vegetale impiegato, al suo grado di maturazione e alla tipologia di lavorazione cui vengono sottoposti. La qualità e la composizione degli zuccheri di seconda generazione da essi ottenuti determina la possibilità di impiegarli come componenti del terreno di coltura, in processi fermentativi ad opera di differenti microorganismi quali batteri, funghi o lieviti (eventualmente geneticamente modificati).

Nei processi fermentativi il terreno di coltura funge da supporto per la crescita dei microorganismi, fornendo gli elementi essenziali per un corretto sviluppo e per la produzione dei metaboliti. Nei lieviti, ad esempio, il carbonio è il principale elemento nella sintesi cellulare ed è anche utilizzato come fonte di energia. La capacità dei lieviti di utilizzare determinati composti del carbonio varia tuttavia a seconda della specie e del ceppo. Alcuni microorganismi fermentano infatti preferenzialmente saccaridi semplici a sei atomi di carbonio come glucosio e fruttosio; tale è il caso, ad esempio, dei lieviti tipicamente impiegati per la produzione di bio-butandiolo. I disaccaridi sono metabolizzati da un numero inferiore di microorganismi; si veda ad esempio la domanda di brevetto WO 2015/158716, che descrive un processo per la produzione di 1,4-butandiolo comprendente la fermentazione da parte di un microrganismo dotato di almeno una via metabolica per la sintesi di 1,4-butandiolo in un terreno di coltura

comprendente una miscela di glucosio e saccarosio. Pentosi e polisaccaridi sono invece assimilati solo da una minoranza di microorganismi.

Oltre che per la produzione di zuccheri di seconda generazione, lo scarto della produzione di frutta o della lavorazione industriale della frutta, ad esempio lo scarto della spremitura, può essere impiegato come fonte di numerosi composti, tra cui enzimi, pectine, acido citrico e altri composti bioattivi e funzionali. Tra questi ultimi, i polifenoli in particolare presentano un elevato potere antiossidante e ampie possibilità di impiego nel settore alimentare, della nutraceutica e della cosmetica ma anche come additivi per materie plastiche, elastomeri e lubrificanti.

Polifenoli presenti, ad esempio, negli scarti della spremitura di mele sono l'acido clorogenico, glicosidi della floretina e flavonoli come i glicosidi della quercetina. Uno dei metodi di estrazione dei polifenoli dagli scarti della spremitura di frutta prevede il contatto degli scarti liofilizzati e omogeneizzati con acetone a temperatura ambiente o con alcoli come metanolo o etanolo a temperature superiori ([doi.org/10.1039/9781849730785-00053](https://doi.org/10.1039/9781849730785-00053); Journal of Food Engineering 96 (2010) 134-140).

Le pectine sono polisaccaridi qualificabili come fibre solubili. Si tratta di strutture ad elevato peso molecolare presenti nelle pareti cellulari dei frutti e che risultano particolarmente abbondanti nella polpa e nella buccia di mela, nella scorza di arancia e degli agrumi in generale, ma si trovano anche ad esempio in pera, albicocca, ciliegia, prugna, frutti di bosco, carota. Grazie alle proprietà addensanti e gelificanti trovano impiego principalmente come additivi gelificanti nell'industria alimentare, e nell'industria cosmetica e farmaceutica come modificatori reologici, emulsionanti, gelificanti, stabilizzanti e addensanti.

La pectina per applicazione industriale viene convenzionalmente estratta mediante processi catalizzati da acidi forti come acido nitrico, cloridrico o solforico o che richiedono l'ebollizione diretta fino a 24 ore; si tratta di metodi lenti e che tra l'altro determinano la degradazione termica o la depolimerizzazione delle catene polisaccardiche, influenzando negativamente la qualità della pectina estratta e le rese di estrazione.

Ad esempio, è stato descritto il recupero di pectine tramite precipitazione del residuo della spremitura dei limoni con alcoli come etanolo, isopropanolo o metanolo, dopo digestione a caldo (80-90°C) con acido cloridrico (Journal of Chemical Engineering, IEB Vol. ChE 27, N. 2, December, 2012); tuttavia il precipitato ottenuto risulta impuro e contiene tracce di proteine, amido e zuccheri.

D'altra parte, la presenza negli zuccheri di seconda generazione di impurezze come acidi organici e fenoli o polifenoli, i quali sono dotati di attività antimicrobica oltre che antiossidante,

a concentrazioni consistenti può inibire i processi di crescita microbica in cui si intende sfruttarli.

Inoltre, gli zuccheri ottenuti da biomasse di scarto presentano spesso un contenuto in sottoprodotti (soprattutto strutture ad elevato peso molecolare) che conferiscono una elevata viscosità alle loro soluzioni concentrate, compromettendone l'utilizzo in processi fermentativi. A livello industriale, infatti, i processi fermentativi richiedono tipicamente di operare con substrati che, alle opportune concentrazioni, presentino una viscosità sufficientemente bassa da poter essere alimentati in maniera continua e controllata, ad esempio mediante pompe peristaltiche.

La presente invenzione risolve gli inconvenienti sopra citati in quanto permette la completa valorizzazione degli scarti della lavorazione della frutta per mezzo di un unico processo economico e sostenibile, in quanto fornisce (i) composizioni di zuccheri aventi caratteristiche, sia in termini di viscosità che di composizione, ottimali per il successivo impiego nella fermentazione industriale per la produzione di biochemicals quali ad esempio il biobutandiolo, poliidrossialcanoati (PHA), acidi dicarbossilici come acido succinico ( $C_4$ ) e altri acidi a più lunga catena ( $C_{12-18}$ ), (ii) pectine ad un elevato grado di purezza e qualità e infine (iii) sostanze ad alto valore aggiunto come i polifenoli, riducendo pertanto notevolmente il residuo finale della lavorazione.

Il processo della presente invenzione prevede infatti l'estrazione in acqua degli zuccheri solubili presenti negli scarti della produzione del succo di frutta, la separazione di un residuo insolubile dal quale si possono estrarre sostanze antiossidanti quali i polifenoli, una fase di idrolisi enzimatica della soluzione acquosa che permette di convertire selettivamente gli oligosaccaridi come il saccarosio in glucosio e fruttosio, fornendo di conseguenza una soluzione zuccherina arricchita in monosaccaridi.

Dalla soluzione zuccherina ottenuta vengono inoltre rimossi, tramite precipitazione in alcol, composti saccaridici ad elevato peso molecolare come le pectine, con conseguente riduzione della viscosità della composizione zuccherina finale.

