

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902062118A1

Publication Date

20131221

Applicant

CHEMTEX ITALIA S.P.A.

Title

PRODUZIONE DI ENZIMA PER BIOMASSA LIGNO-CELLULOSICA

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Produzione di enzima per biomassa lignocellulosi-
ca",

di: CHEMTEX ITALIA S.p.A., nazionalità italiana,
Strada Ribrocca, 11, 15057 Tortona (AL) (Italia).

Inventori designati: Stefano PARAVISI; Laura VOLPA-
TI; Chiara GIORCELLI; Elisa RACCAGNI; Piero OTTO-
NELLO; Francesco CHERCHI.

Depositata il: 21 giugno 2012

* * * * *

DESCRIZIONE

SFONDO

Gli enzimi sono proteine che catalizzano rea-
zioni biochimiche. Gli enzimi vengono prodotti da
quasi tutte le cellule ospiti viventi. Alcuni enzi-
mi prodotti da microrganismi delle classi dei funghi
sono utili nei procedimenti di conversione di pro-
dotti di partenza ligno-cellulosici a prodotti chi-
mici. In questi procedimenti di conversione, gli
enzimi vengono usati come catalizzatore in reazioni
di idrolisi di zuccheri complessi, come cellulosa ed
emicellulosa, a zuccheri con peso molecolare minore.

È noto che l'idrolisi della cellulosa ed emi-
cellulosa da prodotti di partenza ligno-cellulosici
richiede una miscela ben equilibrata da enzimi co-

FC/dd

stituiti da endoglucanasi, cellobioidrolasi, β -glucosidasi, xilanasi, mannanasi e vari enzimi che agiscono sulle catene laterali di xilani e mannani. La produzione dell'enzima è una fase importante nel procedimento di trasformazione della biomassa in etanolo poiché la produzione dell'enzima oppure della miscela di enzimi e l'impiego sono attualmente tra le fasi più costose del procedimento per le vie a base biologica di utilizzazione della biomassa di lignocellulosa.

I sistemi enzimatici di degradazione della pianta del fungo *Trichoderma reesei* sono i più largamente studiati e si ritiene siano gli organismi più largamente usati per ottenere miscele di enzimi utilizzabili commercialmente. *T. reesei* produce numerosi enzimi capaci di degradare la cellulosa e la emicellulosa anche se la secrezione di β -glucosidasi extracellulare è bassa. Poiché è ben noto che il contenuto di attività di β -glucosidasi è critico per ottenere una elevata conversione di cellulosa, l'enzima *T. reesei* è comunemente additivato con β -glucosidasi per ottenere una soluzione enzimatica ben equilibrata e fare ulteriormente procedere l'idrolisi della cellulosa. In altri casi enzimi del commercio oppure soluzioni di miscele enzimatiche

possono anche essere ottenuti usando enzimi prodotti da altri funghi, buoni produttori di β -glucosidasi.

Gli enzimi per i procedimenti di conversione dei prodotti di partenza ligno-cellulosici vengono prodotti mediante coltura delle cellule ospiti su mezzi complessi comprendenti cellulosa pura e/oppure anche fonti di carbonio più costose.

Per la riduzione del costo finale della produzione di enzima, sono stati fatti molti tentativi per usare substrati meno costosi della cellulosa pura. Come substrato sono stati impiegati prodotti di partenza ligno-cellulosici pretrattati. Molti gruppi di ricerca hanno tentato di produrre un enzima oppure miscele enzimatiche usando in qualche modo lo stesso prodotto di partenza usato per la produzione del bioetanolo onde ridurre i costi finali della miscela enzimatica.

Tuttavia, non è stata descritta in studi precedenti su *T. reesei* Rut C30 oppure *Penicillium brasilianum*, alcuna relazione chiara tra il substrato usato per la coltura e la prestazione idrolitica degli enzimi risultanti sui particolari substrati. Una panoramica dei risultati ottenuti nella coltura di enzimi su differenti fonti di carbonio

si può trovare in Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. "Characterization of enzyme or enzyme mixtures and hemienzyme or enzyme mixtures produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources", (Process Biochem, 40, 3519-3525) ed in Jorgensen, H., Olsson, L., "Production of enzyme or enzyme mixtures by *Penicillium brasilianum* IBT 20888: Effect of substrate on hydrolytic performance" (Enzyme Microb Technol, 38, 381-390). Un procedimento di questo tipo è descritto in WO2007/005918. Questo procedimento aggiunge il substrato ligno-cellulosico pretrattato descritto come induttore della crescita dell'enzima, mentre usa una aggiunta costante di glucosio come alimentazione per l'organismo cresciuto. Lo scopo indicato per questa tecnologia è quello di sostituire l'alimentazione con glucosio e cellulosa pura attualmente usata per l'enzima oppure per la produzione di miscele enzimatiche, in una cellula ospite, con un materiale che può venire usato come fonte di carbonio principale e come induttore per la produzione enzimatica. Il vantaggio di questo è che il costo di produzione viene ridotto per l'uso di un induttore (biomassa ligno-cellulosica) che è facilmente disponibile e quindi più economico della

cellulosa pura. Come induttore, W02007/005918 utilizza una piccola quantità di biomassa ed aggiunge continuamente glucosio per alimentare l'organismo.

US 7.494.792 descrive un procedimento per la produzione di enzimi cellulolitici e/oppure emicellulolitici che utilizzano il residuo ottenuto dalla fermentazione etanolica di idrolizzati enzimatici di biomassa cellulosica oppure ligno-cellulosica. Il procedimento può venire integrato in un procedimento per la produzione di etanolo da biomassa cellulosica oppure ligno-cellulosica, in cui il residuo serve per la produzione degli enzimi usati nell'idrolisi enzimatica del substrato pretrattato. La soluzione di zucchero ottenuta per la produzione di etanolo dall'idrolisi viene separata dalla frazione solida non idrolizzata, praticamente costituita da lignina e viene usata per la fermentazione etanolica. Il glucosio è lo zucchero principale ottenuto in questa fase. Il residuo della fermentazione etanolica, dopo separazione dell'etanolo, viene usato come fonte di induzione di carbonio oppure come principale fonte di carbonio per la produzione di enzimi.

Come considerazione generale, vi è interesse nella conversione di tutta la frazione oppure la

frazione più rilevante del prodotto di partenza ligno-cellulosico pretrattato in prodotti utili. L'uso di una frazione di prodotto di partenza ligno-cellulosico pretrattato come substrato per la produzione enzimatica può ridurre la resa di un impianto per il procedimento di conversione del prodotto di partenza ligno-cellulosico per ottenere prodotti utili.

Quindi, vi è necessità di sviluppare un procedimento che utilizzi meglio un prodotto di partenza ligno-cellulosico pretrattato per la produzione di enzimi.

SOMMARIO

Nella presente descrizione si divulga un procedimento per la produzione di almeno un enzima da una cellula ospite per l'idrolisi di una prima biomassa ligno-cellulosica pretrattata, detto procedimento comprendendo le fasi di coltivare la cellula ospite che è in grado di produrre almeno un enzima in un ambiente di coltura impoverito di zucchero comprendente la cellula ospite, acqua ed una composizione solida, detta composizione solida comprendendo inoltre uno zucchero complesso della composizione solida ed una lignina della composizione solida. La composizione solida viene ottenuta da una

seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata, comprendente uno zucchero complesso della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata ed una lignina della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata, ed il rapporto tra la quantità totale degli zuccheri complessi della composizione solida e la quantità totale della lignina della composizione solida è superiore a zero ed inferiore al rapporto tra la quantità totale degli zuccheri complessi della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata e la quantità totale della lignina della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata. Dopo coltura, la composizione solida viene convertita ad un residuo solido.

Si descrive pure che la coltura può venire fatta in condizioni impoverite di zucchero semplice con l'aggiunta di una quantità opzionale di zucchero oppure zuccheri semplici compresa nel campo tra 0 e 10% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su base secca per una porzione del tempo di coltura che è di almeno il 50% di tale tempo di coltura.

Si descrive inoltre che la composizione solida può essere ottenuta dalla seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata mediante un procedimento

comprendente le fasi di idrolisi di almeno una frazione della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata in presenza di un primo catalizzatore, per produrre una composizione idrolizzata comprendente la composizione solida ed una soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili; e rimozione di almeno il 50% della soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili dalla composizione idrolizzata.

Si descrive pure che la rimozione di una frazione della composizione idrolizzata può essere fatta con almeno un procedimento compreso nel gruppo di decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, filtrazione a pressione e lavaggio.

Si descrive inoltre che la composizione solida può essere ottenuta dalla seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata mediante un procedimento comprendente le fasi di idrolizzare almeno una frazione della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata in presenza di un primo catalizzatore, per produrre una composizione idrolizzata comprendente zuccheri idrosolubili, zuccheri complessi e lignina; conversione di almeno una frazione degli zuccheri idrosolubili nella composizione idrolizzata in presenza di un secondo catalizzatore per ottene-

re una composizione convertita comprendente almeno un prodotto derivato dallo zucchero, e la composizione solida; e rimuovere una frazione della composizione convertita, detta frazione comprendendo almeno una frazione dell'almeno un prodotto derivato dallo zucchero.

Si descrive pure che la rimozione di una frazione della composizione convertita può venire fatta con almeno un procedimento compreso nel gruppo di decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, filtrazione a pressione, lavaggio, evaporazione e distillazione.

Si descrive inoltre che il primo catalizzatore può comprendere un secondo enzima oppure una miscela enzimatica, e che può venire scelto dal gruppo costituito da ioni idrogeno, acidi organici ed acidi inorganici.

Si descrive pure che la conversione della composizione idrolizzata può comprendere una fermentazione.

Si descrive inoltre che l'almeno un prodotto derivato dallo zucchero possa comprendere etanolo.

Si descrive pure che il secondo catalizzatore può comprendere almeno uno lievito.

Si descrive inoltre che la porzione del tempo

di coltura in condizioni povere di zucchero semplice può venire scelta dal gruppo costituito da almeno il 75% del tempo di coltura, almeno l'85% del tempo di coltura, almeno il 90% del tempo di coltura, almeno il 95% del tempo di coltura ed almeno il 98% del tempo di coltura.

Si descrive pure che la parte del tempo di coltura in condizioni prive di zucchero semplice può essere uguale al tempo di coltura.

Si descrive inoltre che la quantità di zucchero semplice oppure zuccheri semplici opzionalmente aggiunti è nel campo tra 0 e 5% in peso dell'ambiente di coltura povero di zucchero su base secca, da 0 a 2,5% in peso dell'ambiente di coltura povero di zucchero su base secca, da 0 a 2,0% in peso dell'ambiente di coltura povero di zucchero su base secca e da 0 a 1,0% in peso dell'ambiente di coltura povero di zucchero su base secca.

Si descrive pure che non vi può essere una aggiunta opzionale di zucchero semplice nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero.

È stato ulteriormente descritto che almeno il primo enzima viene raccolto mediante separazione dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero in almeno una composizione raccolta, comprendente al-

meno una frazione del primo enzima, ed una composizione esaurita, comprendente almeno una frazione del residuo solido della composizione solida.

È stato pure descritto che l'enzima oppure miscela di enzimi può essere ulteriormente usata per idrolizzare la prima biomassa ligno-cellulosica e la prima biomassa ligno-cellulosica e la seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata comprendono entrambe la biomassa ligno-cellulosica derivata dal gruppo costituito dallo stesso genere di erba o più preferibilmente la stessa specie di erba.

Si descrive inoltre che la prima biomassa ligno-cellulosica può essere pretrattata prima della idrolisi enzimatica.

Si descrive pure l'enzima oppure la miscela di enzimi prodotti secondo il procedimento descritto ed una biomassa ligno-cellulosica idrolizzata che è stata idrolizzata mediante la miscela enzimatica.

Si descrive inoltre che la quantità totale di zuccheri complessi può essere presente in un campo scelto dal gruppo costituito da 0 a 30% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 20% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 15% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 10% in peso della compo-

sizione esaurita su base secca, da 0 a 7,5% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 5% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 2,5% in peso della composizione esaurita su base secca.

Breve descrizione delle figure

La Figura 1a è un grafico della resa di idrolisi del glucosio secondo gli esempi comparativo ed operativo.

La Figura 1b è un grafico della resa di idrolisi dello xilosio secondo gli esempi comparativo ed operativo.

Descrizione dettagliata

È stato scoperto un procedimento per la produzione di enzimi, caratterizzato dal fatto che le cellule ospiti che producono gli enzimi vengono coltivate in un ambiente di coltura impoverito di zucchero. L'ambiente di coltura impoverito di zucchero comprende le cellule ospiti, acqua ed una composizione solida che viene ottenuta da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata; la composizione solida comprende zuccheri complessi e lignina, ed è caratterizzata da un rapporto tra la quantità totale degli zuccheri complessi e la quantità totale della lignina superiore a zero ed inferiore al

rapporto tra la quantità totale degli zuccheri complessi rispetto alla quantità totale della lignina della biomassa ligno-cellulosica pretrattata dalla quale viene derivata. In altre parole, la composizione solida nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero viene ottenuta da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata mediante rimozione di una frazione, ma non tutti, gli zuccheri complessi contenuti nella biomassa ligno-cellulosica pretrattata. La composizione solida nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero ha una quantità inferiore di zuccheri complessi, su base secca, rispetto alla biomassa ligno-cellulosica pretrattata, ma comprende ancora zuccheri complessi.

Gli zuccheri che sono stati rimossi dalla biomassa ligno-cellulosica pretrattata possono essere convertiti a prodotti chimici utili, come etanolo.

Gli enzimi prodotti mediante le cellule ospiti possono quindi venire usati nell'idrolisi della biomassa ligno-cellulosica e della biomassa ligno-cellulosica pretrattata. La cellulosa, emicellulosa e la lignina sono i tre principali polimeri che costituiscono la biomassa ligno-cellulosica. La cellulosa e l'emicellulosa sono zuccheri polimerici.

Nel contesto della presente descrizione, gli

zuccheri semplici sono gli zuccheri monomerici, e possono venire selezionati dal gruppo costituito da glucosio, xilosio, arabinosio, mannosio, galattosio e fruttosio. Si può notare che vi possono essere altri zuccheri semplici non indicati nell'elenco precedente. Gli zuccheri semplici appartengono al gruppo degli zuccheri idrosolubili. Gli zuccheri solubili sono zuccheri i quali, quando si trovano in presenza di un solvente specificato, come acqua, formano una soluzione omogenea nel solvente.

Zuccheri semplici possono alimentare direttamente la cellula ospite, cioè la cellula ospite non richiede l'uso di enzimi per metabolizzare gli zuccheri semplici.

