

GIOVANNI VALLINI¹

Contributo delle biotecnologie microbiche in risposta al cambiamento climatico: bioprocessi per la decarbonizzazione e la produzione di energia rinnovabile

¹ già professore ordinario di Microbiologia Agraria e direttore del Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

INTRODUZIONE

Le biotecnologie offrono opportunità di grande rilevanza per la riduzione a breve termine dei gas serra (*greenhouse gases*, GHG) e strumenti davvero innovativi per combattere il cambiamento climatico a lungo termine. Le politiche a sostegno dello sviluppo e della diffusione di soluzioni basate sulle biotecnologie per fronteggiare il riscaldamento del Pianeta dovrebbero far parte degli sforzi di qualsiasi governo nazionale per contribuire alla mitigazione del cambiamento climatico.

Questo documento esamina gli attuali contributi delle biotecnologie alla mitigazione di gas climalteranti, identificando le soluzioni ormai consolidate e quelle invece emergenti, basate sullo sfruttamento della catalisi microbica e dotate delle maggiori potenzialità per incidere in maniera sostanziale sull'inversione del cambiamento climatico. Tutto ciò, sia attraverso la produzione di matrici energetiche rinnovabili e a ridotta impronta di carbonio (biocarburanti), sia attraverso la cattura, l'uso e lo stoccaggio del carbonio liberato nei processi di combustione in forma di CO₂ (tecnologie *Biomass Energy* [o *Bio-Energy*] *with Carbon Capture and Storage*, BECCS).

Per la maggior parte dell'esistenza del genere umano protrattasi sul nostro Pianeta, la vita è stata sostenuta dallo sfruttamento di prodotti riconducibili a biomassa rinnovabile: piante e altre matrici organiche da specie viventi. Negli ultimi 150 anni, tuttavia, gran parte della nostra economia è diventata dipendente dal petrolio e da altre risorse non rinnovabili di natura fossile. Le conseguenze ambientali di questo passaggio, dalle risorse rinnovabili alle risorse non rinnovabili, sono ben documentate e ormai sotto gli occhi di tutti (Lelieveld et al., 2019). Al netto del sostanziale contributo dei combustibili fossili

alle emissioni climalteranti, giusto per avere un'idea delle dimensioni di un altro problema legato all'impiego massiccio di fonti energetiche non rinnovabili, basta ricordare che i soli Stati Uniti hanno consumato – nel 2019, prima della pandemia – oltre 7,5 miliardi di barili di petrolio (più di 1 miliardo di tonnellate), parte dei quali è stata trasformata in plastica. Questa situazione – se riportata alla serie degli anni a noi più vicini – ha significato negli USA il rilascio su base annua di 35 milioni di tonnellate di residui plastici nell'ambiente insieme al flusso complessivo dei rifiuti (EIA, 2021; Statista, 2021).

Fortunatamente, le biotecnologie hanno d'altra parte fornito e continuano a offrire alternative più sostenibili incentrate sull'ottenimento di prodotti cosiddetti *bio-based*, cioè derivanti da matrici biologiche, quali combustibili, polimeri e altre sostanze fin qui ottenute attraverso la chimica del petrolio. In tal senso, interessanti opzioni sono state messe a punto negli ultimi decenni, seppur su questo fronte sia ancora richiesto uno sforzo sostanziale. Le alternative *bio-based* presentano infatti un'impronta di carbonio significativamente ridotta rispetto alle filiere tradizionali, con evidenti vantaggi ambientali. La possibilità di incrementare il peso di queste opzioni rimane comunque strettamente legata alla disponibilità di biomassa sostenibile. Chi oggi si oppone a questa prospettiva ritiene che tale biomassa non potrà esser – in tempi ragionevoli – disponibile in quantità sufficiente per soddisfare la crescente domanda. Le biotecnologie stanno tuttavia dando un contributo sostanziale allo sviluppo di nuovi filiere sostenibili anche per produrre biomassa destinabile alla trasformazione mediante catalisi microbica, per migliorare i raccolti delle colture esistenti e per utilizzare la biomassa che altrimenti sarebbe un rifiuto.

Le biotecnologie si candidano perciò – a pieno titolo – come formidabile strumento nell'ambito delle iniziative di attuazione di una efficace transizione ecologica, in modo specifico, per quanto segue.

Le biotecnologie possono svolgere un ruolo nodale nel rendere sostenibile un ampio novero di cicli produttivi

La produzione industriale è infatti – in generale – un'importante sorgente di gas serra per il ricorso all'uso di caldaie e forni, per l'adozione di processi basati sulla sintesi per via chimica e a causa del rilascio di sostanze gassose ad alto potenziale climalterante come il metano e gli idrocarburi fluorurati. Le biotecnologie offrono in questo ambito una varietà di opzioni per mitigare le emissioni da parte dei suddetti processi, riducendo la necessità dei quantitativi energetici impiegati, rendendo più efficiente la lavorazione dei materiali e sostituendo i composti a oggi utilizzati con altri maggiormente ecocompatibili. Attraverso processi biotecnologici (digestione anaerobica) è possibile sostituire – almeno in parte – il metano di origine fossile con gas naturale a

impronta neutra. In un Paese fortemente industrializzato come gli Stati Uniti, il settore manifatturiero si rende responsabile del 24% delle emissioni totali di gas a effetto serra (EPA, 2021) e sebbene nessuna singola tecnologia o strategia possa risolvere da sola il problema, le biotecnologie offrono opportunità per produzioni industriali a basse emissioni in molti settori.

Le biotecnologie rappresentano un efficace strumento per lo sviluppo di prodotti a basse emissioni di carbonio

Con l'aumento della sempre più ampia consapevolezza della crisi climatica, i consumatori chiedono la disponibilità di servizi a basse emissioni di carbonio e la sostituzione di molti prodotti esistenti con altri a minor impronta ambientale (Carbon Trust, 2022). Ciò significa trovare alternative per servizi e beni di consumo a basse emissioni che forniscano tuttavia lo stesso livello di prestazioni, la medesima durata e siano sostenibili in termini di costo rispetto a quanto ottenuto con processi maturi basati sul consumo di matrici fossili. Di fatto, le biotecnologie consentono l'ottenimento di prodotti per il consumo, cosiddetti a basso tasso di emissioni di carbonio, attraverso la sostituzione delle matrici fossili con la biomassa o con altre materie prime a base di carbonio riciclato, consentendo così una produzione più efficiente e basata sul biologico e soddisfacendo un segmento di mercato sempre più importante.

Le biotecnologie possono contribuire al sequestro del carbonio

Mentre sussiste ancora incertezza circa gli scenari di un futuro sostenibile, alcuni aspetti ricorrono come caratteristica comune in tutte le possibili rappresentazioni. Uno di questi aspetti riguarda il dispiegamento di tecnologie per il sequestro e stoccaggio in grande scala del carbonio (CCS, *Carbon Capture and Storage*), in grado di convertire il carbonio in una forma che non contribuisce al cambiamento climatico, riciclandolo per specifiche produzioni ovvero immagazzinandolo sottoterra. Le tecnologie CCS non rappresentano tuttavia l'unico o financo la soluzione primaria per il contrasto al cambiamento climatico, ma possono di sicuro dare un contributo davvero importante. In questo scenario, le biotecnologie possono rivestire un ruolo fondamentale nell'implementazione delle strategie CCS, rendendole più abbordabili.

Focalizziamo ora la nostra attenzione sullo stato dell'arte in merito alla messa a punto e al rafforzamento delle produzioni ecosostenibili, con riferimento particolare ai biocombustibili, e alle filiere biotecnologiche per la cattura, l'uso e lo stoccaggio del carbonio.

BIOCOMBUSTIBILI A ELEVATA PRESTAZIONE

I biocarburanti liquidi sono stati tra i primi prodotti biotecnologici a essere ottenuti e implementati su larga scala allo scopo di incidere sulle emissioni di gas serra (GHG). In una prima fase (all'incirca, nel periodo compreso tra il 1970 e il 2010), la produzione aveva assunto principalmente la forma dei biocarburanti cosiddetti di prima generazione: bioetanolo e biodiesel, derivati da materie prime come mais e altre derrate amilacee ovvero oli di natura vegetale. Tuttavia, le preoccupazioni rispetto alla concorrenza per queste materie prime con la produzione di alimenti e mangimi zootecnici hanno spinto verso lo sviluppo di biocarburanti liquidi di seconda generazione, prodotti a partire da matrici sempre a bassa intensità di carbonio, quali le biomasse ligno-cellulosiche.

Le filiere per la produzione dei biocarburanti di prima generazione si sono sin qui basate, da una parte, sulla fermentazione a etanolo [bioetanolo] di materie prime ricche di amido o di zuccheri (fig. 1) mentre, dall'altra, sulla trans-esterificazione o – in tempi più recenti – sull'idro-trattamento (idrogenazione) di oli di derivazione vegetale per la produzione di diesel da matrici a bassa intensità di carbonio (biodiesel, BD, nel primo caso, e diesel rinnovabile, RD, nel secondo).