L'intero processo può essere inoltre realizzato con un minimo impatto ambientale impiegando come unico solvente (o anti-solvente) organico l'etanolo, il quale è a sua volta ottenibile da fonte rinnovabile, completamente recuperabile e riciclabile in diverse fasi del processo. Nelle sue fasi principali non richiede inoltre di raggiungere temperature elevate o l'impiego di reagenti chimici, preservando la qualità dei componenti separati dal residuo, come le pectine, e la qualità e la quantità delle sostanze attive ricavabili dal residuo finale.

In aggiunta, la Richiedente ha osservato che, inaspettatamente, l'introduzione di una fase di idrolisi enzimatica per l'arricchimento in monosaccaridi della soluzione aquosa agevola la successiva separazione del precipitato in alcol, permettendo di ottenere pectine di qualità superiore.

Secondo un aspetto particolarmente vantaggioso, come materiale di partenza viene impiegato lo scarto della produzione del succo di mela, ottenendo una miscela di zuccheri arricchita in zuccheri semplici (glucosio e fruttosio) avente una composizione ottimale per l'impiego in processi fermentativi per la produzione di biochemicals quali ad esempio il bio-butandiolo, poliidrossialcanoati (PHA), acidi dicarbossilici come acido succinico (C4) e altri acidi a più lunga catena (C12-18).

Oggetto della presente invenzione è pertanto un processo per la produzione di zuccheri di seconda generazione da frutta di scarto e/o da scarti di lavorazione della frutta che comprende l'estrazione in acqua dei saccaridi solubili presenti in detti scarti, separando un residuo insolubile da una soluzione aquosa, l'idrolisi enzimatica degli oligosaccaridi presenti nella soluzione aquosa e la successiva separazione di composti saccaridici ad elevato peso molecolare (pectine) da detta soluzione aquosa mediante precipitazione alcolica.

Detto processo comprende inoltre opzionalmente una fase di estrazione di polifenoli da detto residuo insolubile separato dalla soluzione aquosa.

Detto processo permette pertanto di ottenere prodotti ad elevato valore aggiunto quali una composizione di zuccheri adatta alla successiva fermentazione per l'ottenimento di biocarburanti o intermedi chimici da fonte rinnovabile, pectine e composti ad azione antiossidante (polifenoli).

L'idrolisi enzimatica può essere effettuata direttamente sullo scarto di lavorazione in sospensione aquosa, i.e. durante l'estrazione della componente saccaridica solubile in acqua, oppure sulla soluzione aquosa ottenuta dopo la separazione del residuo solido insolubile in acqua. Preferibilmente, l'estrazione della componente saccaridica in acqua avviene contemporaneamente all'idrolisi enzimatica.

Secondo un primo aspetto, oggetto dell'invenzione è pertanto un processo per la produzione di zuccheri di seconda generazione da frutta di scarto e/o dallo scarto di lavorazione della frutta che comprende le fasi di:

- a1) sottoporre detto scarto ad una fase di idrolisi in presenza di acqua e di un enzima in grado di scinderne gli oligosaccaridi solubili, ottenendo una miscela aquosa comprendente monosaccaridi;

- b1) separare da detta miscela un residuo insolubile in acqua, ottenendo una soluzione acquosa comprendente monosaccaridi;
- c) concentrare detta soluzione acquosa e aggiungervi almeno un alcol;
- d) raffreddare a temperatura inferiore a 20°C, preferibilmente tra 1 e 10°C, e separare una frazione comprendente pectine da una soluzione arricchita in monosaccaridi e con diminuito contenuto in polisaccaridi;
- e) allontanare e recuperare detto alcol da detta soluzione arricchita.

Il residuo insolubile separato nella fase b1) viene quindi opzionalmente sottoposto ad una estrazione in alcol o in miscele acqua/alcol ottenendo polifenoli.

Secondo un altro aspetto, oggetto dell'invenzione è un processo per la produzione di zuccheri di seconda generazione da frutta di scarto e/o dallo scarto di lavorazione della frutta che comprende una fase preliminare di lavaggio con acqua di detto scarto, preferibilmente a temperature comprese tra 20 e 40°C, seguita dalle fasi di:

- a2) separare un residuo solido insolubile in acqua da una soluzione acquosa comprendente oligosaccaridi solubili;
- b2) sottoporre detta soluzione acquosa comprendente oligosaccaridi solubili, opzionalmente concentrati, ad una fase di idrolisi in presenza di un enzima in grado di scindere detti oligosaccaridi, ottenendo una soluzione acquosa comprendente monosaccaridi;
- c) concentrare detta soluzione acquosa e aggiungervi almeno un alcol,
- d) raffreddare a temperatura inferiore a 20°C, preferibilmente tra 1 e 10°C, e separare una frazione comprendente pectine da una soluzione arricchita in monosaccaridi e con diminuito contenuto in polisaccaridi;
- e) allontanare e recuperare detto alcol da detta soluzione arricchita.

Il residuo insolubile separato nella fase a2) viene quindi opzionalmente sottoposto ad una estrazione in alcol o in miscele acqua/alcol ottenendo polifenoli.

In tale caso, l'estrazione della componente saccaridica solubile in acqua avviene durante la fase preliminare di lavaggio.

Oggetto dell'invenzione è altresì la composizione di monosaccaridi ottenuta al termine del processo, dopo allontanamento dell'alcol dalla soluzione arricchita in monosaccaridi e a diminuito contenuto in polisaccaridi (ad esempio al termine della fase (e)) ed il suo impiego in processi di trasformazione per via biochimica (e.g. fermentazione operate da batteri, archea o da lieviti) per ottenere poliidrossialcanoati ed intermedi chimici come ad esempio dialcoli (preferibilmente 1,4-butandiolo), monoalcoli, idrossiacidi, diacidi e aminoacidi.

Secondo un aspetto particolarmente vantaggioso dell'invenzione in cui lo scarto della lavorazione di frutta è lo scarto della lavorazione del succo di mela, lo step di idrolisi enzimatica permette di ottenere, al termine del processo, una composizione zuccherina comprendente prevalentemente, o preferibilmente costituita da, glucosio e fruttosio.