Gli zuccheri oligomeri sono zuccheri polimerici che sono solubili in acqua. Gli zuccheri oligomeri sono costituiti da più di uno zucchero monomerico. Gli zuccheri oligomeri possono venire metabolizzati dalla cellula ospite soltanto in presenza di uno o più enzimi, che vengono normalmente prodotti dalla cellula ospite.

Gli zuccheri complessi sono zuccheri polimerici che non sono solubili in acqua, come glucani e xilani non solubili in acqua. I glucani sono una classe di zuccheri complessi che comprendono mole-

cole polimeriche di glucosio aventi differenti gradi di polimerizzazione. Gli xilani sono una classe di zuccheri complessi che comprendono molecole polimeriche di xilosio aventi un grado differente di polimerizzazione.

Molti procedimenti di conversione di biomasse ligno-cellulosiche in prodotti chimici convertono soltanto una frazione degli zuccheri complessi, e producono una composizione contenente principalmente lignina e la frazione rimanente di zuccheri complessi non convertiti come sottoprodotto. In alcuni casi, anche se è possibile convertire pure gli zuccheri complessi nella biomassa ligno-cellulosica pretrattata, il procedimento di conversione viene bloccato poiché potrebbe essere economicamente non conveniente. La composizione ancora contenente la frazione rimanente di zuccheri complessi viene spesso bruciata per produrre calore, cioè un impiego di scarso valore degli zuccheri contenuti nella biomassa ligno-cellulosica.

Gli inventori hanno sorprendentemente scoperto che le cellule ospiti possono venire coltivate in un ambiente di coltura impoverito di zucchero comprendente una composizione solida ottenuta rimuovendo almeno una frazione di zuccheri complessi da

una biomassa ligno-cellulosica pretrattata e che le cellule ospiti possono usare la frazione rimanente di zuccheri complessi come fonte di carbonio. Gli inventori hanno inoltre scoperto che la produzione di enzimi dalla cellula ospite può essere comparabile oppure accresciuta rispetto alla produzione di enzima ottenuto usando un substrato più costoso come fonte di carbonio.

Gli zuccheri semplici come glucosio e xilosio usati tradizionalmente per alimentare cellule ospiti, possono venire sostituiti parzialmente oppure interamente dalla composizione solida meno costosa.

Preferibilmente, l'ambiente di coltura impoverito di zucchero non contiene, oppure contiene pochi, zuccheri semplici.

Qualsiasi procedimento oppure combinazione di procedimenti noti nella tecnica ed ancora non inventati possono venire usati per ottenere la composizione solida da una seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata. I procedimenti possono comportare l'uso di procedimenti chimici, fisici, biologici oppure combinazioni di tali procedimenti.

Preferibilmente, gli zuccheri complessi vengono rimossi dalla biomassa ligno-cellulosica pretrattata e convertiti in prodotti derivati dallo

zucchero, che sono prodotti chimici utili. Il procedimento di conversione può venire realizzato in una singola fase oppure in più fasi, cioè i prodotti derivati dallo zucchero possono essere ottenuti mediante conversione di zuccheri complessi rimossi a prodotti intermedi.

In una realizzazione preferita, la composizione solida può essere ottenuta idrolizzando almeno una frazione degli zuccheri complessi nella biomassa ligno-cellulosica pretrattata.

L'idrolisi è un procedimento che converte zuccheri complessi in zuccheri idrosolubili e zuccheri oligomeri in zuccheri aventi un peso molecolare inferiore.

L'idrolisi della biomassa pretrattata viene eseguita in presenza di un primo catalizzatore ed eventualmente altri additivi, che possono essere utili oppure necessari affinché l'idrolisi avvenga in modo efficace. Nel contesto della presente invenzione, il primo catalizzatore e l'additivo possono essere indicati come "prima composizione catalitica".

In una realizzazione preferita, la prima composizione catalitica comprende un enzima oppure miscela enzimatica e l'idrolisi è una idrolisi enzi-

matica.

In un'altra realizzazione preferita, l'idrolisi enzimatica viene eseguita secondo il procedimento descritto in WO2010/113130, l'insegnamento della quale è incorporato alla presente nella sua completezza.

Secondo un'altra realizzazione, il primo catalizzatore può comprendere un acido e l'idrolisi è una idrolisi acida. Tutti gli acidi organici ed inorganici in grado di realizzare una idrolisi della seconda biomassa ligno-cellulosica, possono venire usati. L'acido può anche essere presente in soluzioni diluite. Gli ioni idrogeno possono anche venire usati nel procedimento di idrolisi.

L'idrolisi della biomassa ligno-cellulosica pretrattata si può verificare in un ambiente liquido. L'ambiente liquido può essere ottenuto aggiungendo una certa quantità di liquido, preferibilmente acqua oppure comprendente acqua, alla biomassa ligno-cellulosica pretrattata. I liquidi possono anche venire aggiunti nel pretrattamento della biomassa ligno-cellulosica. Per esempio, in una realizzazione preferita, la biomassa ligno-cellulosica viene pretrattata mediante imbibizione della biomassa ligno-cellulosica in un liquido comprendente

acqua e quindi facendo esplodere vapore nella biomassa ligno-cellulosica imbibita. Il liquido può anche venire aggiunto alla fase di idrolisi oppure alla prima composizione catalitica. Nel caso di idrolisi enzimatica, il liquido può essere presente nella soluzione di acido diluito.

Poiché l'idrolisi della biomassa ligno-cellulosica pretrattata si verifica in un ambiente liquido, preferibilmente comprendente acqua, la composizione idrolizzata ottenuta dalla biomassa ligno-cellulosica comprenderà una soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili, ed una composizione solida, comprendente zuccheri complessi che non sono stati idrolizzati a zuccheri solubili. La composizione solida della composizione idrolizzata comprende pure la lignina presente nella biomassa ligno-cellulosica pretrattata. La lignina può anche essere stata modificata e/oppure parzialmente convertita in un altro componente come effetto del pretrattamento e del procedimento di idrolisi.

Anche se la composizione idrolizzata può comprendere altri componenti, per l'oggetto della presente invenzione, la composizione idrolizzata comprende almeno una soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili ed una composizione di solidi compren-

dente zuccheri complessi e lignina della composizione solida.

La composizione solida può essere ottenuta allontanando almeno il 50% della soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili dalla composizione idrolizzata. Si fa notare che, mentre la rimozione della massima quantità di acqua e zuccheri idrosolubili come possibile è una realizzazione preferita, parte degli zuccheri idrosolubili possono ancora rimanere presenti nella composizione solida. In un'altra realizzazione, la composizione solida non comprende gli zuccheri idrosolubili.

La frazione allontanata dalla composizione idrolizzata, comprendente acqua e zuccheri idrosolubili, può comprendere inoltre altri componenti della composizione idrolizzata, come almeno una frazione del primo catalizzatore ed additivi oppure composti che vengono formati durante il pretrattamento oppure durante l'idrolisi. La frazione allontanata può inoltre comprendere una frazione della composizione solida comprendente lignina e zuccheri complessi. In una realizzazione preferita, l'ambiente impoverito di zuccheri comprende sostanzialmente tutte le composizioni solide nella composizione idrolizzata e praticamente tutta la soluzione

di acqua e zuccheri idrosolubili viene allontanata.

In un'altra realizzazione, l'ambiente impoverito di zucchero comprende tutta la composizione solida della composizione idrolizzata e tutta la soluzione di acqua e zuccheri semplici viene rimossa.

Qualsiasi procedimento e combinazione di procedimenti noti nella tecnica ed ancora da inventare può venire usato per separare almeno il 50% della soluzione di acqua e di zuccheri idrosolubili dalla composizione idrolizzata. Questi procedimenti comprendono trattamenti chimici e fisici della composizione idrolizzata. I trattamenti chimici e fisici possono essere realizzati sequenzialmente oppure simultaneamente.

Procedimenti preferiti per rimuovere almeno una frazione della composizione idrolizzata comprendono decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, compresa filtrazione su membrana e filtrazione sotto pressione e lavaggio.

L'idrolisi della almeno una frazione della biomassa ligno-cellulosica pretrattata e la rimozione di almeno il 50% della soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili può verificarsi sequenzialmente oppure in modo almeno parzialmente simulta-

neo. In una realizzazione, almeno una frazione degli zuccheri semplici può venire eliminata, per esempio mediante filtrazione su membrana, mentre l'idrolisi procede.

La composizione solida può essere ulteriormente trattata prima di venire inserita nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero delle cellule ospiti per la produzione di enzimi. La composizione solida può anche venire lavata, preferibilmente con acqua, per rimuovere inoltre gli zuccheri idrosolubili oppure altri componenti che possono influenzare oppure ridurre la produzione degli enzimi. Altri componenti necessari per la coltura delle cellule ospiti possono venire aggiunti nella composizione solida oppure all'ambiente di coltura impoverito di zucchero.

La frazione della soluzione acquosa e degli zuccheri idrosolubili separati dalla composizione idrolizzata, può venire convertita a prodotti chimici utili.

In un'altra realizzazione preferita, la composizione solida può essere ottenuta idrolizzando almeno una frazione degli zuccheri complessi nella biomassa ligno-cellulosica pretrattata in presenza di un primo catalizzatore per produrre una composi-

zione idrolizzata comprendente zuccheri complessi e lignina e la soluzione di acqua e zuccheri idrosolubili; quindi convertendo almeno una frazione degli zuccheri idrosolubili nella composizione idrolizzata in una composizione convertita comprendente almeno un prodotto derivato dallo zucchero ed una composizione solida comprendente zuccheri complessi e lignina; e rimuovendo almeno una frazione del prodotto derivato dallo zucchero dalla composizione convertita.

Tutte le considerazioni sull'idrolisi precedentemente riportate nella presente descrizione valgono anche per la presente realizzazione. La composizione idrolizzata può essere sottoposta ad ulteriore trattamento rimanendo nell'oggetto della invenzione. Per esempio, il procedimento può migliorare la conversione degli zuccheri idrosolubili in prodotti e può comprendere i trattamenti fisici e chimici, come per esempio separazione, purificazione, correzione del pH, diluizione e concentrazione. Gli zuccheri idrosolubili nella composizione idrolizzata vengono convertiti, parzialmente oppure interamente, ad una composizione convertita che comprende almeno un prodotto derivato dallo zucchero. La conversione oppure la modifica di qualsiasi

altro componente della composizione idrolizzata può anche verificarsi durante la conversione degli zuccheri semplici. In particolare, gli zuccheri complessi e la lignina nella composizione idrolizzata possono essere influenzati dal procedimento di conversione per generare una composizione solida comprendente zuccheri complessi e lignina; in altre parole, la composizione solida può essere formata dagli zuccheri complessi e lignina nella composizione idrolizzata oppure una modificazione di zuccheri complessi e lignina nella composizione idrolizzata. La composizione convertita può inoltre comprendere più di un prodotto derivato da zuccheri idrosolubili.

La conversione degli zuccheri idrosolubili si verifica in presenza di un secondo catalizzatore. Il secondo catalizzatore comprende un secondo catalizzatore ed eventualmente altri additivi, che possono essere utili oppure necessari affinché la conversione avvenga efficacemente. Nel contesto della presente invenzione, il secondo catalizzatore e gli additivi possono essere indicati come "seconda composizione catalitica".

Il secondo catalizzatore può essere qualsiasi agente che promuova la conversione di zuccheri i-

drosolubili ad almeno un prodotto derivato dallo zucchero. Il secondo catalizzatore può essere un catalizzatore inorganico, organico oppure biologico.

Anche se qualsiasi procedimento può venire usato per convertire almeno una frazione della composizione idrolizzata, la fermentazione è il procedimento preferito ed il prodotto derivato dallo zucchero è un prodotto fermentato. La fermentazione è qualsiasi procedimento per convertire zuccheri semplici in prodotti fermentati in presenza di un microrganismo oppure di una miscela di microrganismi. Quindi, il secondo catalizzatore può comprendere un microrganismo oppure una miscela di microrganismi.

Un microrganismo preferito per la conversione di almeno una frazione della composizione idrolizzata è uno lievito.

Lo lievito indica comunemente un fungo ascomiceto perlopiù unicellulare che ha normalmente una quantità minima oppure nulla di micelio, si riproduce tipicamente asessualmente mediante germoglio con le cellule figlie che spesso rimangono attaccate e sono in grado di far fermentare i carboidrati ottenendo alcoli e biossido di carbonio. Preferi-

bilmente, lo lievito appartiene al genere *Saccharomyces*. Specie di *Saccharomyces* sono come definiti filogeneticamente da Kurtzman (2003) FEMS Yeast Research 3:417-432, e comprendono *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. ikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* e *S. bayanus*.

A seconda del secondo catalizzatore, si possono ottenere differenti prodotti derivati dallo zucchero. Anche se qualsiasi altro prodotto derivato dallo zucchero può venire prodotto, in una realizzazione preferita il secondo catalizzatore comprende un microrganismo oppure miscela di microrganismi ed il prodotto derivato dallo zucchero è etanolo.

L'idrolisi di zuccheri complessi ad una composizione idrolizzata e la conversione di almeno una frazione degli zuccheri idrosolubili alla composizione idrolizzata di almeno un prodotto derivato dallo zucchero può avvenire sequenzialmente oppure simultaneamente. In una realizzazione preferita, l'idrolisi enzimatica e la fermentazione ad etanolo avvengono simultaneamente ed il procedimento è noto nella tecnica come saccharificazione e fermentazione simultanea.

La conversione di almeno una frazione degli zuccheri idrosolubili a composizione idrolizzata si

può verificare in un ambiente liquido. L'ambiente liquido può essere ottenuto aggiungendo una certa quantità di liquido, preferibilmente acqua oppure comprendente acqua, alla composizione idrolizzata. I liquidi possono anche essere presenti nella composizione idrolizzata oppure nella seconda composizione di catalizzatore.

Poiché la conversione di almeno una frazione degli zuccheri idrosolubili avviene in un ambiente liquido, preferibilmente comprendente acqua, la composizione convertita comprenderà normalmente l'almeno un prodotto derivato dallo zucchero, acqua ed una composizione solida, comprendente zuccheri complessi e lignina. La lignina e gli zuccheri complessi nella composizione idrolizzata possono anche venire modificati e/oppure parzialmente convertiti in altri componenti per effetto dell'idrolisi e del procedimento di conversione. Gli zuccheri idrosolubili che non sono stati convertiti in prodotti possono anche essere compresi nella composizione convertita.

Per l'oggetto della presente invenzione, la composizione convertita comprende almeno un prodotto derivato dallo zucchero ed una composizione solida comprendente zuccheri complessi e lignina. L'almeno un prodotto derivato dallo zucchero può

essere solubile oppure insolubile nella composizione convertita. In una realizzazione preferita, il prodotto derivato dallo zucchero è solubile nella composizione convertita. Per esempio, l'etanolo è solubile nella composizione fermentata. La composizione solida viene ottenuta rimuovendo una frazione della composizione convertita comprendente almeno una frazione del prodotto derivato dallo zucchero. Si fa notare che, sebbene la rimozione della massima quantità del prodotto derivato dallo zucchero, per quanto possibile, sia una realizzazione preferita, parte del prodotto derivato dallo zucchero può ancora essere presente nella composizione solida. In un'altra realizzazione, la composizione solida non comprende prodotto (prodotti) derivato dallo zucchero.