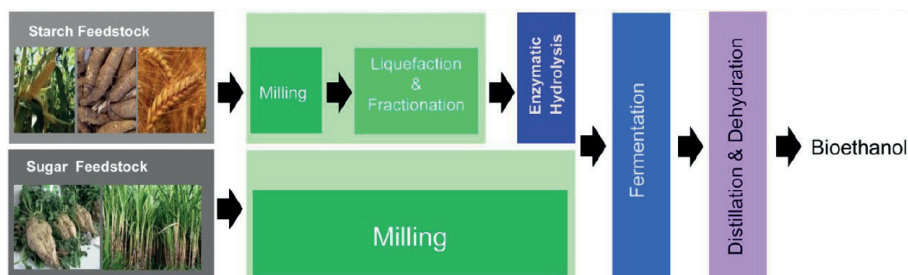


Fig. 1 Produzione di bioetanolo da biomasse di prima generazione (da: Devarapalli & Atiyeh, 2015)

Il biodiesel, costituito da una miscela di esteri metilici degli acidi grassi (*Fatty Acid Methyl Esters*, FAME), rappresenta la prima generazione di biodiesel ed è ottenuto dalla trans-esterificazione di olio vegetale, con metanolo e una base forte (NaOH o KOH) come catalizzatore. Nel processo di trans-esterificazione, il metanolo viene in pratica miscelato con una base, quale – per esempio – NaOH. L'NaOH in metanolo si ionizza. L'-OH reagisce con l' H^+ del metanolo, con formazione di H_2O e contestuale liberazione di $-OCH_3$ che a sua volta reagisce con l'acido grasso (fig. 2).

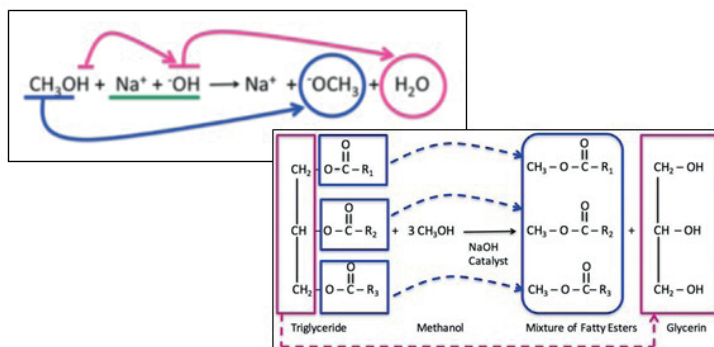


Fig. 2 Produzione di biodiesel mediante processo di trans-esterificazione

Tuttavia, il biodiesel FAME manifesta alcuni inconvenienti come carburante negli attuali motori diesel perché sia i legami $\text{C}=\text{C}$ che i legami $\text{C}=\text{O}$ presenti ne limitano la capacità antiossidante. Inoltre questo tipo di biodiesel è meno infiammabile delle paraffine presenti nel normale diesel da petrolio. Nei propulsori tradizionali il biodiesel FAME deve essere miscelato in percentuale non superiore al 20% ovvero, senza previa miscelazione, in motori di ultima generazione debitamente adattati.

Il biodiesel idrogenato (BHD), noto come biodiesel di nuova generazione o – come sopra accennato – diesel rinnovabile (RD), è prodotto invece – abbiamo detto – a seguito dell'idro- trattamento (idrogenazione) anziché della trans-esterificazione degli oli vegetali di partenza (fig. 3). Il risultato finale è una miscela di paraffine ottenuta a partire dall'olio vegetale iniziale dopo che tutti i doppi legami $\text{C}=\text{C}$ insaturi sono stati idrogenati e tutti gli atomi di ossigeno sono stati eliminati durante il processo di idro-trattamento, con contestuale decarbossilazione. Di conseguenza, la composizione chimica sia del normale diesel da petrolio che del BHD da oli vegetali è largamente la stessa: sono appunto entrambe miscele di paraffine. Il BHD ha perciò caratteristiche prestazionali simili a quelle del gasolio di origine petrolifera, rispetta le stesse specifiche di prodotto e può essere utilizzato in qualsiasi motore diesel, a qualsiasi concentrazione.

Storicamente la maggior parte dei BD e dei RD è stata prodotta a partire – scala mondo – da olio di soia, da olio di palma o da oli derivanti da altre colture dedicate (EPA, 2017). La necessità di nuove materie prime per la produzione di biodiesel è comunque cresciuta nell'ultimo decennio, con conseguente maggior bisogno di substrati di partenza a bassa intensità di carbonio. Alcune di queste nuove materie prime sono rappresentate da prodotti di scarto – come gli oli alimentari di cottura esausti – dei quali tuttavia non è facile la conversione in biodiesel al pari dei substrati nobili di prima generazione.

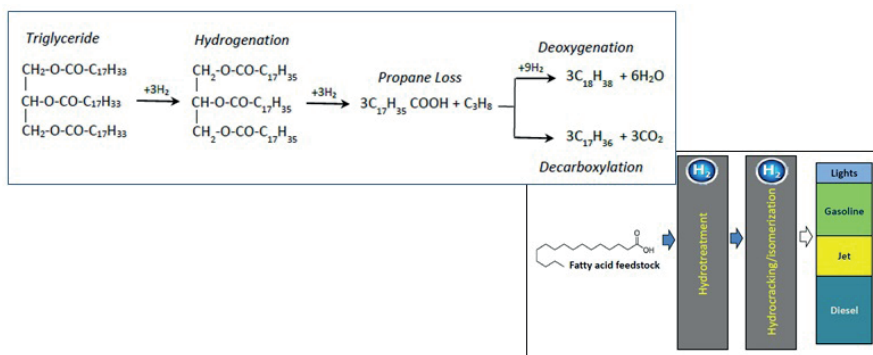


Fig. 3 Idro-trattamento (idrogenazione) di oli vegetali per la produzione di biodiesel di nuova generazione (BDH). Un catalizzatore a base di Ni-Mo promuove la reazione in condizioni di elevata pressione, su un letto a flusso mantenuto a 350 °C in atmosfera di idrogeno a 4 MPa

A questo fine, sono stati sviluppati biocatalizzatori che migliorano l'efficienza di conversione e le caratteristiche prestazionali del biodiesel ottenuto dalle materie prime di scarto (Hobden, 2014), consentendo la trasformazione di una cospicua parte di essi in carburante per il trasporto a bassa emissione di carbonio. La catalisi enzimatica viene condotta prevalentemente ricorrendo a lipasi di origine microbica, derivate da ceppi di batteri (*es.*, tra gli altri, ceppi dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas*), funghi filamentosi (*es.*, tra gli altri, ceppi dei generi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*) e lieviti (*es.*, tra gli altri, ceppi dei generi *Candida* e *Rhodotorula*). Di fatto, le lipasi presentano un'eccellente attività catalitica e stabilità in mezzi non-acquosi, associata a regioselettività ed enantioselettività, proprietà queste che facilitano le reazioni di trans-esterificazione (Thangaraj et al., 2019).

Anche sul fronte della produzione biotecnologica di etanolo, recenti progressi nell'isolamento di nuovi efficaci biocatalizzatori (ceppi microbici selvaggi) e nello sviluppo di microrganismi ingegnerizzati (*es.*, tra i batteri, *Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Clostridium phytofermentans*, *Caldicellulosiruptor bescii* e, nell'ambito dei lieviti, sia ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sia ceppi termotolleranti di *Kluyveromyces marxianus* e *Candida* sp.) hanno reso possibile la produzione di bioetanolo da substrati di seconda generazione di natura ligno-cellulosica, quali piante erbacee e arbustive ovvero colture energetiche dedicate, comunque compatibili con l'esigenza primaria delle produzioni alimentari (Singh et al., 2018).

In questo caso le matrici di partenza sono sottoposte a una prima fase di idrolisi enzimatica per scomporre la cellulosa e l'emicellulosa in gluco-

sio e negli altri zuccheri fermentescibili costituenti. Microrganismi naturalmente in grado di fermentare il glucosio sono stati ingegnerizzati per renderli capaci di fermentare anche zuccheri semplici – sia pentosi (*es.* arabinosio e xilosio) che esosi (*es.* mannosio e galattosio) – derivanti dalle emicellulose, migliorando così le rese e l'efficienza della produzione di bioetanolo (fig. 4).