Applicando il processo della presente domanda ad esempio agli scarti di spremitura dei frutti di *Malus communis* (mele) e preferibilmente di mele della varietà Golden Delicious, si ottiene in particolare una composizione di monosaccaridi caratterizzata da un rapporto in peso tra fruttosio e glucosio compreso tra 3:1 e 1:1, preferibilmente tra 3:1 e 2:1 e più preferibilmente tra 2,7:1 e 2,4:1, ed una viscosità cinematica, misurata ad una concentrazione di monosaccaridi di 700 g/L, inferiore o uguale a 50 cSt, preferibilmente inferiore o uguale a 40 cSt e vantaggiosamente da 20 a 40 cSt. Tale composizione risulta sorprendentemente adatta all'impiego come componente del terreno o mezzo di coltura in processi fermentativi a carico di microorganismi dotati di almeno una via metabolica per la sintesi di 1,4-butandiolo, preferibilmente appartenenti alla specie *Escherichia coli*.

La presente invenzione riguarda pertanto anche una composizione di monosaccaridi caratterizzata da un rapporto in peso tra fruttosio e glucosio da 3:1 a 1:1, preferibilmente da 3:1 a 2:1 e ancora più preferibilmente da 2,7:1:1 a 2,4:1 ed una viscosità cinematica inferiore o uguale a 50 cSt ad una concentrazione di monosaccaridi di 700 g/L, ed il suo uso in processi fermentativi, in particolare in processi fermentativi per la produzione di dioli come il bio-butandiolo, poliidrossialcanoati (PHA), acidi dicarbossilici (C4-C20). Un esempio sono i processi fermentativi a carico di microorganismi dotati di almeno una via metabolica per la sintesi di 1,4-butandiolo, preferibilmente appartenenti alla specie *Escherichia coli*.

Il processo secondo l'invenzione verrà di seguito descritto con maggiore dettaglio.

Il materiale di partenza alimentato al processo è costituito da frutta di scarto e/o scarti della lavorazione della frutta. Per frutta di scarto si intendono i sottoprodotti derivanti dalla produzione primaria della frutta e la frutta non idonea alla commercializzazione (e.g. separata in seguito a cernita manuale o automatizzata nelle fasi di raccolta, stoccaggio, trasporto, manipolazioni e vendita) o scartata in seguito al consumo.

Gli scarti di lavorazione della frutta includono ad esempio semilavorati e residui da operazioni industriali e semi-industriali di spremitura, congelamento, inscatolamento, disidratazione. Sono preferiti gli scarti derivanti da lavorazioni che richiedono l'impiego di temperature inferiori ai 100°C e più preferibilmente inferiori a 60°C, vantaggiosamente inferiori a 50°C. Tra gli scarti di lavorazione della frutta risulta particolarmente vantaggioso l'impiego del residuo di spremitura della frutta per la produzione di succhi di frutta, in particolare il residuo di

spremitura di uno o più frutti scelti tra mela, pera, albicocca, pesca, ciliegia, prugna, mirtilli, lamponi, more, ribes, uva, kiwi, ananas, melograno, arancia, limone, pompelmo. Il residuo di spremitura delle mele è particolarmente preferito.

Detto scarto è tipicamente composto da acqua (75-80% circa) e sostanza secca (20-25% circa) ed è generato dal pericarpo (mesocarpo, epicarpo e endocarpo), semi e steli. La sua composizione è correlata alla specie e alla lavorazione. I suoi solidi solubili totali includono glucosio, fruttosio e saccarosio; il contenuto di fibre è variabile e comprende cellulosa, lignina, pectina ed emicellulosa. Ulteriori componenti minoritari sono proteine, lipidi e ceneri.

Prima dell'alimentazione al processo dell'invenzione, detto scarto è preferibilmente sottoposto ad uno o più trattamenti preliminari volti a ridurne la pezzatura, ad esempio uno o più trattamenti scelti tra comminuzione, tritazione, frantumazione, macinazione, vagliatura.

Detto scarto presenta tipicamente una pezzatura disomogenea (preferibilmente inferiore al centimetro) e può essere opzionalmente sottoposto a trattamenti preliminari di omogeneizzazione.

Inoltre, detto scarto può subire uno o più trattamenti di natura chimica o fisica volti a consentirne la stabilizzazione, lo stoccaggio e/o il trasporto. Ad esempio, per evitarne il deterioramento, detto scarto viene sottoposto a uno o più trattamenti quali ad esempio fumigazione, aggiunta di additivi antimicrobici, disidratazione (e.g. essiccamento o liofilizzazione), preferibilmente a temperature tali da evitare imbrunimento (50-60°C) e reazioni di Maillard (90°C).

Nelle fasi iniziale del processo detto materiale di partenza viene messo in contatto con acqua ottenendo una sospensione, in condizioni tali da agevolare il passaggio in soluzione dei saccaridi solubili. Preferibilmente tale operazione viene svolta a temperature inferiori a 65°C, più preferibilmente da 20°C a 55°C, ad esempio in un contenitore dotato di opportuno sistema di agitazione. Quando detta sospensione è ottenuta durante l'idrolisi (fase a1), è preferibile operare a temperature comprese tra 45°C e 55°C; quando invece è ottenuta mediante lavaggio preliminare, è preferibile mantenere temperature inferiori, e.g. comprese tra 20°C e 40°C, con il vantaggio di limitare la diffusione di impurezze nella sospensione e, allo stesso tempo, di preservare il contenuto di sostanze attive polari nel residuo solido separato dalla soluzione acquosa (fase a2).

L'idrolisi effettuata durante la fase a1) o b2) del processo secondo l'invenzione avviene grazie alla presenza di un enzima idrolitico adatto alla degradazione di oligosaccaridi, il quale può essere aggiunto alla sospensione acquosa contenente il materiale di partenza e/o premiscelato all'acqua successivamente utilizzata per ottenere detta sospensione e/o alimentato alla

soluzione acquosa comprendente oligosaccaridi solubili. Detto enzima può essere utilizzato tal quale oppure in forma immobilizzata su di un supporto. In quest'ultimo caso, la fase di idrolisi (b2) è vantaggiosamente effettuata dopo la separazione del residuo insolubile in acqua (a2).

Con il termine “oligosaccaridi” si intende nella presente domanda l’insieme di molecole di natura glucidica costituiti da due, tre o quattro unità di monosaccaridi.

Monosaccaridi sono ad esempio fruttosio, glucosio, galattosio, ramnosio, mannosio. Oligosaccaridi comprendono pertanto ad esempio oligofruttosio e disaccaridi quali saccarosio, maltosio, lattosio, e cellobiosio. Polisaccaridi comprendono invece ad esempio i fruttani (e.g. inulina), amido, cellulosa, ed eteropolisaccaridi come le pectine e l’emicellulosa.