La frazione rimossa dalla composizione convertita può inoltre comprendere altri componenti della composizione stessa, come zuccheri idrosolubili che non sono stati convertiti, acqua, almeno una frazione del secondo catalizzatore ed additivi. Essa può inoltre comprendere una frazione della composizione solida comprendente lignina e zuccheri complessi della composizione convertita. In una realizzazione preferita, l'ambiente impoverito di zuc-

chero comprende sostanzialmente tutta la composizione solida nella composizione convertita e la frazione rimossa dalla composizione convertita comprende sostanzialmente tutti i liquidi della composizione convertita.

In un'altra realizzazione, l'ambiente impoverito di zucchero comprende tutta la composizione solida nella composizione convertita e la frazione rimossa dalla composizione convertita comprende tutti i liquidi della composizione convertita.

Qualsiasi procedimento e qualsiasi combinazione di procedimenti noti nella tecnica ed anche non ancora inventati, possono venire usati per allontanare una frazione di composizione convertita, comprendente l'almeno un prodotto derivato dallo zucchero. Questi procedimenti comprendono trattamenti chimici e fisici della composizione convertita. I trattamenti chimici e fisici possono venire realizzati sequenzialmente oppure simultaneamente.

Procedimenti preferiti per rimuovere almeno una frazione della composizione convertita comprendono decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, compresa filtrazione su membrana e filtrazione a pressione, lavaggio, evaporazione e distillazione.

In una realizzazione preferita, il prodotto convertito è etanolo e la composizione solida viene ottenuta dalla composizione convertita per evaporazione oppure distillazione dell'etanolo e rimozione della frazione principale dei liquidi nella composizione convertita con almeno un procedimento del gruppo scelto tra decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, compresa filtrazione su membrana e filtrazione a pressione e lavaggio.

La conversione degli zuccheri idrosolubili nella composizione idrolizzata ad almeno un prodotto derivato dallo zucchero e la rimozione di una frazione della composizione convertita comprendente almeno una frazione del prodotto convertito può avvenire almeno parzialmente simultaneamente. In una realizzazione, il prodotto convertito è etanolo e può venire eliminato, per esempio, per evaporazione oppure distillazione, mentre gli zuccheri semplici nella composizione idrolizzata vengono fermentati ad etanolo.

In un'altra realizzazione, l'idrolisi della biomassa ligno-cellulosica pretrattata, conversione di almeno una frazione degli zuccheri idrosolubili e rimozione di una frazione della composizione convertita avviene almeno parzialmente simultaneamen-

te. In una realizzazione preferita, il prodotto convertito è etanolo e può venire rimosso, per esempio per evaporazione e distillazione, durante la saccarificazione simultanea e la fermentazione.

La composizione solida può essere ulteriormente trattata prima di venire inserita nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero delle cellule ospiti per la produzione di enzimi. La composizione solida può anche venire lavata, preferibilmente con acqua, per la rimozione di altri zuccheri idrosolubili oppure altri componenti che possono influenzare o ridurre la produzione di enzimi.

Procedimento per la produzione di enzimi

È ben noto nella tecnica il modo di produrre enzimi oppure una miscela di enzimi in una cellula ospite oppure di origine fungale, come funghi filamentosi, oppure di origine batterica. Il procedimento di crescita dell'invenzione può essere un procedimento ben noto, salvo il fatto che l'alimentazione comprende una composizione solida ottenuta da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata ed avente una quantità totale di zuccheri complessi inferiore alla quantità totale di zuccheri complessi nella biomassa ligno-cellulosica pretrattata. In una realizzazione preferita, l'alimentazione di

zuccheri semplici è limitata durante la coltura.

Le procedure di produzione enzimatica sono ben note nella tecnica. Nel contesto della presente invenzione l'enzima oppure miscela di enzimi è preferibilmente un enzima extracellulare oppure miscela di enzimi secreta nell'ambiente di coltura dalla cellula ospite. In alternativa, l'enzima oppure miscela di enzimi è intracellulare.

Una cellula ospite in grado di produrre enzima oppure una miscela di enzimi viene coltivata in condizioni di coltura precise e ad una particolare velocità di crescita. Quando la coltura di cellula ospite viene introdotta nell'ambiente di coltura, la coltura inoculata passa attraverso un certo numero di stadi. Inizialmente la crescita non si verifica. Questo periodo è indicato come fase "lag" e può essere considerato un periodo di adattamento. Durante la fase successiva indicata come "fase esponenziale" la velocità di crescita della coltura di cellula ospite aumenta gradualmente. Dopo un periodo di crescita massima, la crescita cessa e la coltura entra nella fase stazionaria. Dopo un ulteriore periodo di tempo, la coltura entra nella fase morta ed il numero di cellule vitali declina. Quando, nella fase di crescita, l'enzima, oppure misce-

la di enzimi che interessa, viene espressa, dipende dall'enzima che interessa e della cellula ospite. L'enzima oppure miscela di enzimi può, in una realizzazione, venire espressa nella fase esponenziale. In un'altra realizzazione, l'enzima oppure miscela di enzimi può venire prodotto nella fase temporanea tra la fase esponenziale e la fase stazionaria. L'enzima oppure miscela di enzimi può anche, in un'altra realizzazione, venire espressa nella fase stazionaria e/oppure appena prima della sporulazione. L'enzima oppure miscela di enzimi può, secondo l'invenzione, anche venire prodotta in più di una delle fasi summenzionate.

In altre parole, secondo l'invenzione, la cellula ospite viene coltivata in un ambiente adatto ed in condizioni che permettono l'espressione di almeno un enzima oppure miscela di enzimi, preferibilmente secreta ed opzionalmente recuperata. Mentre, come precedentemente indicato, la crescita della cellula ospite ha molte fasi tecniche, per gli scopi della presente descrizione, queste fasi vengono raggruppate nel termine coltura. La coltura delle cellule ospiti avviene in un ambiente di coltura impoverito di zucchero, comprendente una composizione solida ottenuta da una biomassa ligno-

cellulosica pretrattata rimuovendo almeno una frazione degli zuccheri complessi. L'ambiente di coltura impoverito di zucchero può inoltre comprendere un'altra fonte di carbonio, una fonte di azoto ed altri sali ulteriori necessari per il metabolismo dei microrganismi.

Secondo una realizzazione preferita, la presente biomassa ligno-cellulosica pretrattata è stata pretrattata mediante imbibizione/lavaggio e quindi esplosione di vapore come descritto in WO2010/113129, gli insegnamenti del quale sono qui incorporati per riferimento.

Dopo coltura dell'enzima oppure miscela enzimatica, questa può venire opzionalmente recuperata usando procedimenti ben noti nella tecnica. Per esempio, un enzima extracellulare oppure miscela enzimatica può venire recuperata dall'ambiente di coltura impoverito di zucchero il che può venire fatto usando procedure convenzionali comprendenti, senza limitarsi a queste, centrifugazione, filtrazione, estrazione, essiccamento a spruzzo, evaporazione oppure precipitazione. Le procedure per il recupero di un enzima intracellulare oppure miscela enzimatica sono pure ben note nella tecnica.

Almeno nel contesto della presente invenzione

il termine "coltura" indica qualsiasi processo di produzione di un enzima oppure miscela enzimatica usando una coltura di una massa costituita da una o più cellule ospiti. La presente invenzione è utile per la produzione specialmente in scala industriale, per esempio con un ambiente di coltura di almeno 50 litri, preferibilmente almeno 5 litri, più preferibilmente almeno 1 litro.

L'enzima oppure la miscela di enzimi può comprendere, senza essere limitata ad uno qualsiasi di quelli appartenenti al gruppo degli enzimi oppure miscela di enzimi comprendenti endoglucanasi (endo-1,4- β -D-glucanasi), cellobioidrolasi oppure esoglucanasi (eso-1,4- β -D-glucanasi), β -glucosidasi (1,4- β -D-glucosidasi), endo-1,4- β -xilanasi, endo-1,4- β -mannanasi, 1,4- β -xilosidasi e 1,4- β -mannosidasi.

Un procedimento secondo l'invenzione può essere realizzato come carica, carica alimentata, carica ad alimentazione ripetuta oppure un procedimento continuo.

Un procedimento dell'invenzione può venire realizzato aerobicamente oppure anaerobicamente. Alcuni enzimi vengono prodotti mediante coltura sommersa ed alcuni mediante coltura superficiale. La coltura sommersa viene preferita secondo la invenzione.

Così, secondo un aspetto, l'invenzione si riferisce al procedimento per la produzione di un enzima oppure miscela enzimatica in una cellula ospite comprendente la coltura di detta cellula ospite in grado di produrre enzima oppure miscela enzimatica in condizioni che conducono, per la produzione di un enzima oppure miscela enzimatica, come un enzima oppure miscela enzimatica in cui una composizione solida ottenuta da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata viene usata per coltivare la cellula ospite in semplici condizioni povere di zucchero oppure aventi una quantità di zucchero semplice aggiunto opzionalmente oppure di zuccheri nel campo tra 0 e 10% in peso dell'ambiente della coltura impoverito di zucchero su basi secche, per una porzione del tempo di coltura che è almeno il 50% del tempo di coltura.

Il tempo di coltura è la quantità di tempo misurata dall'aggiunta del volume pre-coltura alla cellula ospite dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero alla raccolta, allontanamento oppure separazione dell'enzima oppure della miscela enzimatica dall'ambiente di coltura impoverito di zucchero. Nel caso di più rimozioni, il tempo di coltura termina al punto in cui l'ultima rimozione del

primo enzima oppure della miscela di enzimi è completa.

La quantità della composizione solida ottenuta dalla biomassa ligno-cellulosica pretrattata presente nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero deve essere sufficiente per la crescita della cellula ospite affinché produca l'enzima oppure la miscela enzimatica.

La frase "condizioni impoverite di zucchero semplice" indica generalmente che oltre il 50% in peso della cellula ospite alimentata è priva della composizione solida ottenuta da una seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata e non da zuccheri semplici aggiunti. Un esemplare semplice di condizioni prive di zucchero si ha quando la quantità di zuccheri semplici opzionali aggiunti al procedimento, se ne sono stati aggiunti, si trova nel campo da 0 a 10% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero oppure su una base secca. Più preferibilmente, gli zuccheri semplici opzionali aggiunti debbono essere nel campo da 0 a 5% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su base secca, con da 0 a 2,5% in peso che è ancora più preferito, e con da 0 a 2,0% in peso che è il più preferito (se vengono comunque aggiunti zucche-

ri semplici). Nel migliore dei casi, non vi sono zuccheri semplici aggiunti, il che è la condizione priva di zucchero semplice perfetta. Inoltre, la frase zuccheri semplici aggiunti indica che vi possono essere uno o più zuccheri semplici aggiunti. In una realizzazione lo zucchero semplice opzionale è presente, ma in quantità minore della percentuale indicata.

Le condizioni di carenza di zucchero semplice debbono essere mantenute per almeno una parte del tempo di coltura. Espresse quantitativamente, le condizioni di carenza dello zucchero semplice debbono venire mantenute per almeno il 50% del tempo di coltura, con il 75% essendo più preferito, l'85% ancora più preferito, il 95% ancora più preferito e con la massima preferenza per il 99 ed il 100% del tempo di coltura. Il 100% del tempo di coltura si ha quando la almeno una porzione del tempo di coltura equivale al tempo di coltura.

Il substrato

I substrati della fonte di carbonio comunemente usati per alimentare la produzione di un enzima oppure di una miscela di enzimi comprendono glucosio oppure zuccheri simili, purché il loro consumo rispetto al consumo degli zuccheri complessi rien-

tri entro limiti specificati. I substrati fonte di azoto, stimolatori della crescita e simili possono venire aggiunti per migliorare la coltura e la produzione dell'enzima oppure della miscela di enzimi. Le fonti di azoto comprendono urea, sali di ammonio (per esempio cloruro di ammonio oppure solfato di ammonio) e peptidi. Le proteasi possono venire usate, per esempio, per digerire proteine onde produrre azoto amminico libero (FAN). Tali amminoacidi liberi possono funzionare come nutrienti per la cellula ospite, migliorando in tal modo la crescita e la produzione di enzima oppure miscela di enzimi. Gli stimolatori di coltura preferiti per la crescita comprendono vitamine e minerali. Esempi di vitamine comprendono multivitamine, biotina, pantotenato, acido nicotinico, meso-inositolo, tiammina, piridossina, acido para-amminobenzoico, acido folico, riboflavina e vitamina A, B, C, D ed E. Esempi di minerali comprendono minerali e sali minerali che possono fornire prodotti nutrienti compresi P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn e Cu.

Cellulosa pura, normalmente usata come induttore (e fonte di carbonio) in procedimenti per la produzione di enzima oppure miscela di enzimi, viene sostituita con una composizione solida ottenuta

da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata; la composizione è preferibilmente detossificata se pretrattata con acido, per esempio mediante lavaggio.

La composizione solida è una fonte di carbonio e può venire aggiunta all'ambiente di coltura impoverito di zucchero insieme ad una fonte di carbonio, ma può anche venire aggiunta separatamente dalla fonte di carbonio. Secondo l'invenzione, la composizione solida può venire aggiunta all'ambiente di coltura impoverito di zucchero prima dell'inoculazione, simultaneamente all'inoculazione oppure dopo inoculazione della coltura di cellula ospite in una quantità almeno corrispondente alla quantità di zuccheri complessi disponibili necessari per assicurare la crescita della cellula ospite. Quando la composizione solida viene aggiunta durante il tempo di coltura, un nuovo calcolo della quantità opzionalmente aggiunta di zuccheri semplici oppure rapporto tra zuccheri semplici opzionali e biomassa ligno-cellulosica viene eseguito. Mentre la quantità di zuccheri semplici può non essere stata sufficientemente bassa durante la parte iniziale del tempo di coltura, aggiungendo la composizione solida all'ambiente di coltura impoverito di

zucchero, la quantità di zuccheri semplici opzionali aggiunti potrebbe cadere entro i campi specificati, almeno per il tempo di coltura rimanente.

Un esperto nel settore può facilmente determinare quando aggiungere e quale quantità aggiungere di composizione solida secondo l'invenzione. Durante il procedere del tempo di coltura, la composizione solida viene normalmente consumata dalla cellula ospite e mantenuta nei limiti precedentemente specificati.

Come precedentemente menzionato, la composizione solida viene usata nello stesso modo in cui si usa normalmente il glucosio nei procedimenti di produzione ben noti di un enzima oppure una miscela di enzimi.