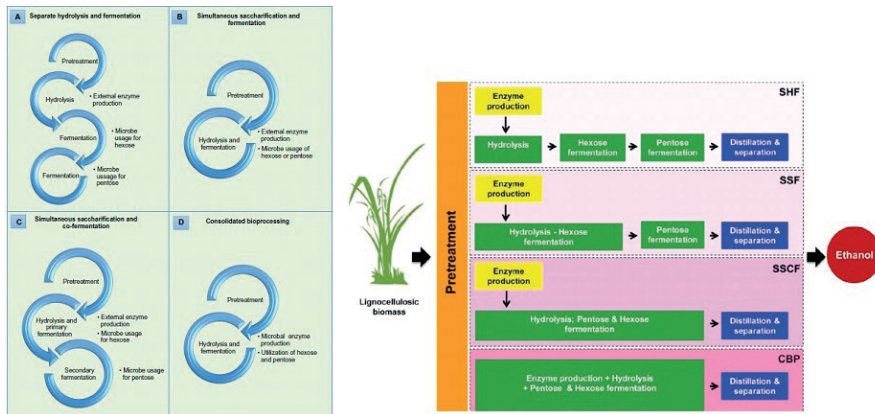


Fig. 4 Configurazione delle diverse filiere di processo per la trasformazione di biomasse ligno-cellulosiche in bioetanolo: (SHF, Separate Hydrolysis & Fermentation) Separazione di idrolisi e fermentazione; (SSF, Simultaneous Saccharification & Fermentation) Saccarificazione e fermentazione simultanee; (SSCF, Simultaneous Saccharification & Co-Fermentation) Saccarificazione e co-fermentazione simultanee; (CBP, Consolidated Bioprocessing); Bioprocessi consolidati vale a dire con la dotazione enzimatica per le fasi dell'intero processo espressa da un singolo microrganismo (schema a sinistra, da: Mbaneme-Smith and Chinn, 2015; schema a destra, da: Hamelinck et al., 2005)

Una fase iniziale assai entusiastica di costruzione di bioraffinerie per la produzione di etanolo da matrici ligno-cellulosiche si è verificata negli USA a partire dal 2009 in seguito all'attuazione del programma federale *Renewable Fuel Standard* (RFS). I maggiori produttori di etanolo di prima generazione – come il gigante POET, LLC – hanno allora collaborato con i principali innovatori in ambito biotecnologico per costruire impianti di biocarburanti da biomasse cellulosiche – primi nel loro genere – negli Stati Uniti, in Europa e in Sud America, anche secondo schemi di processo cosiddetti consolidati (*Consolidated Bioprocessing*, CBP), basati cioè sulla contestuale associazione di produzione enzimatica, idrolisi, saccarificazione e fermentazione dei diversi zuccheri del substrato di partenza in un unico stadio (fig. 5).

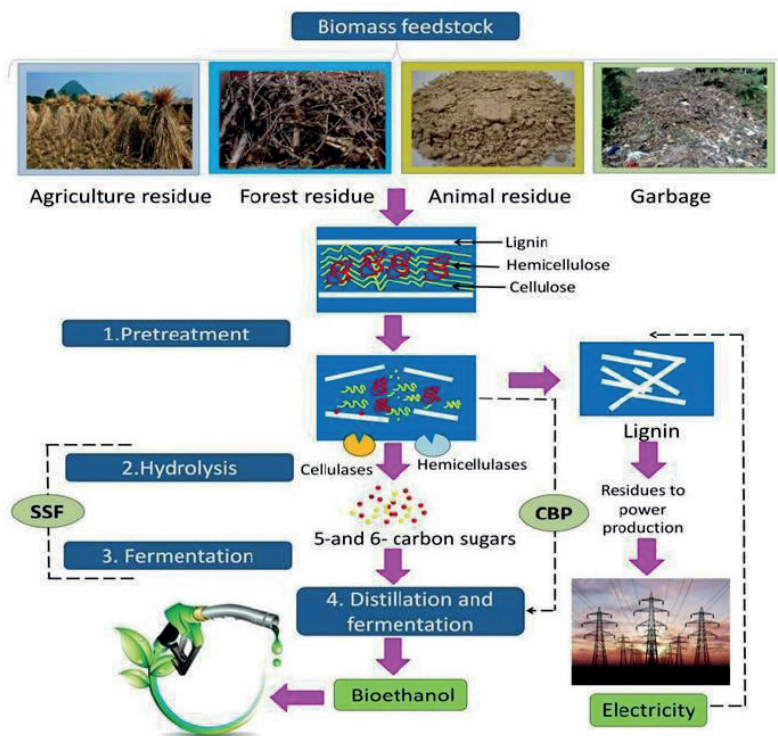


Fig. 5 Rappresentazione schematica del processo per la produzione di bioetanolo a partire da matrici ligno-cellulosiche [SSF = Simultaneous Saccharification and Fermentation; SHF = Separate Hydrolysis and Fermentation; CBP = Consolidated Bioprocessing] (da: Singh et al., 2018)

La piena potenzialità dei biocarburanti ottenuti da substrati ligno-cellulosici per un sostanziale contributo alla mitigazione dei cambiamenti climatici dipenderà tuttavia dall'ampiezza del dispiegamento della tecnologia a valere sui residui agricoli, sui rifiuti solidi urbani (RSU) e su colture energetiche dedicate. Sebbene i bassi prezzi del petrolio abbiano sin qui rappresentato un ostacolo all'affermazione di queste filiere, il deterioramento del quadro internazionale circa gli approvvigionamenti energetici da fonti fossili è destinato comunque a spingere verso una seria riconsiderazione del ricorso ai biocarburanti, al netto della consapevolezza dell'importante ricaduta ecologica di queste produzioni. Altro fattore che ha fino ad oggi limitato un sostanziale impatto positivo derivante dall'uso del bioetanolo in ordine alla mitigazione dei GHG è stato rappresentato dal fatto che l'impiego di questo biocarburante si è dimostrato efficace laddove miscelato con la benzina in misura non su-

periore al 15% in volume, anche se poi la maggior parte delle miscele correnti prevedono un presenza di etanolo intorno al 10%.

Tuttavia, nessuno dei due biocombustibili sin qui presi in considerazione si è rivelato in grado di sostituire combustibili fossili specializzati come il carburante per aerei. È vero però che i progressi tecnologici hanno portato all'ottenimento di una nuova categoria di biocarburanti cosiddetti *drop-in*, così chiamati per la loro capacità di essere impiegati in sostituzione diretta o come integrazione ai carburanti per l'aviazione, senza alcuna modifica dei motori e perciò con un potenziale di decarbonizzazione assai maggiore rispetto a quello raggiungibile nel comparto dei carburanti per autotrazione.

Il biobutanolo (butanolo derivato dalla biomassa) è stato tra i primi ad attirare l'attenzione per le sue proprietà di miscibilità con prodotti petroliferi (proprietà *drop-in*), in quanto ha un comportamento chimico più simile a quello di un idrocarburo rispetto all'etanolo. Sebbene venga ad oggi considerato soprattutto come un intermedio nella produzione di idrocarburi rinnovabili, l'elevato rapporto di equivalenza energetica del biobutanolo rispetto all'etanolo e la capacità di essere miscelato efficacemente con la benzina fino al 16% in volume consentono a questo prodotto di sostituirsi a volumi di benzina corrispondentemente maggiori rispetto al bioetanolo.

Il biobutanolo viene prodotto tramite fermentazione a partire dagli stessi zuccheri semplici utilizzati per la produzione di bioetanolo. Molte specie del genere *Clostridium* sono produttrici naturali di n-butanolo attraverso un percorso acetil-CoA-dipendente. Le specie più note di *clostridia* che producono biobutanolo sono *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoacetobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. cadaveris*, *C. sporogenes*, *C. pasteurianum* e *C. tetanomorphum*. Alcuni produttori di biocarburanti ricorrono invece a lieviti geneticamente modificati per la sintesi di iso-butanolo (fig. 6).

Il biobutanolo (butanolo + iso-butanolo) può essere prodotto anche da substrati lignocellulosici ricorrendo a ceppi microbici che possiedono proprietà sia cellulolitiche che solventogeniche. Vi è grande interesse a sviluppare questa via di certo meno costosa di un processo in cui la produzione di enzimi idrolitici, la saccharificazione della cellulosa e la fermentazione microbica avvengono separatamente. Bioprocessi consolidati (CBP) sono quelli che vedono coinvolti ceppi ingegnerizzati di *Clostridium cellulolyticum* e *Clostridium cellulovorans* (fig. 7). Il biobutanolo può anche essere ottenuto sfruttando microrganismi ingegnerizzati a partire da carboidrati presenti in alcuni ceppi di microalghe e che rimangono dopo l'estrazione dei lipidi dalla biomassa algale, consentendo così alle microalghe di fungere da materia prima simultanea sia per la produzione di biobutanolo che per la produzione di biodiesel.

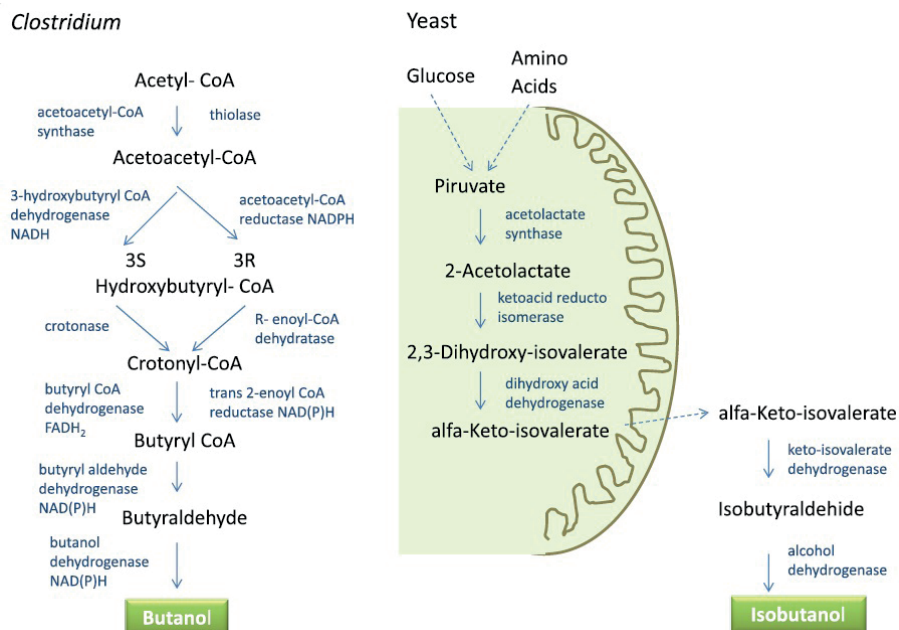


Fig. 6 Schema delle vie metaboliche per la sintesi di biobutanolo nei batteri del genere *Clostridium* e nei lieviti (da: Becerra et al., 2015)