Enzimi idrolitici adatti ad essere impiegati nel presente processo sono le disaccaridasi come maltasi, cellobiasi ed in particolare le invertasi o saccarasi o  $\beta$ -fruttofuranosidasi. Particolarmente vantaggioso risulta l’impiego di invertasi o saccarasi, contenute per esempio in alcuni vegetali come la barbabietola e nel lievito, in grado di scindere i disaccaridi come il saccarosio in glucosio e fruttosio. Possono essere impiegate le invertasi tipicamente utilizzate nell’industria alimentare, per la produzione di prodotti in cui la formazione di cristalli di saccarosio è un fenomeno indesiderato (e.g. produzione di marmellate, canditi, gelati, prodotti a base di cioccolato), che sono ottenute ad esempio da ceppi di lievito, come *Saccharomyces cerevisiae*, o da ceppi di muffa appartenenti alle specie *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Possono essere anche impiegate combinazioni di enzimi.

L’esperto del ramo è in grado di determinare le condizioni di idrolisi ottimali (e.g. quantità di enzima rispetto al peso secco della soluzione o della sospensione, temperatura, tempo e velocità di agitazione) in base alle caratteristiche dello scarto di partenza, degli enzimi e della apparecchiatura selezionata per la realizzazione della fase a) del processo.

L’idrolisi enzimatica può essere effettuata operando in continuo o, in alternativa, tramite mescolamento dello scarto con detti enzimi in presenza d’acqua in un reattore discontinuo.

Secondo un aspetto preferito del processo, ad un reattore dotato di un sistema di agitazione viene alimentato uno scarto di pezzatura media inferiore a 5 mm. Detto scarto è preferibilmente sospeso in acqua ad una concentrazione maggiore di 5% p/v, preferibilmente compresa tra il 5 e il 30% p/v, vantaggiosamente tra il 10 ed il 20% p/v calcolata rispetto al peso secco dello scarto.

Detto enzima è utilizzato in un rapporto preferibilmente compreso tra 1:2000 e 1:15000 in peso, preferibilmente tra 1:5000 e 1:10000 rispetto al peso secco dello scarto, o comunque in quantità tale da garantire la completa idrolisi del saccarosio presente in monosaccaridi.

Le operazioni di estrazione in acqua dei saccaridi solubili e/o idrolisi enzimatica degli oligosaccaridi presenti nella soluzione acquosa possono essere svolte secondo tecniche note all'esperto del ramo.

Il processo si presta tuttavia ad essere attuato applicando una strategia di intensificazione che porti benefici in termini di efficienza energetica e di gestione, costi, qualità, scarti e sicurezza, ad esempio attraverso tecnologie che sfruttino fonti di energia alternative quali microonde, ultrasuoni, campi elettrici.

Secondo una forma di realizzazione preferita del processo, ad esempio, una o più operazioni di estrazione in acqua dei saccaridi solubili e/o di idrolisi enzimatica degli oligosaccaridi presenti nella soluzione acquosa sono vantaggiosamente effettuate sfruttando una tecnologia di intensificazione scelta tra cavitazione idrodinamica, cavitazione ultrasonica e applicazione di campi elettrici pulsati. La separazione del residuo insolubile nella fase a2) o b1) viene effettuata tramite una o più operazioni di decantazione, centrifugazione, filtrazione (microfiltrazione o ultrafiltrazione), o altre tecniche note di separazione solido/liquido. Tali operazioni possono essere uguali o diverse tra loro e possono essere effettuate in serie.

Secondo un aspetto preferito, il processo comprende più operazioni di filtrazione effettuate in serie, vantaggiosamente con cut-off crescente.

Secondo un altro aspetto preferito, il processo comprende nella fase b1) una operazione di ultrafiltrazione per consentire l'eventuale recupero dell'enzima di idrolisi.

Allo scopo di massimizzare il recupero degli zuccheri, il processo comprende una o più operazioni di lavaggio del residuo solido, seguita da separazione solido liquido nelle modalità sopra descritte. Dette operazioni di lavaggio vengono vantaggiosamente effettuate a temperature inferiori a 60°C, preferibilmente inferiori a 50°C, più preferibilmente inferiori a 40°C e ancora più preferibilmente a temperature comprese tra 20 e 35°C (temperatura ambiente).

Le acque di lavaggio vengono riunite alla soluzione acquosa comprendente zuccheri solubili (principalmente monosaccaridi, con eventuali oligosaccaridi residui e/o polisaccaridi solubili). Detta soluzione acquosa viene quindi concentrata nella fase c) del processo, attraverso una o più operazioni che consentono la rimozione di acqua senza comportare un riscaldamento tale da causare deterioramento delle componenti. Dette operazioni sono scelte ad esempio tra evaporazione, osmosi inversa, pervaporazione, preferibilmente evaporazione.

Quando l'estrazione della componente saccaridica solubile in acqua è effettuata durante la fase preliminare di lavaggio, è preferibile concentrare almeno in parte la soluzione acquosa ottenuta comprendente oligomeri solubili prima di alimentarla alla fase di idrolisi enzimatica. Tra la fase

a2) e la fase b) è pertanto preferibile effettuare uno step opzionale di concentrazione secondo le modalità descritte per la fase c); in tale caso, la fase c) può considerarsi opzionale.

Si opera ad esempio sino ad ottenere concentrazioni di monosaccaridi superiori a 300 g/L, preferibilmente superiori a 400 g/L.

Alla composizione concentrata viene quindi aggiunto almeno un alcol, preferibilmente scelto tra monoalcoli alifatici a corta catena (vantaggiosamente C1-C4), e più preferibilmente tra metanolo, etanolo, isopropanolo. L'etanolo è il preferito. Vantaggiosamente si aggiunge etanolo assoluto, preferibilmente in proporzione 1:1 in peso con detta composizione concentrata.

L'aggiunta di alcol determina la precipitazione di strutture ad elevato peso molecolare come pectine, tracce di cellulosa ed emicellulosa eventualmente presenti in soluzione. La precipitazione risulta favorita dal raffreddamento a temperature inferiori a 20°C, preferibilmente inferiore a 10°C, più preferibilmente tra 5°C e 10°C.

Il precipitato viene rimosso mediante una o più operazioni di separazione solido/liquido che possono essere scelte tra centrifugazione, decantazione, filtrazione e quelle in precedenza descritte.

Successivamente la fase liquida, contenente acqua ed alcol, viene concentrata (ad esempio tramite evaporazione) per recuperare l'alcol (fase e), il quale viene vantaggiosamente riutilizzato all'interno del processo. La concentrazione viene effettuata secondo uno dei metodi sopra descritti.