Raccolta dell'enzima (enzimi)

Nel procedimento descritto, la composizione solida viene usata per alimentare cellule ospiti nel procedimento di produzione di enzima. La composizione solida viene ottenuta da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata, detta composizione solida comprendendo zuccheri complessi e lignina. Quando le cellule ospiti vengono alimentate mediante zuccheri complessi nella composizione solida, si forma un residuo solido della composizione solida

da almeno una frazione della composizione solida nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero. Il residuo solido comprende almeno una frazione della lignina della composizione solida e può comprendere una frazione degli zuccheri complessi della composizione solida. La lignina può essere stata modificata nella fase di coltura delle cellule ospiti.

Gli enzimi prodotti coltivando le cellule ospiti nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero possono venire raccolti separando l'ambiente di coltura impoverito di zucchero in almeno due frazioni, la composizione raccolta, comprendente almeno una frazione degli enzimi, e la composizione esaurita, comprendente almeno una frazione del residuo solido della composizione solida. Il residuo solido può comprendere la maggior parte delle cellule ospiti.

Con "almeno due frazioni" si intende che l'ambiente di coltura impoverito di zucchero può venire separato in più di due frazioni, questa realizzazione essendo nell'oggetto dell'invenzione.

La composizione raccolta può inoltre comprendere altri componenti dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero, come per esempio acqua ed additivi contenuti nella composizione solida e/oppure

nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero e/oppure aggiunti alla coltura di cellule ospiti. Essa può inoltre comprendere parte della composizione solida e parte del residuo solido. In una realizzazione preferita, la composizione raccolta non contiene, oppure contiene assai pochi, composti solidi. In un'altra realizzazione preferita, la composizione raccolta contiene tutti, oppure quasi tutti, gli enzimi prodotti.

La composizione esaurita comprende almeno una frazione del residuo solido della composizione che può inoltre comprendere altri componenti dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero, come per esempio acqua ed additivi contenuti nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero e/oppure aggiunti nella fase di coltura delle cellule ospiti. Essa può inoltre comprendere alcuni degli enzimi. In una realizzazione preferita, la composizione esaurita non contiene, oppure contiene assai pochi, enzimi. In un'altra realizzazione preferita, la composizione esaurita contiene tutto, oppure quasi tutto, il residuo solido della composizione solida.

Qualsiasi procedimento e combinazione di procedimenti noti nella tecnica ed addirittura ancora da inventare, può venire usato per separare

l'ambiente di coltura impoverito di zucchero in almeno la composizione raccolta e la composizione esaurita. Questi procedimenti comprendono trattamenti chimici e fisici della composizione idrolizzata. I trattamenti chimici e fisici possono venire realizzati sequenzialmente oppure simultaneamente.

Procedimenti preferiti per separare l'ambiente di coltura impoverito di zucchero in almeno la composizione raccolta e la composizione esaurita comprendono almeno un procedimento nel gruppo di centrifugazione, filtrazione, dialisi, lavaggio e filtrazione a pressione.

La composizione raccolta e la composizione esaurita possono venire sottoposte a qualsiasi ulteriore processo che rientri nell'oggetto dell'invenzione. Per esempio, la separazione, purificazione, correzione del pH, diluizione, concentrazione.

Biomassa ligno-cellulosica

In generale, una biomassa ligno-cellulosica naturale oppure presente in natura può venire descritta come segue.

A parte l'amido, i tre costituenti principali della biomassa vegetale sono cellulosa, emicellulosa e lignina, che vengono comunemente indicati con il termine generico di ligno-cellulosa. Le biomasse

contenenti polisaccaridi come termine generico comprendono amido e biomasse ligno-cellulosiche. Quindi, alcuni tipi di prodotti di partenza possono essere biomassa vegetale, biomassa contenente polisaccaride e biomassa ligno-cellulosica.

Le biomasse contenenti il polisaccaride secondo la presente invenzione comprendono qualsiasi prodotto contenente zuccheri polimerici, per esempio sotto forma di amido, nonché amido raffinato, cellulosa ed emicellulosa.

Tipi notevoli di biomasse presenti in natura per derivare l'invenzione rivendicata possono comprendere biomasse provenienti da raccolti agricoli scelti dal gruppo costituito da grani contenenti amido, amido raffinato, insilato di mais, bagassa, paglia, per esempio di riso, frumento, segala, avena, orzo, ravizzone, sorgo; legno tenero, per esempio *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*; legno duro, come *Salix spp.*, *Eucalyptus spp.*; tuberi, per esempio bietole, patate; cereali come per esempio riso, frumento, segale, avena, orzo, ravizzone, sorgo e mais; carta da macero, frazioni di fibre ottenute da trattamento di produzione di biogas, concime, residui ottenuti dal trattamento dell'olio di palma, rifiuti solidi urbani oppure simili. Sebbene

gli esperimenti siano limitati ad alcuni esempi dell'elenco riportato, l'invenzione si ritiene applicabile a tutti poiché la caratterizzazione è principalmente riferita alle caratteristiche uniche della lignina ed all'area superficiale.

Il prodotto di partenza costituito da biomassa ligno-cellulosica usata per ottenere la composizione è preferibilmente proveniente dalle famiglie normalmente chiamate graminacee. Il nome proprio delle famiglie è noto come Poaceae oppure Graminaee nella classe Liliopsida (monocotiledoni) delle piante da fiore. Le piante di questa famiglia sono normalmente chiamate graminacee oppure, per distinguerle da altri graminoidi, graminacee vere. Anche il bambù è incluso. Vi sono circa 600 generi e circa 9.000-10.000 o più specie di graminacee (Kew Index of World Grass Species).

Le Poaceae comprendono i principali rappresentanti di grani e cereali alimentari coltivati al mondo, erbe da prato e da foraggio e bambù. Le Poaceae hanno generalmente steli cavi chiamati culmi, che sono chiusi (solido) ad intervalli denominati *nodi*, i punti lungo il culmo nel quale crescono le foglie. Le foglie delle graminacee sono normalmente alternate, *distiche* (in un piano) oppure raramente

spiraliformi, e con venatura parallela. Ciascuna foglia si differenzia in una guaina inferiore che è molto vicina allo stelo per un certo tratto, ed una lama con margini normalmente interi. Le lame delle foglie delle graminacee sono indurite con fitoliti di silice, che contribuiscono a scoraggiare gli animali da pascolo. In alcune graminacee (come il gladiolo) questo rende i bordi delle lame della graminacea sufficientemente affilati da tagliare la pelle umana. Una appendice membranosa, oppure frangia di peli, denominata ligula, si trova in corrispondenza della giunzione tra la guaina e la lama, impedendo che acqua oppure insetti penetrino nella guaina.

Le lame delle graminacee crescono alla base della lama e non da punte dello stelo allungate. Questo punto di crescita basso si è sviluppato in risposta agli animali da pascolo e permette alle graminacee di venire pascolate oppure falciate regolarmente senza che la pianta venga danneggiata molto.

I fiori delle Poaceae sono disposti in modo caratteristico in *spighette*, ciascuna spighetta avendo uno o più fioretti (le spighette sono inoltre raggruppate in pannocchie oppure spighe). Una spighetta è costituita da due (oppure talvolta meno)

brattee alla base, denominate *glume*, seguite da uno o più fioretti. Un fioretto è formato dal fiore circondato da due brattee denominate *glumetta* inferiore (quella esterna) e *glumetta* superiore (quella interna). I fiori sono normalmente ermafroditi (il mais, monoico, è una eccezione). L'impollinazione è quasi sempre anemofila. Il perianzio è ridotto a due brattee, chiamate *lodicule*, che si espandono e contraggono per espandere la *glumetta* inferiore e la *glumetta* superiore; queste vengono generalmente interpretate come sepali modificati.

Il frutto delle Poaceae è un cariosside, in cui il rivestimento del seme è fuso alla parete del frutto e quindi non separabile da questa (come nel seme del mais).

Vi sono tre classificazioni generali dell'abitudine di crescita presente nelle graminacee: il tipo a grappolo (anche denominato cespitoso), stolonifero e rizomatoso.

Il successo delle graminacee risiede parzialmente nella loro morfologia e nei processi di crescita, ed in parte nella loro diversità fisiologica. La maggior parte delle graminacee si suddivide in due gruppi fisiologici, usando i percorsi fotosintetici C3 e C4 per il fissaggio del carbonio. Le

graminacee C4 hanno un percorso fotosintetico legato all'anatomia della foglia Kranz, specializzata, che le adatta in particolare a climi caldi ed in atmosfera a basso tenore di biossido di carbonio.

Le graminacee C3 vengono indicate come "graminacee della stagione fredda", mentre la piante C4 vengono considerate "graminacee della stagione calda". Esempi di graminacee della stagione fredda annuali sono frumento, segale, fienarola annua (*Poa annua*), ed avena. Esempi di erbe perenni della stagione fredda sono erbe da frutteto (*Dactylis glomerata*), *Festuca* spp., Kentucky Bluegrass e *Lolium perenne*. Esempi di quelle annuali della stagione calda sono mais, *Sorghum bicolor* e miglio perlato. Esempi di perenni della stagione calda sono *Andropogon gerardi*, *Sorghastrum nutans*, gramigna e *Panicum virgatum*.

Una classificazione delle famiglie delle graminacee riconosce dodici sottofamiglie: queste sono: 1) *Anomochlooideae*, una piccola stirpe di graminacee a foglia larga che comprende due generi (*Anomochloa*, *Streptochaeta*); 2) *Pharoideae*, una piccola stirpe di graminacee che comprende tre generi, compresi *Pharus* e *Leptaspis*; 3) *Puelioideae*, una piccola stirpe che comprende il genere africano

Puelia; 4) Pooideae che comprende frumento, orzo, avena, Bronnus e *Calamagrostis*; 5) Bambusoideae che comprende bambù; 6) Ehrhartoideae, che comprende riso, e riso selvatico; 7) Arundinoideae, che comprende la canna gigante e la canna comune; 8) Centothecoideae, una piccola sub-famiglia di 11 generi che è talvolta inclusa nelle Panicoideae; 9) Chloridoideae comprendente *Eragrostis* (circa 350 specie, compreso teff), *Sporobolus* (circa 160 specie), *Eleusine coracana* ((L.) Gaertn.), e *Muhlenbergia* (circa 175 specie); 10) Panicoideae comprendente panico, mais, sorgo, canna da zucchero, la maggior parte dei migli, *Digitaria* ed *Andropogon gerardi*; 11) Micrairoideae e 12) Danthoniodieae comprendente erba della pampa; con *Poa* che è un genere di circa 500 specie di erbe, native delle regioni temperate di entrambi gli emisferi.

Le graminacee agricole coltivate per i loro semi commestibili sono chiamate cereali. Tre cereali comuni sono riso, frumento e mais. Di tutti i raccolti, il 70% è costituito da graminacee.

La canna da zucchero è la fonte principale della produzione di zucchero. Le graminacee vengono usate per costruzione. Impalcature formate da bambù sono in grado di resistere a venti della forza dei

tifoni che possono rompere impalcature in acciaio. I bambù più grandi ed *Arundo donax* hanno culmi robusti che possono venire usati in modo simile al legname, e le radici delle graminacee stabilizzano le zolle erbose di capanne di zolle. *Arundo* viene usato per produrre le ance per strumenti a fiato in legno, ed il bambù viene usato in innumerevoli impieghi.

Un altro prodotto di partenza di origine naturale per biomasse ligno-cellulosiche può essere costituito dalle piante legnose oppure da legnami. Una pianta da legno è una pianta che utilizza il legno come suo tessuto strutturale. Si tratta tipicamente di piante perenni i cui fusti e le radici maggiori sono rinforzati con legno prodotto presso i tessuti vascolari. Il fusto principale, i rami maggiori e le radici di queste piante sono normalmente ricoperti con uno strato di corteccia ispessita. Le piante da legno sono normalmente alberi, arbusti oppure liane. Il legno è un adattamento strutturale cellulare che permette alle piante legnose di far crescere al disopra del terreno i fusti anno dopo anno, rendendo così alcune delle piante da legno le piante più grandi e più alte.

Queste piante necessitano di un sistema vasco-

lare per spostare acqua e prodotti nutrienti dalle radici alle foglie (xilema) e per spostare zuccheri dalle foglie al resto della pianta (floema). Vi sono due tipi di xilema: primario che viene formato durante la crescita primaria del procambio e xilema secondario che viene formato durante la crescita secondaria del procambio vascolare.

Quello che viene normalmente denominato "legno" è lo xilema secondario di tali piante.

I due gruppi principali in cui si può trovare lo xilema secondario sono:

1) conifere (*Coniferae*): vi sono circa 600 specie di conifere. Tutte le specie hanno lo xilema secondario che ha struttura relativamente uniforme in tutto questo gruppo. Molte conifere diventano alberi alti: lo xilema secondario di tali alberi è commercializzato come legno dolce;

2) angiosperme (*Angiospermae*): vi sono circa da 250.000 a 400.000 specie di angiosperme. In questo gruppo lo xilema secondario non si trova nelle monocotiledoni (per esempio *Poaceae*). Molte angiosperme non monocotiledoni diventano alberi, e lo xilema secondario di queste è commercializzato come legno duro.

Il termine "legno dolce" viene usato per de-

scrivere legno ottenuto da alberi che appartengono alle gimnosperme. Le gimnosperme sono piante con semi nudi non racchiusi in un ovaio. Questi "frutti" di semi sono considerati più primitivi dei legni duri. Gli alberi a legno dolce sono normalmente sempreverdi, producono pigne ed hanno foglie aghiformi oppure tipo brattea. Essi comprendono le specie delle conifere, come pino, abete rosso, abete e cedro. La durezza del legno viene da una specie di conifera all'altra.

Il termine "legno duro" (legno di latifoglia) viene usato per descrivere legno proveniente da alberi che appartengono alla famiglia delle angiosperme. Le angiosperme sono piante con ovuli racchiusi per la protezione in un ovaio. Quando vengono fertilizzati, questi ovuli si sviluppano formando semi. Gli alberi di legno duro sono normalmente a foglia larga; a latitudini temperate e boreali essi sono perlopiù decidui, ma in zone tropicali e subtropicali sono perlopiù sempre verdi. Queste foglie possono essere semplici (a lama singola) oppure possono essere composite con foglioline attaccate allo stelo della foglia. Sebbene di forma variabile, tutte le foglie di legno duro hanno un reticolo distinto di fini vene. Le piante di legno duro

comprendono per esempio pioppo tremulo, betulla, ciliegio, acero, quercia e tek.