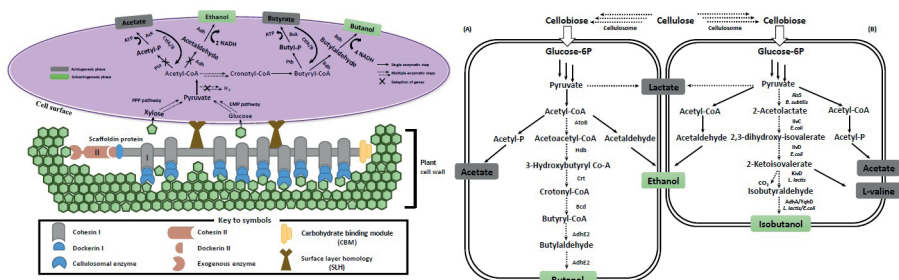


Fig. 7 A sinistra: rappresentazione schematica della sintesi di butanolo a partire da cellulosa mediante bioprocesso consolidato (CBP) da parte delle specie di *Clostridium cellulosoliticum*. È evidenziata la struttura del cellulosome, comprese le componenti proteiche dei moduli relativi al complesso. A destra: schema delle vie metaboliche in un ceppo di *Clostridium cellulosoliticum* per la produzione combinata di butanolo e isobutanolo da cellulosa mediante bioprocesso consolidato (CBP). [A] La via ingegnerizzata per la sintesi di butanolo; [B] La via ingegnerizzata per la sintesi di isobutanolo (modificato da: Xin et al., 2019)

Come accennato, in tempi più recenti, il biobutanolo ha attirato l'interesse come passaggio chiave verso la produzione di combustibili idrocarburici a

base di iso-ottano da fonti rinnovabili e carburanti per l'aviazione sostenibili in termini ambientali [*Sustainable Aviation Fuel*, SAF]. A differenza del biobutanolo, che è un alcol, l'iso-ottano da fonti rinnovabili e il SAF sono idrocarburi con caratteristiche prestazionali molto simili ai rispettivi omologhi fossili (l'iso-ottano è un importante componente di miscelazione nella benzina). Le proprietà dei bio-alcoli (in pratica, molecole ossigenate) sono di fatto assai diverse da quelle delle miscele di idrocarburi tipiche di benzina, diesel e carburanti per jet.

L'etanolo e il butanolo possono causare problemi di corrosione in motori progettati per funzionare con carburanti idrocarburi. Pertanto, al fine di produrre un carburante *drop-in* a partire dagli alcoli, le differenze nelle proprietà fisiche e chimiche tra quest'ultimi e i carburanti convenzionali devono essere ridotte al minimo. Ciò si può ottenere attraverso il processo che comprende tre fasi: disidratazione dell'alcol, oligomerizzazione e idrogenazione (fig. 8).

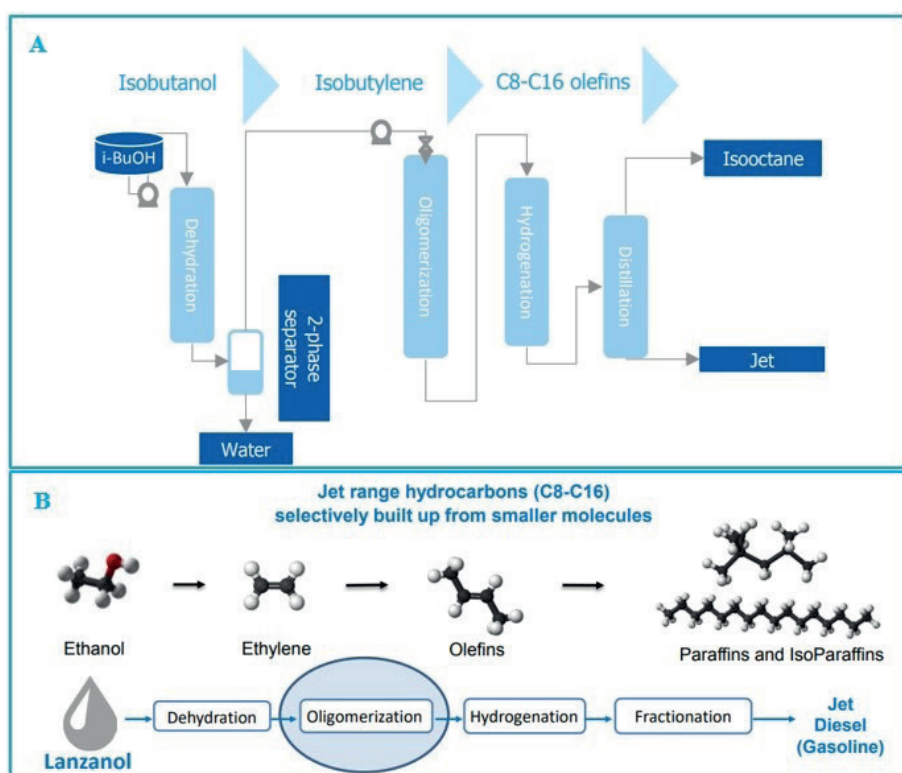


Fig. 8 Schema di processo di conversione dell'iso-butanolo in idrocarburi attraverso passaggio dalle fasi di disidratazione, oligomerizzazione e idrogenazione

Storicamente la conversione di biomasse direttamente in idrocarburi tramite fermentazione ha incontrato il limite nella presenza di ossigeno nei substrati di partenza, presenza che favorisce i microrganismi nella formazione di prodotti ossigenati (in prevalenza, alcoli). L'ingegneria metabolica (fig. 9) – attraverso l'incremento della selettività dei microrganismi fermentanti (batteri e lieviti, soprattutto) – consente oggi di migliorare la resa in idrocarburi, con produzione di una sorta di cherosene, vale a dire una miscela di composti comuni al carburante per aviazione di origine fossile (Kang and Nielsen, 2017). Per altro, gli idrocarburi hanno proprietà idrofobe; non richiedono perciò – in fase di distillazione – il dispendio di elevata energia, così come invece viene richiesto per la raffinazione di alcoli combustibili.

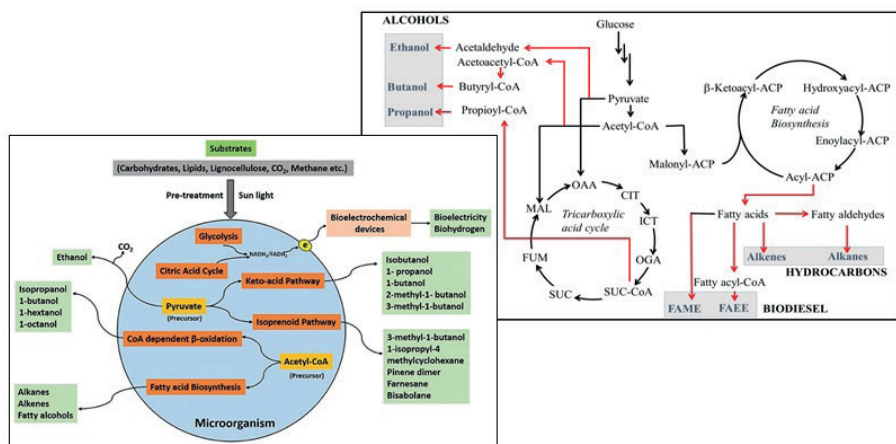


Fig. 9 Vie metaboliche di sintesi di alcoli a catena corta e media e produzione di idrocarburi in una cellula batterica ingegnerizzata. Il glucosio viene metabolizzato ad acetil-CoA, un precursore del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e delle vie biosintetiche degli acidi grassi. Gli alcoli a catena corta (etanolo, propanolo, butanolo) sono prodotti a partire da acetil-CoA attraverso il TCA. Gli alcoli grassi, gli esteri etilici degli acidi grassi e gli n-alcani sono prodotti utilizzando i trasportatori (acyl-ACP, Acyl Carrier Proteins) del macchinario biosintetico degli acidi grassi (schema a sinistra, da: Kumar and Kumar, 2017; schema a destra, da: Rahman et al., 2018)

Ancora per fornire un riferimento circa la tendenza nei Paesi più industrializzati, vale la pena considerare che i biocarburanti costituiscono attualmente circa il 12% del carburante per il trasporto su strada nei soli Stati Uniti. Di fatto, il bioetanolo e il biodiesel rappresentano la grande maggioranza del consumo di biocarburanti negli USA. Già nel corso di questi primi anni 2020 e poi a seguire, si prevede una produzione di biocarburanti di 2^a generazione in

rapida crescita, di pari passo con la disponibilità di nuovi substrati e di nuove vie metaboliche rese possibili dallo sviluppo delle biotecnologie (fig. 10).