Si opera ad esempio sino ad ottenere concentrazioni di monosaccaridi superiori a 600 g/L, preferibilmente da 650 a 700 g/L.

A parità di concentrazione, la composizione finale così ottenuta presenta una viscosità notevolmente inferiore rispetto a quella misurata prima della precipitazione alcolica. Il processo permette pertanto di ottenere composizioni zuccherine anche più concentrate senza raggiungere viscosità tali da ostacolare il dosaggio in sistemi di fermentazione industriale.

Secondo un aspetto dell'invenzione, la viscosità cinematica della composizione di monosaccaridi ottenuta, misurata ad una concentrazione di monosaccaridi di 700 g/L, è inferiore o uguale a 50 cSt, preferibilmente inferiore o uguale a 40 cSt e vantaggiosamente da 20 a 40 cSt.

Tale viscosità cinematica può essere misurata mediante viscosimetro rotazionale impiegando una girante per fluidi a bassa viscosità e adottando una rampa di agitazione da 5 a 200 rpm per 600 secondi a 30°C.

L'alcol recuperato può essere riutilizzato nella fase d) di precipitazione di pectine o nelle successive operazioni di valorizzazione degli scarti, ad esempio per l'estrazione di sostanze attive dal residuo insolubile separato nelle precedenti fasi del processo.

La fase opzionale di estrazione di sostanze attive dal residuo insolubile separato nelle precedenti fasi del processo (b1 o a2) viene preferibilmente attuata mediante estrazione in alcol o miscele acqua/alcol. Possono essere impiegati in alternativa solventi organici quali ad esempio acetone. Detto residuo insolubile può subire trattamenti preventivi atti a garantirne stabilizzazione, stoccaggio e trasporto. Ad esempio, può essere preventivamente disidratato e/o sottoposto a trattamenti meccanici di comminuzione, e.g. omogeneizzato. Sono comunque preferiti trattamenti che richiedono l'impiego di temperature inferiori ai 100°C e più preferibilmente inferiori a 60°, vantaggiosamente inferiori a 50°C.

Detto alcol è preferibilmente scelto tra monoalcoli alifatici a corta catena (vantaggiosamente C1-C4) e più preferibilmente tra metanolo, etanolo, isopropanolo, aggiunto in proporzione da 1:1 a 1:3 in peso rispetto al residuo.

L'esperto del settore è in grado di individuare le condizioni di estrazione in base alla tecnica utilizzata.

Vantaggiosamente si impiegano etanolo o miscele acqua/etanolo, preferibilmente in rapporti tra da 1:1 a 1:3 in peso rispetto al residuo, più preferibilmente tra 1:1 e 1:1,5 in peso rispetto al residuo.

Tipicamente l'estrazione viene effettuata a temperature inferiori alla temperatura di ebollizione del solvente o prossime ad essa; tuttavia operando in pressione è anche possibile raggiungere temperature superiori, incrementando l'efficienza della estrazione (*Pressurized Liquid Extraction*). Preferibilmente, impiegando un rapporto acqua/etanolo da 1:1 a 1:3 a pressione ambiente (0,1 MPa), la temperatura è compresa tra 70° e 90°, ancora più preferibilmente tra 76 e 85°C.

Sorprendentemente, il processo dell'invenzione non comporta una significativa perdita delle molecole bioattive rispetto alla quantità estraibile direttamente dal materiale di partenza, pur impiegando volumi inferiori di solvente. Si è infatti verificato che l'estratto in etanolo dal residuo insolubile ottenuto secondo il processo della presente invenzione presenta un contenuto in polifenoli totali ed un potere antiossidante confrontabili rispetto all'estratto ottenuto nelle medesime condizioni sull'intero volume dello scarto da lavorazione della frutta.

Il potere antiossidante è determinabile per via spettrofotometrica impiegando un test DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) secondo il metodo descritto in *Journal of Food Engineering* 96 (2010) 134-140, impiegando Trolox metanlico come standard per ottenere una curva di

calibrazione e preparando soluzioni diluite dei campioni e aggiungendo DPPH. Misurata la diminuzione di assorbanza a 551 nm rispetto ad un bianco, si individua la concentrazione di campione estratto necessaria ad ottenere una attività del 50% (IC<sub>50</sub>) e la si confronta con quella di Trolox, esprimendo il potere antiossidante in mg Trolox equivalente/100 g peso secco (mg TE/100 g DW).

Il contenuto in polifenoli totali può essere determinato per via spettrofotometrica, secondo il metodo descritto nel medesimo documento (*Journal of Food Engineering* 96 (2010) 134-140), utilizzando l'acido gallico come riferimento in acqua. Costruita una curva di calibrazione, si determina l'assorbanza a 735 nm del surnatante ottenuto dopo centrifugazione di una miscela di campione (o acido gallico), metanolo, reagente di Folin-Ciocalteau e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. I risultati sono espressi in mg di acido gallico equivalente/100 g di peso secco (mg GAE/100 g DW).

La composizione di monosaccaridi ottenuta al termine del processo, optionalmente dopo essere stata sottoposta ad opportuni trattamenti di purificazione (e.g. per la rimozione di eventuali additivi), viene vantaggiosamente sottoposta a trasformazione per via biochimica (e.g. fermentazione operate da batteri, archea o da lieviti) per ottenere poliidrossialcanoati ed intermedi chimici come ad esempio dialcoli (preferibilmente 1,4-butandiolo), monoalcoli, idrossiacidi, diacidi e amminoacidi.

Detti poliidrossialcanoati (PHA) sono preferibilmente selezionati nel gruppo che consiste in: poli idrossibutirrato, poli idrossibutirrato-valerato, poli idrossibutirrato propanoato, poliidrossibutirrato-esanoato, poli idrossibutirrato-decanoato, poli idrossibutirrato-dodecanoato, poli idrossibutirrato-esadecanoato, poli idrossibutirratoottadecanoato, poli 3-idrossibutirrato 4-idrossibutirrato. Più preferibilmente detti poliidrossialcanoati sono selezionati nel gruppo che consiste in poliidrossibutirrato (PHB), poliidrossibutirrato-valerato (PHBV) e poliidrossibutirrato-esanoato (PHBH).