Quindi, una biomassa ligno-cellulosica preferita di origine naturale, può venire scelta dal gruppo costituito da graminacee e da legni. Un'altra biomassa ligno-cellulosica preferita di origine naturale può venire scelta dal gruppo costituito dalle piante che appartengono alle conifere, angiosperme, Poaceae e relative famiglie. Un'altra biomassa ligno-cellulosica naturale preferita può essere la biomassa avente almeno il 10% in peso della sua sostanza secca in forma di cellulosa, o più preferibilmente almeno il 5% in peso della sua sostanza secca in forma di cellulosa.

Pre-trattamento

Secondo l'invenzione la biomassa ligno-cellulosica viene pretrattata. Il termine "pretrattata" può venire sostituito con il termine "trattata". Tuttavia, le tecniche preferite previste sono quelle ben note del "pre-trattamento" della biomassa ligno-cellulosica come verrà descritto in seguito.

Come precedentemente menzionato, il trattamento oppure pre-trattamento può essere eseguito usando procedimenti convenzionali noti nella tecnica, che promuovono la separazione e/oppure il rilascio

di cellulosa ed accresciuta accessibilità alla cellulosa dalla biomassa ligno-cellulosica.

Le tecniche di pre-trattamento sono ben note nel campo e comprendono un pre-trattamento fisico, chimico e biologico, oppure qualsiasi loro combinazione. In realizzazioni preferite, il pre-trattamento della biomassa ligno-cellulosica viene eseguito in modo discontinuo oppure con un procedimento continuo.

Le tecniche di pre-trattamento fisico comprendono vari tipi di macinazione/sminuzzamento (riduzione della dimensione delle particelle), irradiazione, trattamento con vapore/esplosione di vapore, ed idrotermolisi, nella realizzazione preferita, imbibizione, rimozione dei solidi dal liquido, esplosione di vapore dei solidi per creare la biomassa ligno-cellulosica pretrattata.

Lo sminuzzamento comprende sminuzzamento a secco, ad umido e macinazione a sfere con vibrazione. Preferibilmente, il pre-trattamento fisico richiede l'uso di alta pressione e/oppure alta temperatura (esplosione di vapore). Nel contesto dell'invenzione, l'alta pressione comprende una pressione nel campo da 3 a 6 MPa, preferibilmente 3,1 MPa. Nel contesto dell'invenzione, l'elevata temperatura

comprende temperature nel campo tra circa 100 e 300°C, preferibilmente da circa 160 a 235°C. In una realizzazione specifica l'impregnazione viene eseguita ad una pressione di circa 3,1 MPa e ad una temperatura di circa 235°C. In una realizzazione preferita, il pre-trattamento fisico viene eseguito secondo il procedimento descritto in WO2010/113129, tutti gli insegnamenti del quale sono incorporati alla presente per riferimento.

Sebbene non siano necessarie oppure preferite, le tecniche di pre-trattamento chimico comprendono acido, acido diluito, base, solvente organico, calce, ammoniaca, biossido di zolfo, biossido di carbonio, idrotermolisi controllata da pH, ossidazione ad umido e trattamento con solvente.

Se il procedimento di trattamento chimico è un procedimento acido, esso è più preferibilmente eseguito con acido diluito oppure comunque con una acidità moderata, come trattamento con acido solforico oppure un altro acido organico, acido acetico, acido citrico, acido tartarico, acido succinico oppure qualsiasi loro miscela. Altri acidi possono anche venire usati. Il trattamento con acido moderato indica, almeno nel contesto dell'invenzione, che il pH del trattamento si trova nel campo da 1 a

5, preferibilmente da 1 a 3.

In una realizzazione specifica la concentrazione di acido è nel campo tra 0,1 e 2,0% in peso, preferibilmente si impiega acido solforico. L'acido viene miscelato oppure portato a contatto con la biomassa ligno-cellulosica e la miscela viene mantenuta ad una temperatura nel campo di circa 160-220°C per un tempo variabile da minuti a secondi. Specificamente, le condizioni di pre-trattamento possono essere le seguenti: 165-183°C, 3-12 minuti, concentrazione dell'acido 0,5-1,4% (peso/peso), concentrazione totale di solidi 15-25%, preferibilmente attorno al 20% (peso/peso). Altri procedimenti previsti sono descritti nei Brevetti US n. 4.880.473, 5.366.558, 5.188.673, 5.705.369 e 6.228.177.

Le tecniche di ossidazione ad umido comportano l'uso di agenti ossidanti come agenti ossidanti a base di solfito e simili. Esempi di trattamenti con solvente comprendono trattamento con DMSO (dimetilsolfossido) e simili. I procedimenti di trattamento chimico vengono generalmente eseguiti per un tempo da circa 5 a circa 10 minuti, ma possono anche essere eseguiti in periodi di tempo più brevi o più lunghi.

Le tecniche di pre-trattamento biologico comprendono l'aggiunta di microrganismi solubilizzanti della lignina (si veda, per esempio, Hsu, T.A., 1996, Pre-treatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212; Ghosh, P., and Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of ligno-cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39:295-333; McMillan, J.D., 1994, Pretreating ligno-cellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M.E., Baker, J.O., and Overend, R.P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, D.C., chapter 15; Gong, C.S., Cao, N.J., Du, J., and Tsao, G.T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65:207-241; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of ligno-cellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18:312-331; and Vallander, L., and Eriksson, K.E.L., 1990, Production of ethanol from ligno-cellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.

42:63-95).

In una realizzazione viene eseguito sia il pre-trattamento chimico che il pre-trattamento fisico comprendente, per esempio, trattamento con acido moderato e trattamento ad alta temperatura e pressione. Il trattamento chimico e fisico può essere eseguito sequenzialmente oppure simultaneamente.

In una realizzazione preferita il pre-trattamento viene eseguito come una fase di imbibizione con acqua a temperatura superiore a 1°C, rimozione della biomassa ligno-cellulosica dall'acqua, seguita da una fase di esplosione di vapore.

In una realizzazione preferita la biomassa ligno-cellulosica pretrattata è costituita da zuccheri complessi, pure noti come glucani e xilani (cellulosa ed emicellulosa) e lignina.

Enzima oppure miscela di enzimi

Un enzima oppure miscela di enzimi indica un enzima cellulolitico oppure miscela di enzimi in grado di degradare la biomassa ligno-cellulosica. Un enzima oppure miscela di enzimi prodotti secondo il procedimento descritto può essere di qualsiasi origine, compresa origine batterica oppure fungale. Sono incluse varianti modificate chimicamente oppu-

re varianti con proteina manipolata. Enzimi adatti oppure miscele di enzimi adatte comprendono enzima oppure miscele di enzimi delle famiglie generali *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Thermobifida* e *Trichoderma*, per esempio un enzima fungale o miscele di enzimi prodotti da *Humicola insolens*, *Thermobifida fusca*, *Cellulomonas fimi*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris*, *Fusarium oxysporum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium decumbens* e *Trichoderma reesei*.

In una realizzazione, l'enzima oppure miscela di enzimi prodotta è un enzima oppure miscela di enzimi complessa omologa alla cellula ospite. In una realizzazione, l'enzima oppure miscela di enzimi prodotta è un enzima oppure miscela di enzimi complessa omologa ad una cellula ospite del genere *Penicillium*, preferibilmente del ceppo *Penicillium decumbens*.

Si comprenderà che l'enzima oppure miscela di enzimi prodotta può anche essere un enzima monocomponente oppure una miscela enzimatica, comprendere per esempio una endoglucanasi, eso-cellobioidrolasi, glucoiidrolasi, oppure beta-glucosidasi prodotta in modo ricombinante in una cellula ospite adatta.

L'enzima oppure miscela di enzimi può anche comprendere altri enzimi oppure classi di enzimi prodotti in cellule ricombinanti che sfruttano almeno una parte della regione di codifica degli enzimi precedentemente elencati, comprese le regioni di regolazione e/oppure promozione come noto nella tecnica. Cellule ospiti adatte sono descritte ulteriormente in seguito.

L'enzima oppure miscela di enzimi prodotta può anche essere una preparazione di enzima oppure miscela di enzimi in cui uno o più enzimi omologhi oppure componenti della miscela di enzima vengono cancellati oppure inattivati dalla cellula ospite che produce all'origine l'enzima oppure la miscela di enzimi.

Cellule ospiti in grado di produrre un enzima o miscela di enzima

La cellula ospite può essere di qualsiasi origine. Come precedentemente menzionato, l'enzima oppure miscela di enzimi può essere omologo oppure eterologo alla cellula ospite in grado di produrre l'enzima oppure miscela di enzimi.

L'espressione "cellula ospite ricombinante", come usata in questa sede, indica una cellula ospite che contiene il gene (geni) che codificano l'en-

zima oppure la miscela di enzimi ed è in grado di esprimere detto gene (geni) per produrre enzima oppure miscela di enzimi, in cui il gene (geni) che codificano l'enzima oppure la miscela di enzimi sono stati trasformati, transfettati, tradotti oppure simili nella cellula ospite. La trasformazione, transfezione, traduzione oppure tecniche simili usate possono essere ben note nel campo. In una realizzazione preferita il gene viene integrato nel genoma della cellula ospite ricombinante in una o più copie.

Quando l'enzima oppure miscela di enzimi è eterologo, la cellula ospite ricombinante in grado di produrre l'enzima oppure la miscela di enzimi è preferibilmente di origine fungale oppure batterica. La scelta della cellula ospite ricombinante sarà perlopiù dipendente dal gene (geni) codificante per l'enzima oppure la miscela di enzimi e l'origine dell'enzima oppure miscela di enzimi.

L'espressione "cellula ospite di tipo selvatico", come usata in questa sede, si riferisce ad una cellula ospite che all'origine contiene il gene (geni) codificanti l'enzima oppure miscela di enzimi ed è in grado di esprimere detto gene (geni). Quando l'enzima oppure miscela di enzimi è una pre-

parazione omologa oppure enzima oppure miscela complessa di enzimi, la cellula ospite di tipo selvatico oppure suo mutante in grado di produrre l'enzima oppure miscela di enzimi è preferibilmente di origine fungale oppure batterica.

Un "suo mutante" può essere una cellula ospite di tipo selvatico in cui uno o più geni sono stati cancellati oppure inattivati, per esempio allo scopo di arricchire la preparazione di enzima oppure miscela di enzimi in un terzo componente. Una cellula ospite mutante può anche essere una cellula ospite di tipo selvatico trasformata con uno o più altri geni che codificano altri enzimi oppure proteine per introdurre una o più ulteriori attività enzimatiche oppure altra attività nell'enzima oppure miscela complessa di enzimi oppure preparazione prodotta all'origine dalla cellula ospite di tipo selvatico. L'ulteriore enzima (enzimi) può avere la stessa attività (per esempio una attività di enzima oppure miscela di enzimi) oppure semplicemente essere un'altra molecola enzimatica, per esempio con proprietà differenti. La cellula ospite di tipo selvatico mutante può anche avere altri geni codificanti l'enzima omologo trasformati, transfettati, tradotti oppure simili, preferibilmente integrati

nel genoma, per aumentare l'espressione di tale gene per produrre una quantità maggiore di enzima.

In una realizzazione preferita, la cellula ospite di tipo ricombinante oppure selvatico è originata da un fungo filamentoso. Esempi di cellule ospiti comprendono quelle scelte dal gruppo comprendente *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* oppure *Trichoderma*.

In una realizzazione più preferita, la cellula ospite fungale filamentosa viene scelta dal gruppo comprendente un ceppo di *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. In una realizzazione ancora più preferita, il ceppo è *Penicillium decumbens*.

In un'altra realizzazione preferita la cellula ospite fungale filamentosa è un ceppo di *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crook-*

wellense, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* oppure *Fusarium venenatum*. In un'altra realizzazione preferita, la cellula ospite fungale filamentosa viene scelta dal gruppo comprendente un ceppo di *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium lucknowense*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium decumbens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* oppure *Trichoderma viride*.

In un'altra realizzazione preferita, la cellula ospite ricombinante oppure di tipo selvatico è

di origine batterica. Esempi di cellule ospiti comprendono quelle scelte dal gruppo comprendente batteri gram-positivi come un ceppo di *Bacillus*, quali *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; oppure un ceppo di *Streptomyces*, per esempio *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; oppure da un batterio gram-negativo, come *E. coli* oppure *Pseudomonas sp.*

Idrolisi

La biomassa conterrà alcuni composti che sono idrolizzabili in una specie idrosolubile ottenibile dall'idrolisi della biomassa. In caso di specie idrolizzata idrosolubile di cellulosa, la cellulosa può venire idrolizzata a glucosio, cellobiosio e polimeri di glucosio superiori ed include dimeri ed oligomeri. Così parte delle specie idrolizzate idrosolubili di cellulosa sono glucosio, cellobiosio e polimeri di glucosio superiori e comprendono i rispettivi dimeri ed oligomeri. La cellulosa viene idrolizzata a glucosio mediante le cellulasi carboidrolitiche. Quindi, le cellulasi carboidroliti-

che sono esempi di catalizzatori per l'idrolisi della cellulosa.

La conoscenza prevalente del sistema cellulolitico divide le cellulasi in tre classi: eso-1,4-[beta]-D-glucanasi oppure cellobioidrolasi (CBH) (EC 3. 2.1.91), che staccano le unità di cellobiosio dalle estremità delle catene cellulosiche; endo-1,4-[beta]-D-glucanasi (EG) (EC 3.2.1.4), che idrolizzano i legami interni [beta]-1,4-glucosidico in modo casuale nella catena cellulosica; 1,4-[beta]-D-glucosidasi (EC 3.2.1.21), che idrolizza il cellobiosio a glucosio e stacca pure le unità di glucosio dai cellooligosaccaridi. Quindi, se la biomassa contiene cellulosa, il glucosio è una specie idrolizzata idrosolubile ottenibile per idrolisi della biomassa e le summenzionate cellulasi sono esempi specifici, come pure quelle menzionate nella parte sperimentale, di catalizzatori per l'idrolisi della cellulosa.

Mediante analisi simile, i prodotti dell'idrolisi della emicellulosa sono specie idrosolubili ottenibili dall'idrolisi della biomassa, ammettendo naturalmente che la biomassa contenga emicellulosa. L'emicellulosa comprende xilano, glucuronossilano, arabinossilano, glucomannano e xiloglucano. I dif-

ferenti zuccheri nella emicellulosa vengono liberati dalle emicellulasi. Il sistema emicellulitico è più complesso del sistema cellulolitico per la natura eterologa della emicellulosa. Il sistema può comportare, tra l'altro, endo-1,4-[beta]-D-xilanasi (EC 3.2.1.8), che idrolizzano i legami interni nella catena di xilano; 1,4-[beta]-D-xilossidasi (EC 3.2.1.37), che attacca gli xilooligosaccaridi dalla estremità non riducente e libera xilosio; endo-1,4-[beta]-D-mannanasi (EC 3.2.1.78), che scinde i legami interni; 1,4-[beta]-D-mannosidasi (EC 3.2.1.25), che separa i mannoooligosaccaridi dal mannosio. I gruppi laterali vengono rimossi da vari enzimi; come [alfa]-D-galattosidasi (EC 3.2.1.22), [alfa]-L-arabinofuranosidasi (EC 3.2.1.55), [alfa]-D-glucuronidasi (EC 3.2.1.139), cinnamoilesterasi (EC 3.1.1.-), acetilxilanoesterasi (EC 3.1.1.6) e feruloilesterasi (EC 3.1.1.73). Quindi, se la biomassa contiene emicellulosa, xolosio e mannosio sono esempi di una specie idrolizzata idrosolubile ottenibile da idrolisi delle biomasse contenenti emicellulosa e le summenzionate emicellulasi sono esempi specifici, come quelli già menzionati nella parte sperimentale, di catalizzatori per l'idrolisi di emicellulosa.