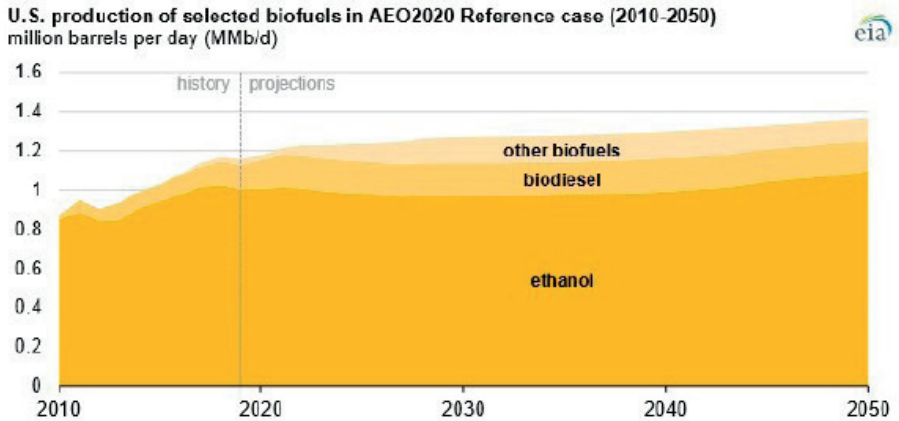


Fig. 10 *Stima dei volumi della produzione USA per tipo di biocarburante nel periodo 2010-2050 (fonte: US Energy Information Administration)*

È inoltre interessante sottolineare come le emissioni di gas serra non sono l'unica forma di inquinamento atmosferico che può esser ridotta con l'uso dei biocarburanti. Le emissioni di inquinanti di riferimento (i cosiddetti CAC, *Criteria Air Contaminants*) quali monossido di carbonio, particolato e anidride solforosa hanno un impatto diretto sulla salute umana. La combustione di biocarburanti comunemente impiegati in miscela o in forma non miscelata riduce il rilascio di molti di questi inquinanti (seppur non di tutti!) derivanti in gran quantità invece dalla combustione dei combustibili di origine petrolifera.

CATTURA, UTILIZZO E STOCCAGGIO DEL CARBONIO SIA DI ORIGINE BIOLOGICA CHE FOSSILE

Tutte le forme di biomassa che derivano dallo sfruttamento della fotosintesi catturano l'anidride carbonica atmosferica e la convertono in composti organici. Il contenuto di carbonio di questa biomassa rimane sequestrato fino a quando queste matrici non vanno incontro a mineralizzazione - in gran parte attraverso processi ossidativi - con rilascio di CO_2 in atmosfera. In particolare, è attraverso la combustione che la biomassa - sia nella sua forma nativa che a seguito di conversione in biocombustibile - rilascia il suo contenuto di carbonio sotto forma di anidride carbonica. Sebbene possa

considerarsi a bilancio di carbonio neutro (*carbon neutral*), nel senso che il carbonio biogenico rilasciato corrisponde a quello catturato precedentemente dall'atmosfera durante la stagione di formazione della biomassa, la combustione tradizionale non prevede il sequestro e l'utilizzo del carbonio prima che nuova biomassa si sia a sua volta generata. Oggi – in ragione del contrasto al riscaldamento globale – si guarda con crescente interesse alle tecnologie di cattura e stoccaggio del carbonio (CCS, *Carbon Capture and Sequestration/Storage*). Queste tecnologie consentono di intercettare le emissioni di anidride carbonica da impianti industriali a elevato rilascio di CO_2 , quali centrali termo-elettriche e inceneritori di rifiuti o strutture impiantistiche energivore come cementifici e impianti siderurgici, e di immagazzinarle nel sottosuolo (fig. 11).

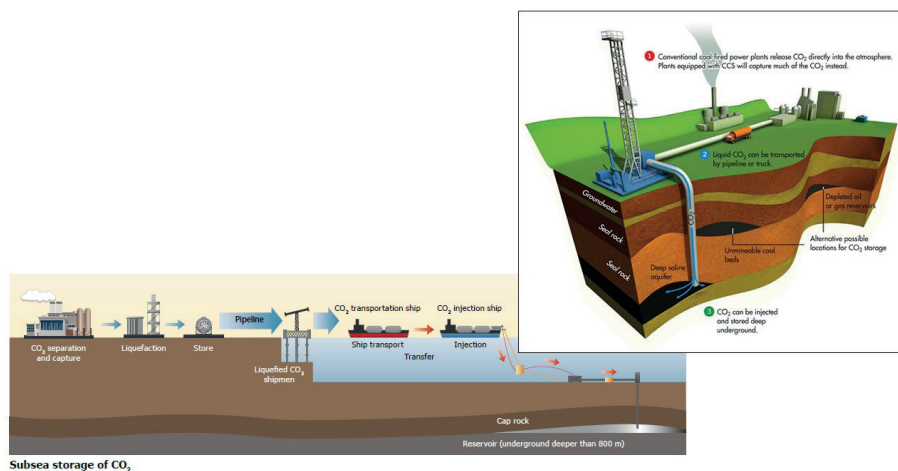


Fig. 11 *Rappresentazione grafica delle procedure di cattura e confinamento della CO_2 nel sottosuolo o al disotto dei fondali marini (fonte: Japanese Ministry of the Environment)*

Attraverso le tecnologie CCS è possibile ridurre significativamente la CO_2 rilasciata in atmosfera. L'applicazione, ad esempio, del principio CCS a una centrale a carbone con una potenza di 800 MW, in grado di fornire energia a circa 270mila famiglie, può evitare circa 3,4 milioni di tonnellate di emissioni di CO_2 su base annua. Tuttavia, le tecnologie CCS – basate su processi fisico-chimici – ad oggi considerate sono sistemi a elevata intensità energetica. Attualmente, circa il 30% del carbonio catturato viene infatti bilanciato dalla combustione di matrici fossili necessaria per separare, comprimere, trasportare e iniettare nel sottosuolo il carbonio intercettato.

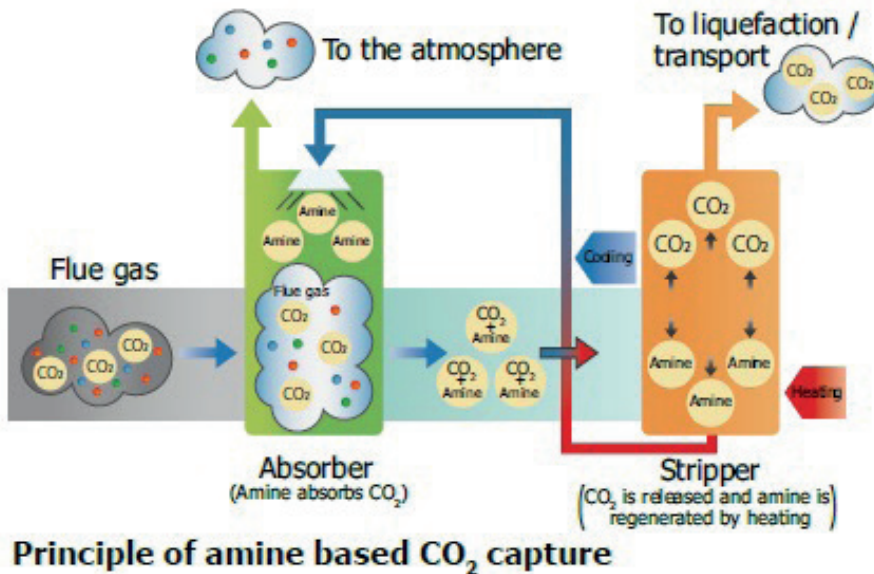


Fig. 12 Cattura della CO₂ da gas di combustione mediante assorbimento su colonne caricate con mono-etanol-ammina (fonte: Japanese Ministry of the Environment)

Per la cattura dell'anidride carbonica si ricorre oggi diffusamente a colonne di assorbimento caricate con mono-etanol-ammina (MEA), una sostanza chimica in grado di trattenere una grande quantità di CO₂ altamente pura dai gas di combustione delle centrali termoelettriche o di altri impianti. Consentendo a un flusso di gas di combustione di entrare in contatto con la soluzione di ammina, avviene l'assorbimento dell'anidride carbonica. Riscaldando poi questa soluzione contenente CO₂ a circa 120°C, l'ammina e la CO₂ vengono separate l'una dall'altra e la CO₂ può essere così compressa e liquefatta (fig. 12).

Per rendere quantomeno più economicamente efficaci i sistemi CCS, oggi si guarda con interesse alla possibilità di utilizzare la CO₂ da processi di combustione come risorsa, convertendola in intermedi chimici per molte filiere industriali di sintesi o sfruttandola per un utilizzo diretto. Tuttavia, poiché la conversione della CO₂ nelle suddette sostanze chimiche – via *syngas* (acronimo per *synthesis gas*) – richiede energia, l'orientamento è quello di ricorrere a metodi che non utilizzino combustibili fossili quanto piuttosto fonti di energia rinnovabile. D'altra parte, esempi di utilizzo diretto della CO₂ includono il recupero avanzato del petrolio (*Enhanced Oil Recovery*, EOR) che prevede l'iniezione di anidride carbonica nei giacimenti petroliferi in fase di sfruttamento avanzato per facilitare il recupero del greggio (fig. 13).