Detti intermedi chimici sono preferibilmente selezionati nel gruppo che consiste in: dialcoli, quali 1,2-etandiolo, 1,2-propandiolo, 1,3-propandiolo, 1,3-butandiolo, 2,3-butandiolo, 1,4-butandiolo, monoalcoli quali butanolo ed etanolo, idrossiacidi quali acido lattico, diacidi (DCA), quali acidi succinico, glutarico, adipico, muconico, azelaico, sebacico, undecadioico, dodecadioico, brassilico, esadecadioico, octadecadioico, octadecendioico, octadecadienoico, ottadecatrienoico, eicosadioico, docosadioico e furandicarbossilico, amminoacidi quali alanina, arginina, asparagina, cisteina, glicina, glutammmina, istidina, metionina, prolina, tirosina, valina, leucina, isoleucina, acido aspartico e glutammico, lisina, treonina, serina, triptofano e fenilalanina.

Esempi di trasformazione biochimica per la produzione di poliidrossialcanoati sono le fermentazioni operate da batteri appartenenti ai generi *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Haloferax*, *Cupriavidus*, *Protomonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia* e *Leuconostoc*.

Per produrre PHA, la coltura batterica può venire in un primo momento fatta crescere in un terreno di coltura adatto a favorire la produzione di biomassa cellulare e, in un secondo momento, vengono eventualmente cambiate le condizioni di crescita per indurre la sintesi e l'accumulo di PHA, sotto forma di inclusioni intracellulari. La sintesi di PHA è solitamente indotta sottoponendo il microrganismo ad una carenza di macronutrienti quali ad esempio fosforo, azoto e zolfo e contemporaneamente ad un eccesso di fonti di carbonio.

Esempi di trasformazione biochimica per la produzione di intermedi chimici sono la fermentazione operata da batteri (e.g. *E. coli*) o da lieviti oleaginosi come ad esempio quelli appartenenti ai generi *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*. Particolarmente preferiti sono lieviti appartenenti ai generi *Yarrowia* e *Candida*.

Ad esempio, miscele di monosaccaridi possono essere utilizzate da *E. coli* geneticamente modificati con il processo descritto nel brevetto WO 2015/158716 per ottenere 1,4-butandiolo (1,4-BDO).

L'1,4-BDO può essere ottenuto mediante un processo di fermentazione a partire da un terreno di coltura contenente almeno uno zucchero, preferibilmente glucosio e, optionalmente, uno o più zuccheri differenti dal glucosio, in presenza di uno o più microrganismi dotati di almeno una via metabolica per la sintesi di 1,4-BDO.

Nel caso di miscele, queste possono comprendere dal 1 al 99% in peso, preferibilmente dal 15 al 65% in peso di zuccheri di seconda generazione derivanti dal presente processo rispetto al totale degli zuccheri.

Il terreno di coltura può comprendere altre sostanze necessarie per la crescita ed il sostentamento del microrganismo durante la fase di fermentazione, come elementi quali C, H, O, N, K, S, P, Fe, Ca, Co, Mn, Mg. Tipicamente, il terreno di coltura può comprendere uno o più componenti selezionati nel gruppo che consiste di zuccheri differenti dal glucosio, idrolizzati proteici, proteine, aminoacidi, acidi organici, vitamine, sali minerali, estratti di lievito, e microelementi quali ad esempio Cobalto, Calcio e Rame. Cobalto, Calcio e Rame possono essere dosati nel terreno di coltura, ad esempio, come sali quali Cobalto cloruro, Calcio cloruro e Rame cloruro. Generalmente, il terreno di coltura comprende almeno uno zucchero,

generalmente glucosio e, optionalmente, uno o più zuccheri differenti dal glucosio, in concentrazione compresa tra 10 e 100 g/L.

Poiché durante la fermentazione il microrganismo consuma uno o più zuccheri, è generalmente necessario reintegrare detti zuccheri all'interno di un reattore di fermentazione. Detta reintroduzione può essere effettuata con una modalità continua o discontinua, secondo modalità note al tecnico del settore.

Per quanto riguarda eventuali altri componenti del terreno di coltura, il terreno di coltura in genere contiene sali, minerali essenziali, e agenti antischiuma. Il terreno di coltura può essere preparato secondo una qualsiasi modalità nota al tecnico del ramo, ad esempio miscelando tutti i suoi componenti insieme oppure pre-miscelando tutti i componenti con l'esclusione degli zuccheri ed aggiungendo questi ultimi in un secondo momento, singolarmente o già premiscelati a loro volta. È altresì possibile utilizzare come base di partenza un terreno di coltura disponibile in commercio ed opportunamente modificarne la composizione in un secondo momento, per esempio al momento di mettere in contatto il terreno di coltura con il microrganismo.

Le composizioni di monosaccaridi secondo la presente invenzione possono essere anche utilizzate da lieviti oleaginosi appartenenti al genere *Candida* per ottenere diaciidi.

La produzione di diaciidi può essere effettuata mediante fermentazione bifasica, ovvero con una fase di crescita cellulare a biomassa e una successiva fase di produzione. Nella fase iniziale di crescita, le cellule crescono utilizzando come unica fonte di carbonio lo zucchero presente nel terreno di coltura. La successiva fase di produzione di DCA è preferibilmente un processo fedbatch finalizzato a mantenere la biomassa cellulare attiva e cataliticamente performante nel convertire gli acidi grassi a DCA. Vantaggiosamente, questa fase ha una doppia alimentazione: una fonte di zuccheri, volta a mantenere le cellule attive, e una fonte di acidi monocarbossilici o gliceridi di acidi monocarbossilici per la biotrasformazione.

Le composizioni di monosaccaridi secondo la presente invenzione possono essere sottoposte anche a trasformazione per via chimica per la produzione di intermedi chimici. Esempi di trasformazione chimica sono l'isomerizzazione del glucosio a fruttosio e la successiva disidratazione in ambiente acido per ottenere HMF, che a sua volta può essere ossidato ottenendo acido furandicarbossilico e suoi derivati.

Intermedi chimici ottenibili tramite trasformazione degli zuccheri di seconda generazione prodotti attraverso il processo secondo l'invenzione, come ad esempio butandiolo, acido succinico, acido adipico, acido muconico, acido furandicarbossilico, acido tereftalico, acido

levulinico e acido lattico, sono utili come monomeri per la sintesi di polimeri, in particolare di poliesteri.

Il processo verrà di seguito descritto attraverso una esemplificazione non limitativa.

## ESEMPI

### Determinazione del contenuto di monosaccaridi e oligosaccaridi

Il contenuto in monosaccaridi ed oligosaccaridi (disaccaridi, trisaccaridi e tetrasaccaridi) è stato determinato mediante analisi HPLC su una colonna LUNA Omega Sugar 150x30 mm ID, utilizzando come tampone di eluizione Acetonitrile/H<sub>2</sub>O (78/22 %) e rivelatore CAD (Charged Aerosol Detector). La corsa è stata condotta per 15 min a un flusso 0,3 ml/min con eluizione isocratica.