Incluso nel procedimento vi è un primo catalizzatore. La prima composizione catalitica consiste nel catalizzatore, il supporto ed altri additivi/ingredienti usati per introdurre il catalizzatore nel procedimento. Come precedentemente descritto, il catalizzatore può comprendere almeno un enzima oppure microrganismo che converte almeno uno dei composti presenti nella biomassa in un composto oppure composti con peso molecolare inferiore, fino a, ed includendo, lo zucchero basico oppure carboidrato usato per preparare il composto della biomassa. Gli enzimi in grado di fare questo per i vari polisaccaridi come cellulosa, emicellulosa ed amido sono ben noti nella tecnica e possono comprendere quelli non ancora inventati.

La prima composizione catalitica può anche comprendere un acido inorganico, preferibilmente scelto dal gruppo costituito da acido solforico, acido cloridrico, acido fosforico e simili, oppure loro miscele. L'acido inorganico è considerato utile per il trattamento a temperature superiori ai 100°C. Il procedimento può anche essere eseguito specificamente senza aggiunta di un acido inorganico.

È tipico aggiungere il primo catalizzatore al

procedimento con un veicolo, come acqua oppure una biomassa a base organica. Per scopi di equilibratura della massa, il termine composizione catalitica comprende quindi il catalizzatore (catalizzatori) più il veicolo (veicoli) usato per aggiungere il catalizzatore al procedimento. Se si aggiunge un tampone di pH con il catalizzatore, anche questo è parte della composizione del catalizzatore. Spesso la biomassa ligno-cellulosica conterrà amido. Gli enzimi più importanti per l'uso nell'idrolisi dell'amido sono alfa-amilasi (1,4-[alfa]-D-glucanoglucanoidrolasi, (EC 3.2.1.1)). Queste sono idrolasi ad azione interna che rompono i legami 1,4-[alfa]-D-glucosidici e possono aggirare ma non idrolizzare i punti di ramificazione 1,6-[alfa]-D-glucosidici. Tuttavia, anche glicoamilasi ad azione esterna come beta-amilasi (EC 3.2.1.2) e pullulanasi (EC 3.2.1.41) possono venire usate per l'idrolisi dell'amido. Il risultato dell'idrolisi dell'amido è principalmente glucosio, maltosio, maltotriosio, [alfa]-destrina e quantità variabili di oligosaccaridi. Quando l'idrolizzato a base di amido viene usato per la fermentazione, può essere vantaggioso aggiungere enzimi proteolitici. Tali enzimi possono impedire la flocculazione del microrganismo e possono gene-

rare amminoacidi disponibili per il microrganismo. Quindi, se la biomassa contiene amido, glucosio, maltosio, maltotriosio, [alfa]-destrina ed oligosaccaridi sono esempi di una specie idrolizzata solubile in acqua che può essere ottenuta per idrolisi della biomassa contenente amido e le alfa-amilasi summenzionate sono esempi specifici, insieme a quelle menzionate nella sezione sperimentale, di catalizzatori per l'idrolisi dell'amido.

Uso

Secondo un altro aspetto, il procedimento si riferisce all'uso di una composizione solida ottenuta da una biomassa ligno-cellulosica pretrattata come fonte di carbonio, impiegato per la produzione di un enzima oppure miscela enzimatica in una cellula ospite.

Il procedimento descritto e rivendicato in questa sede non deve essere considerato limitato all'oggetto indicato dalle realizzazioni specifiche descritte, poiché queste realizzazioni sono destinate ad illustrare i vari aspetti dell'invenzione. Qualsiasi realizzazione equivalente è da considerare compresa nell'ambito dell'oggetto della presente invenzione. In effetti, varie modifiche dell'invenzione oltre a quelle presenti e descritte nella pre-

sente, possono apparire evidenti agli esperti del settore dalla lettura della descrizione precedente. Tali modifiche sono pure destinate a rientrare nell'oggetto delle rivendicazioni allegate. In caso di conflitto, farà fede la presente descrizione, comprese le definizioni.

Il procedimento può anche avere ulteriori fasi in cui gli enzimi raccolti dal procedimento vengono ulteriormente usati per idrolizzare una prima biomassa ligno-cellulosica. Preferibilmente, la prima biomassa ligno-cellulosica e la seconda biomassa ligno-cellulosica debbono essere derivate dallo stesso genere di erbe e più preferibilmente dalla stessa specie di erba. È pure preferibile che la prima biomassa ligno-cellulosica sulla quale l'idrolisi enzimatica deve venire eseguita venga pretrattata prima dell'idrolisi enzimatica.

È stato pure scoperto l'enzima oppure la miscela enzimatica ottenuta con il procedimento descritto, nonché la biomassa ligno-cellulosica che è stata idrolizzata mediante un enzima oppure miscela di enzimi prodotti secondo il procedimento descritto.

PROCEDURA SPERIMENTALE

PREPARAZIONE DELLE COMPOSIZIONI SOLIDE

Differenti composizioni solide sono state preparate da *Arundo donax*, e paglia di frumento. Le biomasse sono state sottoposte a pre-trattamento, idrolisi enzimatica, fermentazione e filtrazione a pressione per preparare differenti composizioni solide usate in esperimenti di coltura.

Pre-trattamento

La biomassa ligno-cellulosica è stata introdotta in un reattore continuo e sottoposta ad un trattamento di imbibizione. La miscela imbibita è stata separata in un liquido di imbibizione ed una frazione contenente la materia prima solida imbibita per mezzo di una pressa. La frazione contenente la materia prima solida imbibita è stata sottoposta ad esplosione di vapore. I parametri del pre-trattamento per le due biomasse sono riportati nella Tabella 1.

TABELLA 1: Parametri di trattamento usati nel pre-trattamento

	Imbibizione		Esplosione di vapore	
	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
<i>Arundo donax</i>	155	155	195	4
Paglia di frumento	155	65	190	4

I prodotti sottoposti ad esplosione di vapore

sono stati separati in un liquido di esplosione di vapore ed un solido trattato per esplosione di vapore.

Il solido trattato con esplosione di vapore è la biomassa *Arundo donax* pretrattata (AR) e la biomassa di paglia di frumento pretrattata (WS) è stata usata negli esperimenti di coltura.

Idrolisi enzimatica

La biomassa pretrattata è stata miscelata con acqua per ottenere una miscela avente il 7,5% di contenuto di sostanza secca e la miscela è stata inserita in un reattore enzimatico. È stato aggiunto un cocktail di enzimi, corrispondente alla concentrazione specifica di proteina per grammo di glucani contenuti nella biomassa pretrattata. L'idrolisi enzimatica è stata eseguita per 72 h sotto agitazione.

Due differenti idrolizzati sono stati preparati partendo dalla biomassa pretrattata con paglia di frumento; ciascun idrolizzato è stato separato per centrifugazione (20 minuti, 8.000 giri/minuto, 4°C) in una frazione di liquido, contenente gli zuccheri idrosolubili, e la composizione solida. Le composizioni solide, indicate come HW1 e HW2, sono state usate nelle prove di coltura. I parametri

dell'idrolisi eseguita nella preparazione di HW1 e HW2 sono riportati nella Tabella 2 e sono stati scelti per ottenere due differenti livelli di impoverimento degli zuccheri complessi; in particolare HW2 è stato preparato con una concentrazione di enzima maggiore, corrispondente quindi ad una composizione più impoverita.

TABELLA 2. Parametri usati nell'idrolisi enzimatica per la produzione di composizioni solide HW1 e HW2

	Enzima	Concentrazione (mg proteina/g glucano)	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)
HW1	Soluzione di enzima <i>T. reesei</i>	15	60	5	72
HW2	Soluzione di enzima <i>T. reesei</i>	75	50	5	72

Fermentazione e filtrazione a pressione

L'idrolizzato da paglia di grano, preparato secondo le condizioni della composizione HW2, è stato caricato in un bioreattore con 3 g/litro di urea e 0,5 g/litro di un lievito di fermentazione. Il pH è stato fissato a 5 e la temperatura a 30°C e la fermentazione è proseguita per 48 h. Il cocktail di enzimi non è stato rimosso dall'idrolizzato, in modo tale che l'idrolisi enzimatica proseguisse durante la fermentazione. Il brodo di fermentazione,

comprendente solidi, etanolo ed altre frazioni liquide, è stato pressato mediante un filtro pressa ad una temperatura di 80°C a 15 bar, per separare l'etanolo ed i componenti liquidi dalla frazione ricca di solidi. La frazione ricca di solidi comprendente lignina estratta dalla pressa, indicata come HFW, è stata usata in esperimenti di coltura.

L'idrolizzato di *Arundo donax* è stato preparato secondo i parametri corrispondenti a HW2 e fermentato secondo la procedura usata per la paglia di frumento. La frazione ricca di solidi estratta dalla pressa, indicata come HFA, è stata usata negli esperimenti di coltura.

Composizione

La composizione della biomassa pretrattata e delle composizioni solide in termini di zuccheri idrosolubili, zuccheri complessi, lignina ed altri composti è stata determinata secondo i procedimenti analitici standard elencati alla fine della sezione sperimentale.

La Tabella 3 riporta la composizione della biomassa pretrattata AR e WS, le composizioni dei solidi derivati dagli idrolizzati WS HW1 e HW2 e le composizioni dei solidi derivati dalla fermentazione degli idrolizzati AR e WS (HFW e HFA). La tabel-

la contiene anche le composizioni di LS1 e LS2, che sono state usate negli esperimenti successivi e sono descritte in una sezione sperimentale seguente.

Le composizioni sono espresse in termini di zuccheri complessi C6, zuccheri complessi C5, zuccheri totali idrosolubili (C5 e C6) ed altri componenti (comprendenti lignina ed acqua). Gli zuccheri complessi C6 sono basati su glucosio, gli zuccheri complessi C5 sono basati principalmente su xilosio.

TABELLA 3. Composizioni usate negli esperimenti riportati

	WS	AR	HW1	HW2	HFW	HFA	LS1	LS2
Zuccheri idrosolubili	1.6%	2.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Zuccheri complessi C6	17.4%	18.3%	10.7%	9.6%	8.05%	14.0%	0.51%	0.23%
Zuccheri complessi C5	3.4%	2.4%	1.6%	1.4%	1.3%	2.0%	0.04%	0.02%
Altri*	77.6%	76.9%	87.7%	89.0%	90.6%	84.0%	99.4%	99.8%
Rapporto zucchero complesso/ lignina	1.831	1.815	1.574	0.886	0.723	0.786	0.19	0.18

* Compresa lignina ed acqua

Per l'oggetto della presente descrizione, le composizioni vengono convenientemente caratterizzate dal rapporto tra zuccheri complessi e lignina. Gli zuccheri complessi corrispondono alla somma degli zuccheri complessi C6 e degli zuccheri complessi C5. Considerando le composizioni ottenute da WS, cioè HW1, HW2 e HFW, si fa notare che:

- il rapporto tra zuccheri complessi e ligni-

na in HW1 e HW2 è inferiore al rapporto tra gli zuccheri complessi e la lignina in WS, riflettendo l'impoverimento dello zucchero complesso nella fase di idrolisi;

- il rapporto tra zuccheri complessi e lignina in HW2 è inferiore al rapporto tra zuccheri complessi e lignina in HW1, riflettendo l'idrolisi più efficace eseguita in HW2 a concentrazione superiore di enzima;

- il rapporto tra zuccheri complessi e lignina in HFW è inferiore al rapporto tra zuccheri complessi e lignina in HW2, per il fatto che gli enzimi non sono stati disattivati e rimossi e l'idrolisi prosegue durante la fermentazione.

ESPERIMENTI DI COLTURA

La coltura della cellula ospite per la produzione di enzimi procede come negli esempi seguenti. Ciascuna coltura di cellula ospite, che negli esempi riportati impiegano *Trichoderma reesei* e *Penicillium decumbens* come cellula ospite, partendo da una soluzione di spora recuperata da una piastra PDA inseminata con spore fresche sette giorni prima del recupero.

Gli esperimenti sono divisi in due fasi:

- 1) pre-coltura che non costituisce parte del

procedimento di coltura rivendicato e

2) coltura di cellula ospite in cui la cellula ospite viene coltivata e si produce l'enzima (enzimi).

PRE-COLTURA:

Inseminazione su piastra PDA:

1. 500 µl di una soluzione di spore precedentemente raccolte sono state distribuite su una piastra PDA (mezzo agar di destrosio di patata al 3,9%) preparata come è noto nella tecnica.

2. 500 µl di soluzione sterile di cloruro di sodio allo 0,9% per *P. decumbens* o 1% di soluzione Triton X-100 per *T. reesei* sono stati distribuiti sulle spore ed il contenitore è stato ruotato moderatamente fino a quando la superficie è risultata tutta coperta dal liquido.

3. Il contenitore è stato chiuso con un tappo di cotone coperto con un foglio di alluminio ed incubato a 30°C per *P. decumbens* o 28°C per *T. reesei* per sette giorni.

Recupero della soluzione di spore:

1. Dopo sette giorni, 10 ml dell'opportuna soluzione sterile per *P. decumbens* e *T. reesei* (cloruro di sodio 0,9% e, rispettivamente, 1% di Triton X-100) sono stati aggiunti nel contenitore.

2. Il contenitore è stato moderatamente ruo-

tato fino a quando il liquido è diventato torbido.

3. Una parte consistente del volume della soluzione distribuita è stata recuperata come possibile trasferendo la sospensione di spore in una provetta sterile.

4. La soluzione di spore è stata conservata a 4°C.

Fase di definizione della pre-coltura

Prima di partire con la coltura della cellula ospite è stato necessario definire la pre-coltura.