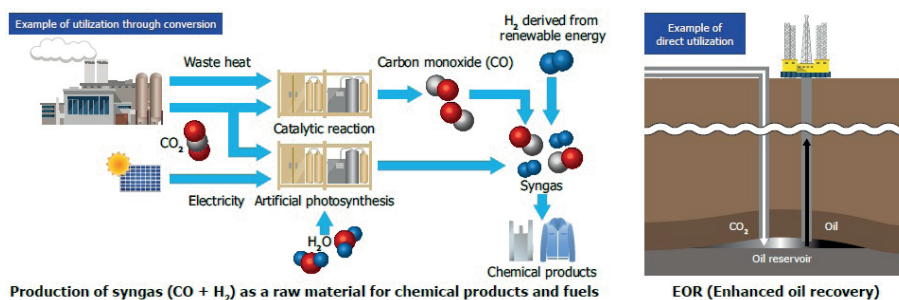


Fig. 13 *Filiere CCUS (Carbon Capture, Utilisation and Storage) per la valorizzazione della CO₂ catturata, basate su tecnologie di tipo fisico-chimico (fonte: Japanese Ministry of the Environment)*

Laddove invece si produce energia da biomassa vegetale, la matrice ligno-cellulosica che si è generata attraverso l'assorbimento di CO₂ dall'atmosfera viene utilizzata come combustibile. Se l'anidride carbonica che si libera dalla combustione (già di per sé a impatto neutro) viene catturata e immagazzinata nel sottosuolo secondo la tecnologia CCS, alla fine il bilancio dell'emissione di CO₂ nell'aria può risultare negativo in quanto porta a una riduzione netta del contenuto di anidride carbonica in atmosfera.

Questa combinazione viene indicata con l'acronimo BECCS (*Biomass Energy* [o Bio-Energy] *with CCS*) ed è presa in considerazione come tecnologia chiave per giungere – nel breve-medio termine – a emissioni zero nei casi in cui sia disponibile biomassa ai fini della produzione di energia elettrica (fig. 14).

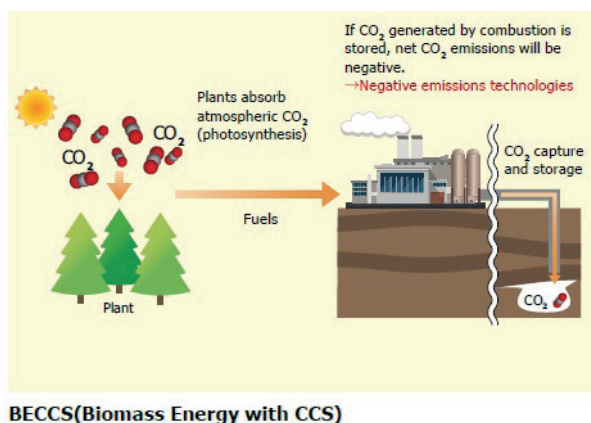


Fig. 14 *Rappresentazione schematica della filiera BECCS basata sull'utilizzo di biomassa vegetale come combustibile per la generazione di energia elettrica (fonte: Japanese Ministry of the Environment)*

Ma torniamo a considerare i processi basati sulla catalisi microbica in grado di trasformare in intermedi chimici di interesse economico la CO_2 e altri composti gassosi contenenti carbonio derivanti dall'utilizzo a fini energetici di matrici carboniose, sia di origine vegetale sia fossile, oltre che dalla termovalorizzazione dei rifiuti solidi urbani. Il riferimento è al già citato *syngas* che si genera a seguito del processo di gasificazione della biomassa ligno-cellulosica o di altre matrici energetiche.

La gasificazione è di fatto il processo di trattamento termico di materiali carboniosi a temperature intorno ai $700\text{ }^\circ\text{C}$, in presenza di modeste concentrazioni di ossigeno che escludono la completa combustione. A seguito di questo trattamento, la matrice carboniosa genera una miscela gassosa contenente – in prevalenza – CO , CO_2 e H_2 . Quest'ultimi gas – una volta liberati da impurezze quali CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 , H_2S , NH_3 , carbonil solfuro (COS), acido cianidrico (HCN) e ossido nitrico – possono essere convertiti da batteri acetogenici in biocarburanti e altre sostanze chimiche. La fermentazione del *syngas* è perciò un processo di bio-conversione indiretta del substrato di partenza. A differenza dei processi di idrolisi/fermentazione, la fermentazione a carico del *syngas* è infatti un processo di fermentazione indiretta dal momento che le matrici carboniose di partenza non vengono alimentate direttamente nel bioreattore per generare i prodotti della catalisi microbica. I substrati carboniosi devono esser prima gasificati a formare il *syngas*, il quale viene poi purificato da eventuale sostanze indesiderate e raffreddato prima di essere immesso nel fermentatore.

In condizioni anaerobiche, batteri acetogenici come *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Alkalibaculum bacchi* e *Clostridium ragdalei* fungono da biocatalizzatori (Phillips et al., 1994; Liou et al., 2005; Wilkins & Atiyeh, 2011; Liu et al., 2012;). Nella fermentazione del *syngas*, i batteri acetogenici metabolizzano CO , CO_2 e H_2 in alcoli e acidi organici. Le reazioni biochimiche complessive per convertire il *syngas* in etanolo e acido acetico sono mostrate di seguito (fig. 15).

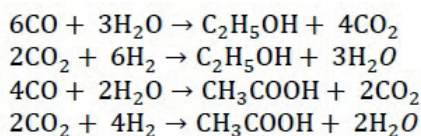


Fig. 15 Reazioni biochimiche complessive di conversione del *syngas* in etanolo e acido acetico (da: Klasson et al., 1990; Vega et al., 1990)

Di fatto, il monossido di carbonio (CO) può essere metabolizzato anaerobicamente da un ampio novero di microrganismi: fotosintetici, acetogenici,

carbossidotrofi e metanogeni per produrre idrogeno, metano, acetato, butirrato, etanolo e butanolo come prodotti finali (Mörsdorf et al., 1992; Abrini et al., 1994). Tuttavia, nell'ambito dei diversi microrganismi anaerobi, i batteri acetogenici risultano – come già accennato – di primaria importanza per la capacità di crescere chemolitotroficamente (cioè, di utilizzare composti inorganici ridotti come fonte di energia) e produrre etanolo e butanolo insieme ad acetato e butirrato a partire da CO , CO_2 , H_2 , formiato e metanolo (Mohammadi et al., 2011).

I batteri acetogenici metabolizzano composti a singolo atomo di carbonio attraverso la via dell'acetil-CoA, detta anche via Wood-Ljungdahl, che consente a questi microrganismi di (i) sintetizzare la parte acetilica dell'acetil-CoA a partire dalla CO_2 , (ii) risparmiare energia, (iii) assimilare la CO_2 come carbonio cellulare (Ljungdahl, 1986; Wood et al., 1986). L'acetil-CoA è negli acetogenici perciò un importante intermedio metabolico che può essere utilizzato per produrre etanolo, butanolo, esanolo, acetato, butirrato, esanoato e biomassa cellulare (Phillips et al., 2015).

La via di Wood-Ljungdahl è un percorso lineare e riduttivo a differenza dei processi ciclici di fissazione della CO_2 come il ciclo di Calvin-Benson e quello degli acidi tricarbossilici (Madigan et al., 2003). I batteri acetogenici non possono utilizzare il ciclo di Calvin-Benson – che è invece impiegato dagli autotrofi fotosintetici e chemiosintetici – perché mancano dell'enzima ribuloso difosfato carbossilasi (RuBisCO) (Wood et al., 1986). Si ritiene che la via di Wood-Ljungdahl possa funzionare in direzione sia dell'ossidazione che della riduzione. La conversione della CO_2 in acetato è un processo di riduzione. Tuttavia, l'acetato può essere riconvertito in CO_2 a seguito di ossidazione (Ragsdale, 1997). I batteri acetogenici conservano l'energia riducendo CO e/o CO_2 e H_2 ad acetato. Nella via Wood-Ljungdahl, la sintesi dell'acetil-CoA avviene attraverso due rami, il ramo del gruppo metile e il ramo del gruppo carbonile (fig. 16).

Uno schema di processo ibrido di gassificazione-fermentazione del *syngas* è riportato in figura 17. Come già accennato, il processo di conversione ibrida prevede la gassificazione del substrato carbonioso di partenza (biomassa vegetale o altra matrice carboniosa), seguita dalla fermentazione e – in questo caso – dalla purificazione finale di bioetanolo. In alcuni casi, i gas di scarico generati da certi processi industriali possono essere immessi direttamente nel fermentatore.