### Determinazione della viscosità

La viscosità cinematica è stata misurata mediante viscosimetro rotazionale (Fungilab Modello PRO) impiegando una girante per fluidi a bassa viscosità (TL5) e adottando una rampa di agitazione da 5 a 200 rpm. L'analisi è stata effettuata per un totale di 600 secondi a 30°C.

### Determinazione del potere antiossidante.

Sono state preparate una soluzione di DPPH (0,048 mg/ml) e diluizioni seriali degli estratti etanolici dei campioni di residuo e di scarto di partenza. 500 µL degli estratti etanolici diluiti sono stati aggiunti a 500 µL di soluzione di DPPH in provette da microcentrifuga. Dopo il vortex, le provette sono state lasciate al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza è stata quindi misurata rispetto all'etanolo a 515 nm, in cuvette di polipropilene da 1 ml utilizzando uno spettrofotometro. E' stata quindi calcolata la diminuzione dell'assorbanza di un campione rispetto a un bianco (500 µL di metanolo e 500 µL di DPPH). La diminuzione relativa dell'assorbanza (PI) è stata quindi calcolata come segue: PI (%) = 1 - (Ae/Ab), con Ae = assorbanza dell'estratto del campione e Ab = assorbanza del bianco.

L'attività antiossidante è stata definita come la concentrazione dell'estratto del campione necessaria per ottenere un'attività del 50% (IC<sub>50</sub>). In tutti gli esperimenti è stata determinata anche la IC<sub>50</sub> di Trolox. Il valore finale dell'attività antiossidante è stato determinato utilizzando la seguente equazione: attività antiossidante = (IC<sub>50</sub>Trolox/IC<sub>50</sub>campione) x 10<sup>5</sup>. L'attività antiossidante è stata espressa in mg Trolox equivalente per 100 g di campione di peso secco.

### Determinazione della quantità totale di polifenoli

Il contenuto fenolico totale è stato valutato utilizzando una versione modificata del saggio Folin-Ciocalteu utilizzando l'acido gallico come standard per costruire una curva di calibrazione. Per l'analisi, 100 µL di estratto del campione o standard di acido gallico, 100 µL

di metanolo, 100 µL di reagente Folin-Ciocalteu e 700 µL di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (soluzione acquosa al 7%) sono stati introdotti in una provetta da microcentrifuga. I campioni sono stati immediatamente vortexati e le provette sono state incubate al buio per 20 minuti a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione tutti i campioni sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 3 min. L'assorbanza del surnatante è stata quindi misurata a 735 nm in cuvette di polipropilene da 1 ml utilizzando uno spettrofotometro. I risultati sono stati espressi in mg di acido gallico equivalente/100 g di peso secco (mg GAE/100 g DW).

#### Esempio 1

##### Fase a1)

2,0 Kg di scarto derivante dalla spremitura delle mele per la produzione dei succhi di frutta essiccato (96% in peso di sostanza secca) sono stati posti in un incubatore agitante insieme ad acqua sino ad ottenere una sospensione avente 10% p/v di sostanza secca.

Alla sospensione acquosa è stato aggiunto l'enzima Invertasi (Sigma Aldrich, I4504) in rapporto di 1 a 10000 in peso rispetto alla sostanza secca. La miscela è stata mantenuta a 55°C e 100 rpm per 2 ore, allo scopo di portare in soluzione gli zuccheri solubili ed idrolizzare il saccarosio presente in soluzione.

##### Fase b1)

La miscela acquosa è stata sottoposta a filtrazione mediante filtro a sacco (Filter-Bag avente un cut-off di 1000 µm) per recuperare la fase liquida. Allo scopo di massimizzare il recupero degli zuccheri, la fase solida ottenuta dalla filtrazione è stata risospesa in circa 15 L di acqua e mantenuta a 30°C per circa 1h in agitazione a 100 rpm (secondo lavaggio).

La miscela ottenuta con il secondo lavaggio è stata filtrata su 1000 µm per recuperare la fase liquida, che è stata unita a quella ottenuta in precedenza. Le fasi liquide riunite sono state filtrate impiegando una serie di filter-bags a cut-off crescente secondo la seguente sequenza: 400 µm → 10 µm → 1 µm e successivamente microfiltrate su filtri Sartopore 0,22 µm.

##### Fase c)

La soluzione acquosa contenente monosaccaridi così ottenuta è stata quindi concentrata per evaporazione in evaporatore rotante sino a raggiungere una concentrazione di monosaccaridi di 372 g/L. La soluzione ha una viscosità cinematica di 2300 cSt.

La soluzione acquosa concentrata è poi miscelata con etanolo assoluto in uguale rapporto di peso.

##### Fase d)

La miscela alcolica è stata incubata a 4°C per circa 2h, per favorire l'aggregazione e la precipitazione delle strutture ad alto peso molecolare. E' stata quindi sottoposta a centrifugazione per separare la fase solida dal surnatante, poi concentrato per evaporazione fino a 754 g/L di monosaccaridi, recuperando l'etanolo evaporato. Il recupero dei monosaccaridi nel surnatante ottenuto è  $\geq$  al 90% rispetto al contenuto determinato nella fase c).

La soluzione concentrata presenta una viscosità cinematica di circa 25 cSt, un valore molto inferiore rispetto a quella della fase c) nonostante la concentrazione di monosaccaridi superiore.

#### Esempio 2

1,5 Kg di scarto derivante dalla spremitura delle mele per la produzione dei succhi di frutta essiccato di pezzatura media inferiore a 5 mm sono stati posti in un incubatore agitante insieme ad acqua sino ad ottenere una sospensione avente 10% p/v di sostanza secca.

La sospensione è stata mantenuta a 30°C e 100 rpm per 2 ore, allo scopo di portare in soluzione gli zuccheri solubili.

A seguito di tale lavaggio la sospensione è stata sottoposta a filtrazione mediante una serie di filter-bags a cut-off crescente secondo la seguente sequenza: 1000  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  400  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  10  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  1  $\mu\text{m}$  (Fase a2)

Allo scopo di massimizzare il recupero degli zuccheri, la fase solida ottenuta dalla filtrazione è risospesa in circa 15 L di acqua e mantenuta a 30°C per circa 1h in agitazione a 100 rpm (secondo lavaggio).