Il mezzo di pre-coltura è stato preparato come descritto nella Tabella 4, scegliendo il volume appropriato rispetto a quello della fase di coltura della cellula ospite (1/10 e 1/20 per *P. decumbens* e rispettivamente *T. reesei*):

TABELLA 4: Composizione del mezzo di pre-coltura

<i>P. decumbens</i>				<i>T. reesei</i>			
Composizione del mezzo di pre-coltura	% p/v	g	G	Composizione del mezzo di pre-coltura	% p/v	g	G
Peptone	1.00%	1.00	10.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14%	0.14	1.4
AR	2.00%	2.00	20.00	KH ₂ PO ₄	0.21%	0.21	2.1
KH ₂ PO ₄	0.30%	0.30	3.00	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.04%	0.04	0.4
MgSO ₄	0.05%	0.05	0.50	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.04%	0.04	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.20%	0.20	2.00	Metalli	0.02%	0.02	0.2
CaCO ₃	0.50%	0.50	5.00	Urea	0.10%	0.1	1
Glucosio	1.00%	1.00	10.00	Glucosio	1.00%	1	10
Volume finale		100	1000	Volume finale		100	1000

1. La soluzione di glucosio e di spore sono

state aggiunte dopo sterilizzazione. Il volume della soluzione di spore è stato scelto in modo da ottenere una concentrazione finale di 5.000 CFU/ml per *P. decumbens* e 50.000 CFU/ml per *T. reesei*.

2. La pre-coltura di *P. decumbens* è stata incubata a 30°C, 170 giri/minuto per 30 h mentre la pre-coltura di *T. reesei* è stata incubata a 28°C, 170 giri/minuto per 64 h.

COLTURA DELLA CELLULA OSPITE E PRODUZIONE DELL'ENZIMA

L'ambiente di coltura della cellula ospite viene preparato come descritto nella Tabella 5.

TABELLA 5: Composizione del mezzo di coltura

<i>P. decumbens</i>		<i>T. reesei</i>	
Composizione mezzo di coltura	% p/v	Composizione mezzo di coltura	% p/v
Biomassa [su basi secche]	4,50%	Biomassa [su basi secche]	4,0%
Urea	0,50%	Urea	0,18%
Tween	0,10%	CaCl ₂	0,26%
Volume di mezzo di pre-coltura dalla fase precedente	10,0%	KH ₂ PO ₄	0,28%
		MgSO ₄	0,16%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	0,38%
		Volume di mezzo di pre-coltura dalla fase precedente	5,0%

La biomassa viene scelta dal gruppo di composizioni preparate per dimostrare l'invenzione (in-

dicate come WS, AR, HW1, HW2, HFW, HFA).

1. Dopo sterilizzazione il pH è stato corretto a 5,3 per *P. decumbens* e 6,0 per *T. reesei* e sono stati aggiunti i volumi di pre-coltura. Il pH viene controllato in beute usando tipi differenti di soluzioni tampone (per esempio tampone fosfato 0,1 M).

2. La coltura della cellula ospite e la produzione dell'enzima sono state eseguite alla temperatura adatta ed alla agitazione prevista per ciascun microrganismo (30°C, 170 giri/minuto per *P. decumbens* e 28°C, 170 giri/minuto per *T. reesei*).

ESPERIMENTO 1

TABELLA 6: Attività enzimatica di *T. reesei* in presenza di differenti mezzi di coltura.

Composizione usata	Concentrazione in ambiente di coltura (p/v, %)		Totale cellulastico, FPU	β -glucosidasi	Xilanasi
	Lignina	Zucchero complesso			

Contenuto di attività dopo 169 h, U/ml

CE1	WS	1.65	3.02	0.96	0.30	231
WE1	HW1	1.67	2.63	1.92	0.45	113
WE2	HW2	1.72	1.52	1.74	0.46	138
WE3	HPW	1.89	1.35	2.01	0.91	360

Prestazione relativa a CE1, %

CE1	WS	--	--	--	--	--
WE1	HW1	101%	87%	199%	149%	49%
WE2	HW2	104%	50%	181%	155%	60%
WE3	HPW	114%	45%	216%	305%	156%

La Tabella 6 confronta l'attività su differenti biomasse ligno-cellulosiche usate per alimentare la cellula ospite, *Trichoderma reesei*. Nella tabella, "composizione usata" indica la biomassa usata nel mezzo di coltura come fonte di atomi di carbonio. Il contenuto medio è stato calcolato per provvedere approssimativamente la stessa quantità di lignina in ciascun ambiente coltivato. Poiché ciascuna biomassa usata è caratterizzata dalla diminuzione del rapporto tra zucchero complesso e lignina, la quantità di zucchero complesso usata in ciascun mezzo di coltura diminuisce da CE1 a WE3. Que-

sto definisce il procedimento per vari tipi di cellule ospiti. Le attività CE1 sono state scelte come riferimento per esprimere risultati sperimentali come scala relativa nella seconda sezione della tabella. WE1, WE2 w WE3 sono esperimenti usati con un mezzo di coltura in cui l'unica fonte di carbonio era la composizione ottenuta da biomasse pretrattate ed idrolizzate (HW1 e HW2) e fermentate (HFW). Il tempo di coltura è stato uguale in tutti gli esperimenti (169 h).

I risultati sperimentali mostrano chiaramente che la biomassa ligno-cellulosica pretrattata può venire sostituita con una composizione solida ottenuta da biomassa ligno-cellulosica pretrattata mediante rimozione di una frazione del complesso degli zuccheri. Inoltre, la resa di conversione, definita come attività totale prodotta per il rapporto di zucchero complesso, ottenuto da biomassa ligno-cellulosica impoverita di zucchero è sorprendentemente più alta di quella ottenuto dalla biomassa ligno-cellulosica pretrattata con un incremento nella resa di conversione come dimostrato mediante i risultati riportati nella Tabella 7.

TABELLA 7. Attività totale ottenuta da differenti mezzi preparati usando differenti composizio-

ni con contenuto decrescente di complesso di zucchero.

	Contenuto di zucchero complesso nel mezzo di coltura rispetto a CE1	Resa di conversione (totale attività/zucchero complesso)		
		Totale cellulolasico, FPU	β -glucosidasi	Xilanas
CE1	--	32	10	7649
WE1	87%	73	17	4313
WE2	50%	114	30	9059
WE3	45%	149	67	26667

ESPERIMENTO 2

In un ulteriore esperimento, differenti composizioni prive di zucchero oppure contenenti soltanto quantità molto piccole di zucchero complesso sono state usate nel mezzo di coltura come fonti di carbonio.

CE2 e CE3 sono state prodotte usando due differenti campioni di lignina del commercio. CE2 conteneva l'8% di lignina alcalina a basso contenuto di solfonato (Sigma, codice 471003) e CE3 conteneva l'8% di lignina alcalina (Sigma, codice 370959). La lignina del commercio usata ha un contenuto di zucchero complesso inferiore al 5%.

Dopo il procedimento di produzione dell'enzima, i residui del mezzo di coltura usato in due differenti esperimenti WE3 sono stati centrifugati per 20 minuti a 8.000 giri/minuto a 4°C, e due fra-

zioni ricche di solidi, indicate rispettivamente come LS1 e LS2, sono state raccolte. CE1 dell'Esperimento 1 è riportato come esperimento di controllo.

Le composizioni di LS1 e LS2 sono contenute nella Tabella 3. I mezzi di coltura WE4 e WE5 contenevano 5 volte in più di materiale rispetto a CE1 per quanto si riferisce al contenuto di lignina e 2,5-2,8 volte in più di materiale rispetto, rispettivamente, a LS1 e LS2. Come evidenziato nella Tabella 3, il contenuto di zucchero complesso in LS1 e LS2 è inferiore all'8% e la quantità corrispondente di zucchero complesso aggiunta al mezzo è riportata nella tabella.

Il tempo di coltura è di 169 h.

TABELLA 8. Attività enzimatica di *T. reesei* per CE1, CE2, CE3, WE4 e WE5, rispettivamente.

Fonte di carbonio	Concetrazone in ambiente di coltura (% su base secca)		Totale cellulase, FPU	β -glucosidasi	Xilanasi
	Lignina	Zucchero complesso			

Contenuto di attività dopo 169 h, U/ml

CE1	WS	1.65	3.02	2.57	1.20	329.96
CE2	Lignina pura	7.92	0	0.13	0.09	13.04
CE3	Lignina pura	7.92	0	0.07	0.11	13.01
WE4	LS1	3.04	0.59	0.02	0.00	10.94
WE5	LS2	2.79	0.50	0.19	0.00	26.01

Prestazione relativa a CE1, %

CE1	WS	--	--	--	--	--
CE2	Lignina pura	480%	0%	5%	8%	4%
CE3	Lignina pura	480%	0%	3%	9%	4%
WE4	LS1	184%	20%	1%	0%	3%
WE5	LS2	169%	17%	7%	0%	8%

Come appare chiaro dai dati riportati, nel caso di WE4 e WE5 la quantità di zucchero complesso, corrispondente al 20% degli zuccheri complessi nel caso CE1, non è sufficiente a promuovere la produzione dell'enzima, mentre la presenza del 45% degli zuccheri complessi usati in CE1 è stata riportata in grado di aumentare la produzione di enzimi (esperimento WE3).

ESPERIMENTO 3

Altri esperimenti sono stati realizzati per produrre enzimi usando *Penicillium decumbens* come cellula ospite. L'esempio comparativo (CE4) è stato

eseguito usando biomassa AR pretrattata come fonte di carbonio mentre WE6 è stato eseguito aggiungendo una quantità sufficiente di composizione HFA per provvedere approssimativamente la stessa quantità di lignina usata in CE4. Il tempo di coltura è stato uguale per tutti gli esperimenti (138 h).

La Tabella 9 riporta le attività ottenute dopo 138 h di produzione di enzima. Gli esperimenti dimostrano che almeno la stessa quantità di enzimi totali può venire prodotta quando si coltiva *Penicillium decumbens* in presenza di biomassa lignocellulosica impoverita di zucchero oppure pretrattata.

TABELLA 9: Attività enzimatica prodotta usando *Penicillium decumbens* come cellula ospite

Fonte di carbonio	Concetrazone in ambiente di coltura (% su base secca)		Totale cellulase, FPU	β -glucosidasi	Xilanasi	
	Lignina	Zuccheri complessi				
Contenuto di attività dopo 138 h, U/ml						
CE4	AR	4.90	2.43	0.54	2.38	16.69
WE6	HFA	4.98	1.69	0.68	2.20	13.40
Prestazione relativa a CE4, %						
CE4	AR	100%	100%	100%	100%	100%
WE6	HFA	102%	70%	126%	92%	80%

Dalla Tabella 9 appare evidente che l'enzima derivato dalla cellula ospite alimentata con compo-

sizione solida impoverita di zucchero ottenuta da idrolisi e fermentazione delle biomasse ligno-cellulosiche, è molto prossima a quella ottenuta dall'esempio comparativo, usando materiale pretrattato.

ESPERIMENTO 4

Gli enzimi prodotti in WE3 su composizione solida di paglia di frumento HFW sono stati ulteriormente usati per l'idrolisi di paglia di frumento come biomassa pretrattata WS.

La biomassa pretrattata è stata miscelata con acqua per ottenere una miscela avente il 7,5% di contenuto di sostanza secca e la miscela è stata introdotta in una beuta da 100 ml. Le miscele di enzimi coltivati in WE3 sono state caricate a 60 e 90 mg di proteina/g di glucani della biomassa pretrattata rispettivamente negli esperimenti WE7 e WE8, e l'idrolisi è stata eseguita a pH 5,0 e 50°C per 72 h. Gli esperimenti con CR5 sono stati eseguiti usando una soluzione di enzima del commercio secondo le istruzioni del produttore.

Le concentrazioni di glucosio e xilosio sono state determinate a 6, 24, 48 e 72 h e sono riportate nella Tabella 10. Il glucosio e lo xilosio rilasciati sono stati rapportati alla quantità ini-

ziale di glucani e xilani nella biomassa WS pretrattata per quantificare la resa di idrolisi dei glucani e la resa di idrolisi degli xilani. La Figura 1 riporta i grafici della resa di idrolisi dei glucani (Figura 1a) e della resa di idrolisi dei xilani (Figura 1b). Questi esperimenti evidenziano che l'enzima prodotto secondo la presente descrizione può essere usato per idrolizzare efficacemente biomasse ligno-cellulosiche pretrattate.

TABELLA 10. Risultati degli esperimenti di idrolisi di CE5, WE7 e WE8.

Prestazione idrolisi dei glucani					Prestazione idrolisi di xilani				
Tempo, h	6	24	48	72	6	24	48	72	
Concentrazione glucosio, g/dm ³					Concentrazione xilosio, g/dm ³				
CE5	7.0	18.6	22.0	23.2	7.9	9.6	10.4	10.6	
WE7	8.5	18.0	20.2	23.5	3.8	7.2	8.0	9.07	
WE8	10.7	20.6	23.3	24.5	4.7	8.2	9.2	9.6	
Resa idrolisi glucani, %					Resa idrolisi xilani, %				
CE5	24%	64%	75%	80%	75%	91%	98%	100%	
WE7	29%	62%	69%	81%	36%	68%	76%	86%	
WE8	37%	71%	80%	84%	45%	77%	86%	90%	

PROCEDIMENTI ANALITICI

Determinazione attività

La FPU (attività carta da filtro), beta-glucosidasi e l'attività di β -glucosidasi e xilanas sono state determinate usando procedimenti noti nell'industria per la determinazione dell'attività enzimatica. La differenza è che la carta da filtro

è stata il substrato per FPU e salicina e la miscela di xilano appresso descritta è stata usata come saggi per la attività di beta-glucosidasi e xilanasi.