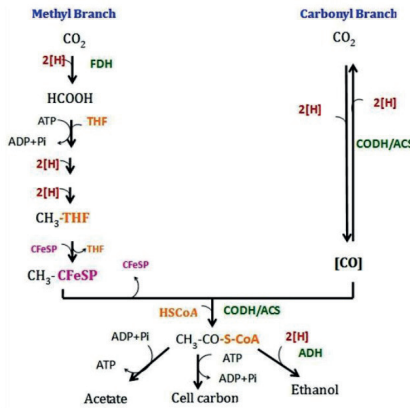


Fig. 16 Schema della via di Wood-Ljungdahl. FDH, CODH/ACS e ADH sono gli enzimi, THF, HSCoA e CH₃-CO-S-CoA sono i co-enzimi, mentre CFeSP è la proteina corrinoidale, tutte componenti coinvolte nella via metabolica. LEGENDA: FDH = formiato deidrogenasi; CODH/ACS = monossido di carbonio deidrogenasi/acetil-CoA sintasi bifunzionale; ADH = alcol deidrogenasi; CFeSP = proteina corrinoidale ferro(Fe)-zolfo(S); THF = tetraidrofolato (vitamina B9, derivato dell'acido folico); HSCoA = gruppo funzionale tiolo (SH) Coenzima A; CH₃-CO-S-CoA = acetil-coenzima A (modificato da: Drake & Daniel, 2004)

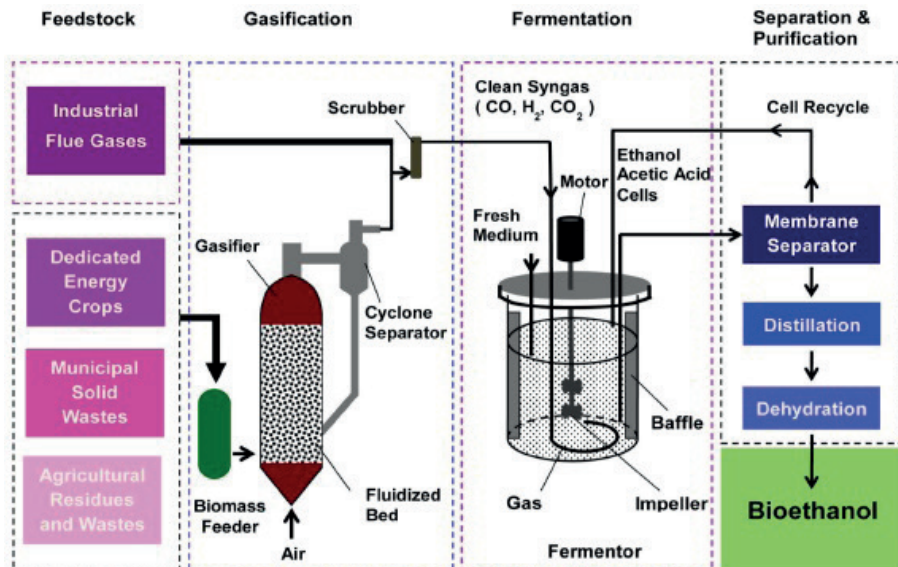


Fig. 17 Schematizzazione del processo ibrido di gasificazione seguita da fermentazione del syngas con produzione di etanolo ed acido acetico a partire da una ampia gamma di substrati carboniosi (da: Devarapalli and Atiyeh, 2015)

A fronte di tutto quanto sin qui detto, è necessario comunque evidenziare l'esistenza di limiti oggettivi alla fermentazione del *syngas*; questi limiti sono rappresentati (i) dalla scarsa solubilità e dal basso tasso di trasferimento dei substrati gassosi – soprattutto CO e H₂ – in mezzo liquido, (ii) dalla lentezza delle reazioni con conseguente necessità di tempi lunghi di ritenzione in fermentatore, (iii) dalla modesta energia metabolica generata dai microrganismi cresciuti sul substrato gassoso rispetto alla crescita su substrati zuccherini con conseguente sviluppo rallentato e quindi bassa densità cellulare e ridotta produzione solventogenica (Barik et al., 1988; Vega et al., 1989).

D'altra parte, sempre attraverso sistemi biotecnologici di cattura e utilizzazione del carbonio (CCU, *Carbon Capture and Utilization*), alghe e batteri possono essere messi in grado di utilizzare la CO₂, contenuta nelle emissioni gassose in uscita da processi di combustione, per mezzo della fotosintesi, eliminando in molti casi le procedure – energeticamente dispendiose – per la purificazione preventiva dei flussi gassosi destinati alla sintesi chimica o biologica di intermedi a elevato valore aggiunto. I sistemi microbici basati sull'impiego di specie fotosintetiche possono funzionare in modo efficiente anche a concentrazioni di CO₂ relativamente basse come quelle che ricorrono nei gas di scarico delle centrali termo-elettriche a gas naturale o altro combustibile fossile. Possono così essere impiegati economicamente anche su scala relativamente piccola per far fronte alle emissioni di strutture industriali non in grado di sostenere sistemi CCS tradizionali.

Le microalghe quali *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e altre specie di questo genere, *Chlorococcum littorale*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus* e altre specie di questo genere, *Monoraphidium minutum* e *Tetraselmis* sp. ovvero batteri fotosintetici ossigenici quali i cianobatteri del genere *Spirulina* sp. (in particolare *Spirulina platensis*, oggi *Arthrospira platensis*) sono microrganismi comunemente impiegati per la mitigazione delle emissioni di CO₂ (Ho et al., 2011; Lam et al., 2012; Kumar et al., 2014).

Di fatto, soprattutto i sistemi basati sullo sfruttamento di microalghe sono un'alternativa sostenibile poiché possono produrre un'ampia gamma di materie prime per la produzione di biodiesel, bioetanolo, biometano e bioidrogeno. Il principale vantaggio offerto dall'olio estratto da microalghe, rispetto agli oli vegetali è dato dal fatto che può esser ottenuto da "coltivazioni" su terreni per così dire non arabili (Patil et al., 2008; Schenk et al., 2008; Singh et al., 2014). Inoltre, le microalghe possono costituire promettenti biorisorse anche per la messa a punto di mangimi per uso zootecnico, prodotti farmaceutici e altri prodotti di alto valore (Sansawa & Endo, 2004). Tuttavia, nonostante i vantaggi dell'olio estraibile da microalghe come materia prima per biocarburanti, sussistono diversi vincoli che devono ancora essere superati per

poter renderlo un'alternativa economicamente sostenibile per la produzione di bioenergia. La produzione di microalghe nei fotobioreattori è infatti un processo complesso che deve ancora essere perfezionato.

Oltre alle condizioni di coltura, la specie di microalga di volta in volta prescelta è importante in quanto si riflette direttamente sull'efficienza della fotosintesi e, quindi, sulle prestazioni di fissazione del carbonio e produzione di biomassa. La selezione, l'isolamento e la coltura di specie di microalghe con un elevato tasso di crescita, un alto tasso di fotosintesi, una forte tolleranza/adattabilità ambientale e un elevato contenuto lipidico richiedono ancora sforzi nell'ambito di progetti di ricerca e sviluppo. Fondamentale sarà l'individuazione di specie microalgali "ideali" per la cattura di CO_2 , in grado di crescere in un'ampia gamma di condizioni di temperatura e di concentrazione di CO_2 . La fissazione di CO_2 da parte delle microalghe è un processo complesso, soprattutto in un ambiente caratterizzato da gas di scarico. Di solito, la maggior parte dei parametri fisico-chimici e idrodinamici di processo hanno importanti effetti non lineari sulla crescita delle microalghe. Nodale è perciò il pieno chiarimento del reale impatto di questi fattori sull'attività dell'enzima anidrasi carbonica e sui meccanismi di concentrazione del carbonio (Zhao and Su, 2014). Questi parametri sono correlati e interagiscono tra loro. Non è possibile prescindere dal considerare in modo integrato gli effetti derivanti da tutti i fattori di processo per migliorare la crescita delle microalghe e la tolleranza di queste all'ambiente di coltura.

La crescita delle microalghe può attuarsi per via fotoautotrofa o eterotrofa. Alcuni ceppi di alghe possono combinare il processo autotrofo di fotosintesi con l'assimilazione eterotrofica di composti organici in quello che viene definito metabolismo mixotrofo. Attualmente, la produzione fotoautotrofa è l'unico metodo tecnicamente ed economicamente sostenibile per la produzione su larga scala di microalghe.

Due sono le tipologie di sistemi per la coltivazione di microalghe che sono stati sin qui implementati su scala tecnologica: i sistemi in vasche aperte e un'ampia gamma di foto-bioreattori chiusi. Queste due tipologie di sistemi sono ben documentate in letteratura (Acien et al., 2017; Zhou et al., 2020) (fig. 18).

L'uso delle microalghe al fine di mitigare le emissioni di CO_2 sta suscitando un crescente interesse nell'ambito della ricerca e, soprattutto, in vista della messa a punto di soluzioni impiantistiche affidabili e sostenibili dal punto di vista economico, al netto di applicazioni già in essere a livello prototipale. L'ultima frontiera degli studi in questo settore guarda inoltre all'applicazione della tecnologia delle microalghe non solo per la rimozione della CO_2 ma anche per la riduzione delle concentrazioni di NO_x e SO_x presenti nei gas industriali

di scarico. Questa prospettiva sembra essere molto efficace e rappresentare un approccio potenzialmente economico ed ecologicamente sostenibile per la risoluzione dei problemi associati alle emissioni di CO_2 e all'inquinamento atmosferico causato da una vasta gamma di processi industriali. In aggiunta alla mitigazione della CO_2 e alla contemporanea rimozione di NO_x e SO_x , la biomassa microalgale mostra anche elevate capacità di legare i metalli, rendendo l'abbattimento dei metalli pesanti nei gas di combustione per mezzo delle alghe una potenziale applicazione (Yen et al., 2015).



Fig. 18 *Tipologie disponibili di foto-bioreattori per la cattura di CO_2 da emissioni industriali*

In conclusione, l'utilizzo dei gas di combustione per coltivare microalghe si presenta come un percorso promettente per la produzione di utile biomassa finalizzata alla trasformazione in biocarburanti e altri prodotti di interesse industriale contestualmente a un valido contrasto al rilascio di emissioni gassose inquinanti e climalteranti (fig. 19).