La miscela ottenuta con il secondo lavaggio è stata filtrata secondo le modalità sopra descritte per recuperare la fase liquida, che è stata unita a quella ottenuta in precedenza. Le fasi liquide riunite sono state successivamente microfiltrate su filtri Sartopore 0,22  $\mu\text{m}$ .

La fase solida (residuo solido insolubile) è stata quindi essiccata. 0,5 g di residuo solido insolubile sono stati prelevati e posti in un pallone da 100 ml munito di refrigerante a bolle e sonda per il controllo della temperatura. Successivamente sono stati aggiunti, sotto agitazione magnetica, 50 ml di una soluzione acquosa di etanolo al 56% v/v.

Raggiunta la temperatura di 80°C il sistema è stato lasciato in agitazione per 30 minuti. Trascorso questo periodo di tempo la miscela è stata raffreddata in un bagno a ghiaccio e successivamente filtrata per recuperare la frazione etanolica come una soluzione limpida.

L'analisi dell'estratto (dopo opportuna diluizione in etanolo) ha rivelato un contenuto di polifenoli totali, espresso come mg di acido gallico equivalente su 100 g di estratto secco, di 6282 mg GAE/100 g estratto, contro i 2766 mg GAE/100 g estratto ottenuto ripetendo l'estrazione nelle stesse condizioni direttamente su un campione di scarto prima della alimentazione al processo.

Rapportando il contenuto di polifenoli alla percentuale di estratto etanolico rispetto al peso secco iniziale (rispettivamente 20% e 52% in peso), si ottengono 1256 mg GAE/100g di residuo solido insolubile e 1438 mg GAE/100g di scarto.

Il potere antiossidante dell'estratto, espresso come mg di TROLOX equivalente su 100 g di estratto secco, è risultato pari a 4694 mg TE/100 g estratto, contro i 2478 mg TE/100 g estratto ottenuto ripetendo l'estrazione nelle stesse condizioni direttamente su un campione di scarto prima della alimentazione al processo.

## RIVENDICAZIONI

1. Processo per la produzione di zuccheri di seconda generazione da frutta di scarto e/o da scarti di lavorazione della frutta che comprende l'estrazione in acqua dei saccaridi solubili presenti in detti scarti, separando un residuo insolubile da una soluzione aquosa, l'idrolisi enzimatica degli oligosaccaridi presenti nella soluzione aquosa e la successiva separazione di composti saccaridici ad elevato peso molecolare (pectine) da detta soluzione aquosa mediante precipitazione alcolica.
2. Processo per la produzione di zuccheri di seconda generazione da frutta di scarto e/o dallo scarto di lavorazione della frutta secondo la rivendicazione 1 che comprende le fasi di:
  - a1) sottoporre detto scarto ad una fase di idrolisi in presenza di acqua e di un enzima in grado di scinderne gli oligosaccaridi solubili, ottenendo una miscela aquosa comprendente monosaccaridi;
  - b1) separare da detta miscela un residuo insolubile in acqua, ottenendo una soluzione aquosa comprendente monosaccaridi;
  - c) concentrare detta soluzione aquosa e aggiungervi un alcol;
  - d) raffreddare a temperatura inferiore a 20°C e separare una frazione comprendente pectine da una soluzione arricchita in monosaccaridi e con diminuito contenuto in polisaccaridi;
  - e) allontanare e recuperare detto alcol da detta soluzione arricchita.
3. Processo per la produzione di zuccheri di seconda generazione da frutta di scarto e/o dallo scarto di lavorazione della frutta secondo la rivendicazione 1 che comprende una fase preliminare di lavaggio con acqua di detto scarto, preferibilmente a temperature comprese tra 20 e 40°C, seguita dalle fasi di:
  - a2) separare un residuo solido insolubile in acqua da una soluzione aquosa comprendente oligosaccaridi solubili;
  - b2) sottoporre detta soluzione aquosa comprendente oligosaccaridi solubili ad una fase di idrolisi in presenza di un enzima in grado di scindere detti oligosaccaridi, ottenendo una soluzione aquosa comprendente monosaccaridi;
  - c) concentrare detta soluzione aquosa e aggiungervi un alcol,
  - d) raffreddare a temperatura inferiore a 20°C e separare una frazione comprendente pectine da una soluzione arricchita in monosaccaridi e con diminuito contenuto in polisaccaridi;
  - e) allontanare e recuperare detto alcol da detta soluzione arricchita.

4. Processo secondo una o più delle rivendicazioni 1-3 comprendente una fase di estrazione di polifenoli da detto residuo insolubile separato dalla soluzione acquosa.
5. Processo secondo ciascuna delle rivendicazioni 1-4 in cui detto scarto deriva da lavorazioni che richiedono l'impiego di temperature inferiori ai 100°C e preferibilmente inferiori a 60°C.
6. Processo secondo una o più delle rivendicazioni 1-5 in cui detto scarto è lo scarto di spremitura di uno o più frutti scelti tra mela, pera, albicocca, pesca, ciliegia, prugna, mirtilli, lamponi, more, ribes, uva, kiwi, ananas, melograno, arancia, limone, pompelmo.
7. Processo secondo una o più delle rivendicazioni 1-6 in cui detto scarto è lo scarto di spremitura dei frutti di *Malus communis* (mele) e preferibilmente di mele della varietà Golden Delicious.
8. Processo secondo una o più delle rivendicazioni 1-7 in cui detto scarto è sottoposto ad uno o più trattamenti preliminari scelti tra comminuzione, tritazione, frantumazione, macinazione, vagliatura, omogeneizzazione, disidratazione.
9. Processo secondo uno o più delle rivendicazioni 1-8 in cui detto alcol aggiunto nella fase c) è scelto tra i monoalcoli alifatici di catena C1-C4.
10. Composizione di monosaccaridi caratterizzata da un rapporto in peso tra fruttosio e glucosio da 3:1 a 1:1, preferibilmente da 3:1 a 2:1 e ancora più preferibilmente da 2,7:1 a 2,4:1 ed una viscosità cinematica, misurata ad una concentrazione di monosaccaridi di 700 g/L, inferiore o uguale a 50 cSt.
11. Uso della composizione secondo la rivendicazione 10 come componente del terreno di coltura in processi fermentativi per la produzione di dialcoli, monoalcoli, idrossiacidi, diacidi e aminoacidi.
12. Uso della composizione secondo la rivendicazione 10 come componente del terreno di coltura in processi fermentativi a carico di microorganismi dotati di almeno una via metabolica per la sintesi di 1,4-butandiolo, preferibilmente appartenenti alla specie *Escherichia coli*.