Substrato	Tipo attività	Preparazione
Salicina	Beta-glucosidasi	0,1 g in 10 ml di soluzione tampone 50 mM
Xilano	Xilanasi	2 g di xilano di faggio 70 ml di acqua ultrapura Riscaldare all'ebollizione sotto agitazione. Raffreddare a temperatura ambiente ed aggiungere 5 ml di soluzione base di tampone 1 N

Determinazione della composizione

Le composizioni sono state determinate secondo gli standard NREL seguenti

Procedimento analitico NREL

Determinazione dei carboidrati strutturali e della lignina nella biomassa

Data di emissione della procedura analitica di laboratorio (LAP):

25/4/2008

Technical Report NREL/TP-510-42618: revisionato Aprile 2008

Determinazione dei prodotti estraibili nella biomassa

Data di emissione della procedura analitica di laboratorio (LAP):

17/7/2005

Technical Report NREL/TP-510-42619: Gennaio
2008

**Preparazione di campioni per l'analisi della
composizione**

Data di emissione della procedura analitica di
laboratorio (LAP):

28/9/2005

Technical Report NREL/TP-510-42620: Gennaio
2008

**Determinazione del contenuto totale di solidi
nella biomassa e dei solidi totali disciolti nei
campioni liquidi del procedimento**

Data di emissione della procedura analitica di
laboratorio (LAP):

31/3/2008

Technical Report NREL/TP-510-42621: revisiona-
to Marzo 2008

Determinazione delle ceneri nella biomassa

Data di emissione della procedura analitica di
laboratorio (LAP):

17/7/2005

Technical Report NREL/TP-510-42622: Gennaio
2008

Determinazione di zuccheri, sottoprodotti e

**prodotti di degradazione nelle frazioni di campioni
liquidi del procedimento**

Data di emissione della procedura analitica di
laboratorio (LAP):

8/12/2006

Technical Report NREL/TP-510-42623: Gennaio
2008

**Determinazione dei solidi insolubili in mate-
riale di biomassa pretrattato**

Data di emissione della procedura analitica di
laboratorio (LAP):

21/3/2008

NREL/TP-510-42627: Marzo 2008

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di almeno un primo enzima da una cellula ospite, in cui il primo enzima è in grado di idrolizzare una prima biomassa ligno-cellulosica pretrattata,

detto procedimento comprendendo la fase di coltivare la cellula ospite per produrre almeno il primo enzima per un tempo di coltura, in cui

la coltura della cellula ospite avviene in un ambiente di coltura impoverito di zucchero comprendente la cellula ospite, acqua ed una composizione solida, detta composizione solida comprendendo uno zucchero complesso della composizione solida ed una lignina della composizione solida, in cui

a) la composizione solida viene ottenuta da una seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata, comprendente uno zucchero complesso della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata ed una lignina della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata; e

b) il rapporto della quantità totale degli zuccheri complessi della composizione solida con la quantità totale della lignina della composizione solida è superiore a zero ed inferiore al rapporto della quantità totale degli zuccheri complessi del-

la seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata rispetto alla quantità totale della lignina della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui la coltura viene fatta in condizioni di contenuto ridotto di zucchero semplice, con una quantità di zucchero semplice oppure zuccheri semplici opzionalmente aggiunto/i nel campo tra 0 e 10% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su una base secca per una porzione del tempo di coltura che è almeno il 50% del tempo di coltura.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 oppure 2, in cui la composizione solida viene ottenuta dalla seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata mediante un procedimento che comprende le fasi di:

a) idrolisi di almeno una frazione della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata in presenza di un primo catalizzatore, per produrre una composizione idrolizzata comprendente la composizione solida ed una soluzione di acqua e zuccheri solubili, e

b) rimuovere almeno il 50% della soluzione di acqua e zuccheri solubili dalla composizione idrolizzata.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui la rimozione della soluzione di acqua e zuccheri solubili viene fatta mediante almeno un procedimento compreso nel gruppo costituito da decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, filtrazione a pressione e lavaggio.

5. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 oppure 2, in cui la composizione solida viene ottenuta dalla seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata mediante un procedimento comprendente le fasi di:

a) idrolisi di almeno una frazione della seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata in presenza di un primo catalizzatore, per produrre una composizione idrolizzata comprendente zuccheri complessi e lignina e la soluzione di acqua e zuccheri solubili;

b) convertire almeno una frazione degli zuccheri solubili nella composizione idrolizzata in presenza di un secondo catalizzatore per produrre una composizione convertita comprendente almeno un prodotto derivato dallo zucchero, e la composizione solida; e

c) rimuovere una frazione dell' almeno un prodotto derivato dallo zucchero.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui la rimozione della frazione dell' almeno un prodotto derivato dallo zucchero viene eseguita mediante almeno un procedimento scelto dal gruppo costituito da decantazione, sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, filtrazione a pressione, lavaggio, evaporazione e distillazione.

7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3 a 6, in cui il primo catalizzatore comprende un secondo enzima oppure una miscela di enzimi.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3 a 6, in cui il primo catalizzatore viene scelto dal gruppo costituito da ioni idrogeno, acidi organici ed acidi inorganici.

9. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5 a 8, in cui la conversione della composizione idrolizzata comprende una fermentazione.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui l' almeno un prodotto derivato dallo zucchero comprende etanolo.

11. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 10, in cui il secondo catalizzatore comprende almeno uno lievito.

12. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 11, in cui la porzione del tempo di coltura in condizioni di carenza di zucchero semplice viene scelta dal gruppo costituito da almeno il 75% del tempo di coltura, almeno l'85% del tempo di coltura, almeno il 90% del tempo di coltura, almeno il 95% del tempo di coltura ed almeno il 98% del tempo di coltura.

13. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 11, in cui la porzione del tempo di coltura in condizioni di carenza di zucchero semplice è la stessa del tempo di coltura.

14. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 13, in cui la quantità di zucchero semplice oppure zuccheri semplici opzionalmente aggiunta è nel campo tra 0 e 5% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su base secca, da 0 a 2,5% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su base secca, da 0 a 2,0% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su base secca e da 0 a 1,0% in peso dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero su base secca.

15. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 13, in cui non vi è una aggiunta

opzionale di zucchero semplice nell'ambiente di coltura impoverito di zucchero.

16. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15, in cui almeno il primo enzima viene raccolto mediante separazione dell'ambiente di coltura impoverito di zucchero in almeno una composizione raccolta, comprendente almeno una frazione della quantità del primo enzima ed una composizione esaurita, comprendente almeno una frazione di una quantità di residuo solido della composizione solida.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 16, in cui la quantità totale di zuccheri complessi è presente in un campo scelto dal gruppo costituito da 0 a 30% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 20% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 15% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 10% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 7,5% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 5% in peso della composizione esaurita su base secca, da 0 a 2,5% in peso della composizione esaurita su base secca.

18. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 17, in cui il primo enzima viene

ulteriormente usato per idrolizzare la prima biomassa ligno-cellulosica e la prima biomassa ligno-cellulosica e la seconda biomassa ligno-cellulosica pretrattata comprendono entrambe biomassa ligno-cellulosica derivata dal gruppo costituito dallo stesso genere e dalla stessa specie di graminacee.

19. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 17, in cui la prima biomassa ligno-cellulosica viene pretrattata prima dell'idrolisi enzimatica.

20. Enzima oppure miscela enzimatica ottenibile mediante qualsiasi procedimento secondo le rivendicazioni 1 a 19.

21. Biomassa ligno-cellulosica idrolizzata che è stata idrolizzata mediante la miscela enzimatica secondo la rivendicazione 20.

RIVENDICAZIONI

1. A process which produces at least a first enzyme from a host cell, wherein the first enzyme is capable of hydrolyzing a first pre-treated ligno-cellulosic biomass

said process comprising the step of cultivating the host cell to produce at least the first enzyme for a cultivation time, wherein

the cultivation of the host cell occurs in a sugar depleted cultivation environment comprising the host cell, water and a solid composition, said solid composition comprising a complex sugar of the solid composition and a lignin of the solid composition, wherein

a) the solid composition is obtained from a second pre-treated ligno-cellulosic biomass, comprising a complex sugar of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass and a lignin of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass; and

b) the ratio of the total amount of the complex sugars of the solid composition to the total amount of the lignin of the solid composition is greater than zero and less than the ratio of the total amount of the complex sugars of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass to the total

amount of the lignin of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass.

2. The process of claim 1, wherein the cultivation is done under simple sugar starved conditions of having an amount of optionally added simple sugar or simple sugars in the range of between 0 to 10% by weight of the sugar depleted cultivation environment on a dry basis for a portion of the cultivation time which is at least 50% of the cultivation time.

3. The process of claims 1 or 2, wherein the solid composition is obtained from the second pre-treated ligno-cellulosic biomass by a process comprising the steps of:

a) hydrolysing at least a fraction of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass in the presence of a first catalyst, to produce a hydrolysed composition comprising the solid composition and a solution of water and soluble sugars and;

b) removing at least 50% of the solution of water and soluble sugars from the hydrolyzed composition.

4. The process of claim 3, wherein the removal of the solution of water and soluble sugars is done by at least one method comprised of the group consisting of decantation, sedimentation, centrifugation,

filtration, press filtration and washing.

5. The process of claims 1 or 2, wherein the solid composition is obtained from the second pre-treated ligno-cellulosic biomass by a process comprising the steps of:

a) hydrolysing at least a fraction of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass in the presence of a first catalyst, to produce a hydrolysed composition comprising complex sugars and lignin and the solution of water and soluble sugars;

b) converting at least a fraction of the soluble sugars in the hydrolysed composition in the presence of a second catalyst to produce a converted composition comprising at least one sugar derived product, and the solid composition; and

c) removing a fraction of the at least one sugar derived product.

6. The process of claim 5, wherein the removal of the fraction of the at least one sugar derived product is done by at least one method selected from the group consisting of decantation, sedimentation, centrifugation, filtration, press filtration, washing, evaporation and distillation.

7. The process of any of claims 3 to 6, wherein the first catalyst comprises a second enzyme or en-

zymes mixture.

8. The process of any of claims 3 to 6, wherein the first catalyst is selected from the group consisting of Hydrogen ions, organic acids and inorganic acids.

9. The process of any of claims 5 to 8, wherein the conversion of the hydrolysed composition comprises a fermentation.

10. The process of claim 9, wherein the at least one sugar derived product comprises ethanol.

11. The process of any of claims 9 to 10, wherein the second catalyst comprises at least a yeast.

12. The process of any of claims 2 to 11, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is selected from the group consisting of at least 75% of the cultivation time, at least 85% of the cultivation time, at least 90% of the cultivation time, at least 95% of the cultivation time and at least 98% of the cultivation time.

13. The process of any of claims 2 to 11, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is the same as the cultivation time.

14. The process of any of claims 2 to 13, wherein

the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of between 0 to 5% by weight of the sugar depleted cultivation environment on a dry basis, 0 to 2.5% by weight of the sugar depleted cultivation environment on a dry basis, 0 to 2.0% by weight of the sugar depleted cultivation environment on a dry basis and 0 to 1.0% by weight of the sugar depleted cultivation environment on a dry basis.

15. The process of any of claims 2 to 13, wherein there is no optional added simple sugar in the sugar depleted cultivation environment.

16. The process of any of claims 1 to 15, wherein at least the first enzyme is harvested by separating the sugar depleted cultivation environment into at least a harvested composition, comprising at least a fraction of the amount of the first enzyme, and an exhausted composition, comprising at least a fraction of an amount of solid residue of the solid composition.

17. The process of claim 16, wherein the total amount of complex sugars is present in a range selected from the group consisting of 0 to 30% by weight of the exhausted composition on a dry basis, 0 to 20% by weight of the exhausted composition on

a dry basis, 0 to 15% by weight of the exhausted composition on a dry basis, 0 to 10% by weight of the exhausted composition on a dry basis, 0 to 7.5% by weight of the exhausted composition on a dry basis, 0 to 5% by weight of the exhausted composition on a dry basis, 0 to 2.5% by weight of the exhausted composition on a dry basis.

18. The process of any of claims 1 to 17, wherein the first enzyme is further used to hydrolyse the first ligno-cellulosic biomass and the first ligno-cellulosic biomass and the second pretreated ligno-cellulosic biomass both comprise ligno-cellulosic biomass derived from the group consisting of the same grass genus and the same grass species.

19. The process of any of claims 1 to 17, wherein the first ligno-cellulosic biomass is pre-treated prior to enzymatic hydrolysis.

20. An enzyme or enzyme mixture obtainable by any process of claims 1 to 19.

21. A hydrolysed ligno-cellulosic biomass which has been hydrolysed by the enzyme mixture of claim 20.

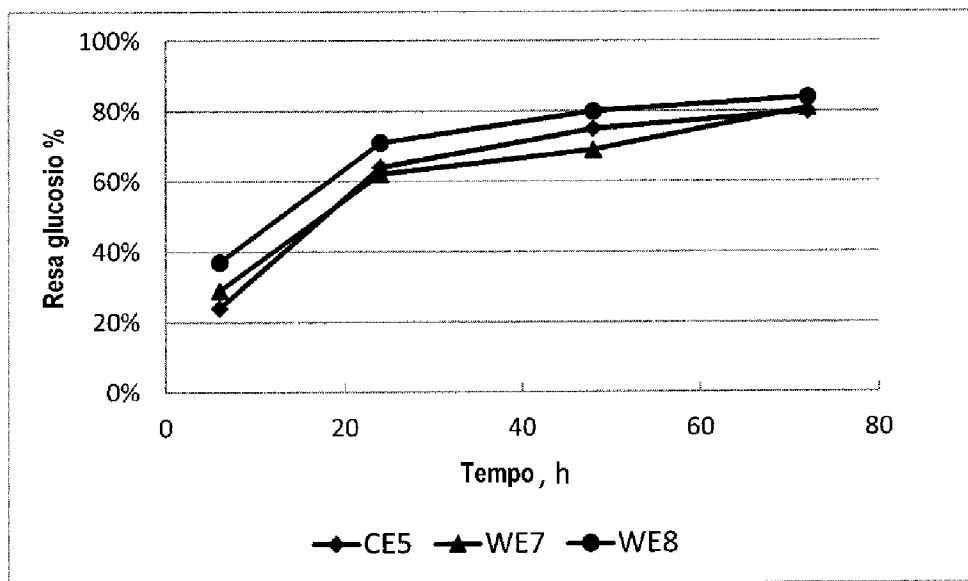


FIG. 1a

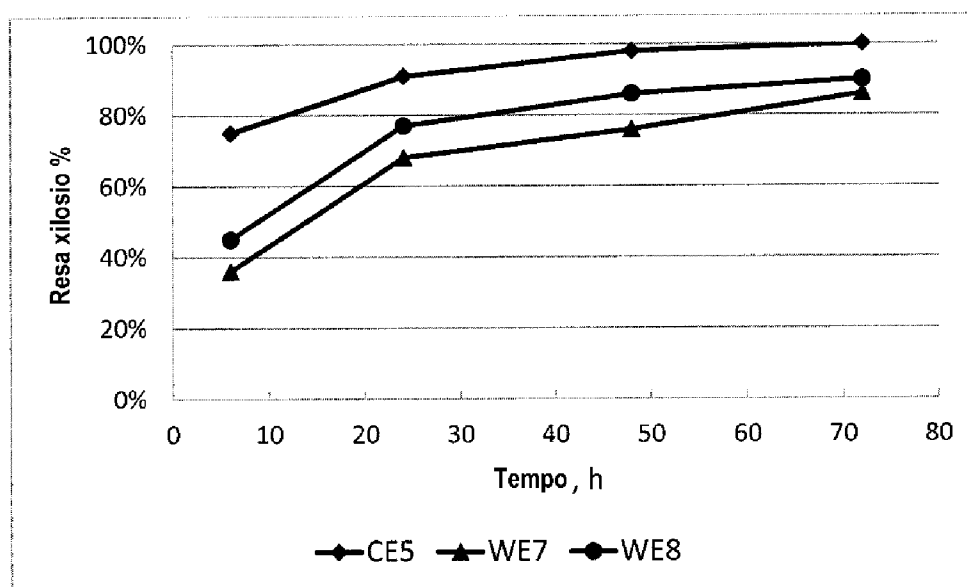


FIG. 1b