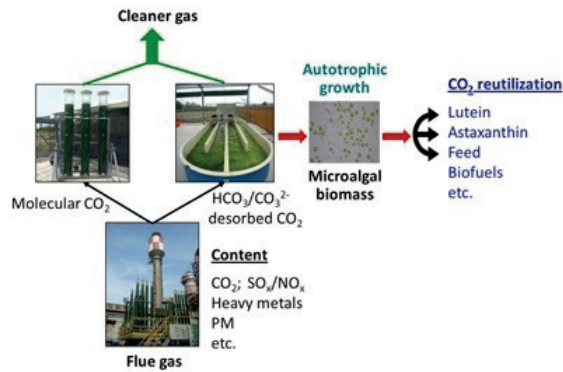


Fig. 19 L'uso di microalghe per la cattura della CO₂ contenuta nei gas di scarico di derivazione industriale associata a simultanea rimozione di NO_x e SO_x rappresenta un approccio con interessanti risvolti sia dal punto di vista economico che da quello ambientale per mitigare le emissioni climalteranti e ridurre l'inquinamento dell'aria (da: Yen et al., 2015)

RIASSUNTO

Le biotecnologie sono tecnologie basate sullo sfruttamento di processi promossi da catalizzatori biologici. Le applicazioni delle biotecnologie investono la maggior parte degli aspetti della vita contemporanea, dall'agricoltura a filiere produttive le più svariate, fino al settore medico. Nell'ambito del cambiamento climatico, le biotecnologie microbiche offrono – nello specifico – soluzioni sul fronte di quattro aree tematiche chiave: [1] Produzione sostenibile di materie prime da biomassa, [2] Rafforzamento delle filiere sostenibili di produzione di beni e servizi, [3] Sviluppo di prodotti a bassa impronta ambientale anche in termini di emissioni di carbonio, [4] Contributo al sequestro del carbonio. Le biotecnologie forniscono di fatto un aiuto importante alla riduzione a breve termine dei gas serra e rappresentano strumenti affatto rivoluzionari per combattere il cambiamento climatico a lungo termine. Questa presentazione esamina gli attuali contributi delle biotecnologie microbiche alla riduzione dei gas climalteranti e identifica le soluzioni biotecnologiche emergenti dotate di maggiore potenziale per evitare e invertire il catastrofico cambiamento climatico. Viene affrontata l'analisi delle quattro aree tematiche sopra citate. Particolare attenzione è data però a come le biotecnologie possono svolgere un ruolo aggiuntivo chiave per mezzo di soluzioni CCS (*Carbon Capture and Storage*) più scalabili, affidabili e convenienti, a fronte dell'attuale dispiegamento di protocolli per la cattura e il sequestro del carbonio mediante confinamento geologico della CO₂.

ABSTRACT

Contribution of microbial biotechnologies in response to climate change: bioprocesses for decarbonization and renewable energy production. Biotechnologies are technologies based on the exploitation of processes promoted by biological catalysts. The applications of biotechnologies involve most of the aspects of modern life, from agriculture to a number of different production chains, up to the healthcare industry. In the context of climate change, microbial biotechnologies offer - specifically - solutions on the front of four key thematic areas: [1] Sustainable production of raw materials from biomass, [2] Strengthening of sustainable production chains for goods and services, [3] Development of innovative products with a low environmental footprint also in terms of carbon emissions, [4] Contribution to carbon sequestration. Actually, biotechnologies provide an important contribution to near-term reduction of greenhouse gases and represent a quite revolutionary tool to combat climate change in the longer term. This presentation examines the current contributions of microbial biotechnologies to the reduction of greenhouse gases and identifies emerging biotechnological solutions with the greatest potential for avoiding and reversing catastrophic climate change. Here the analysis of the four thematic areas mentioned above is dealt with. However, particular focus is given to how biotechnologies can play a key additional role by means of more scalable, reliable and cost-effective CCS (Carbon Capture and Storage) solutions, compared with the current deployment of protocols for carbon capture and sequestration through geological confinement of CO₂.

BIBLIOGRAFIA

- ABRINI J., NAVEAU H., NYNS E.J. (1994): *Clostridium autoethanogenum*, *sp. nov.*, an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide, «Arch. Microbiol.», 161 (4), pp. 345-351. <https://doi.org/10.1007/BF00303591>
- ACIÉN F.G., MOLINA E., REIS A., TORZILLO G., ZITTELLI G.C., SEPÚLVEDA C., MASOJÍDE J. (2017): *1. Photobioreactors for the production of microalgae*, in *Woodhead Publishing Series in Energy - Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, Cristina Gonzalez-Fernandez and Raúl Muñoz Eds, Woodhead Publishing, pp. 1-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
- BAK S., PRIETO S., HARRISON S., CLAUSEN E., GADDY J. (1988): *Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 18 (1), pp. 363-378. <https://doi.org/10.1007/BF02930840>
- BECERRA M., Cerdán M.E., GONZÁLEZ-SISO M.I. (2015): *Biobutanol from cheese whey*, «Microbial Cell Factories», 14, 27. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0200-1>
- CARBON TRUST (2022): *Product carbon footprint labelling*. <https://www.carbontrust.com/search/demand%20for%20climate%20change%20labelling>
- DEVARAPALLI M., ATTYEH H.K. (2015): *A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation*, «Biofuel Research Journal», 2 (3), pp. 268-280. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.3.5>
- DRAKE H.L., DANIEL S.L. (2004): *Physiology of the thermophilic acetogen Moorella thermoacetica*, «Res. Microbiol.», 155 (10), pp. 869-883. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.002>

- EIA (U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION) (2021): *Petroleum & Other Liquids – U.S. Product Supplied of Crude Oil and Petroleum Products*. <https://www.eia.gov/dnav/pet/hist/LeafHandler.ashx?n=PET&s=MTTUPUS1&f=A>
- EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2017): *Renewable Fuel Standard Program – Standards for 2018 and Biomass-Based Diesel Volume for 2019: Response to Comments*. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockkey=P100TDDH.pdf>
- EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2021): *Greenhouse Gas Inventory Data Explorer*. <https://cfpub.epa.gov/ghgdata/inventoryexplorer/>
- HAMELINCK C.N., HOOIJDONK G.V., FAIJ A.P.C. (2005): *Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term*, «Biomass Bioenergy», 28 (4), pp. 384-410. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>
- HO S.-H., CHEN C.-Y., LEE D.-J., CHANG J.-S. (2011): *Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems. A review*, «Biotechnology Advances», 29 (2), pp. 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>
- HOBDEN R. (2014): *Commercializing Enzymatic Biodiesel Production*, «Biodiesel Magazine», 3 January 2014. <http://www.biodieselmagazine.com/articles/9481/commercializing-enzymatic-biodiesel-production>
- KANG M.-K., NIELSEN J. (2017): *Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of microorganisms*, «J. Ind. Microbiol. Biotechnol.», 44 (4), pp. 613-622. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1814-y>
- KLASSON K., ELMORE B., VEGA J., ACKERSON M., CLAUSEN E., GADDY J. (1990): *Biological production of liquid and gaseous fuels from synthesis gas*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 24 (1), pp. 857-873. <https://doi.org/10.1007/BF02920300>
- KUMAR K., BANERJEE D., DAS D. (2014): *Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by Chlorella sorokiniana*, «Bioresource Technology», 152, pp. 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.098>
- KUMAR R., KUMAR P. (2017): *Future Microbial Applications for Bioenergy Production: A Perspective*, «Front. Microbiol.», 8, 450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00450>
- LAM M.K., LEE K.T., MOHAMED A.R. (2012): *Current status and challenges on microalgae-based carbon capture*, «International Journal of Greenhouse Gas Control», 10, pp. 456-469. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>
- LELIEVELD J., KLINGMÜLLER K., POZZER A., BURNETT R.T., HAINES A., RAMANATHAN V. (2019): *Effects of fossil fuel and total anthropogenic emission removal on public health and climate*, «PNAS», 116 (15), pp. 7192-7197. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819989116>
- LIU J.S.C., BALKWILL D.L., DRAKE G.R., TANNER R.S. (2005): *Clostridium carboxidivorans sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen Clostridium scatologenes strain SL1 as Clostridium drakei sp. Nov.*, «Int. J. Syst. Evol. Microbiol.», 55 (5), pp. 2085-2091. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63482-0>
- LIU K., ATIYEH H.K., TANNER R.S., WILKINS M.R., HUHNKE R.L. (2012): *Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of Alkalibaculum bacchi*, «Bioresour. Technol.», 104, pp. 336-341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.054>
- LJUNGDHAL L. (1986): *The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria*, «Annu. Rev. Microbiol.», 40 (1), pp. 415-450. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.40.100186.002215>

- MADIGAN M., MARTINKO J., PARKER J. (2003): *Brock biology of microorganisms*, Prentice Hall/Pearson Education, New Jersey, USA, pp. 1019.
- MBANEME-SMITH V., CHINN M.S. (2015): *Consolidated bioprocessing for biofuel production: recent advances*, «Energy and Emission Control Technologies», 3, pp. 23-44. <http://dx.doi.org/10.2147/EECT.S63000>
- MOHAMMADI M., NAJAFPOUR G.D., YOUNESI H., LAHIJANI P., UZIR M.H., MOHAMED A.R. (2011): *Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review*, «Renew - Sustainable Energy Rev.», 15 (9), pp. 4255-4273. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.12>
- MÖRSDORF G., FRUNZKE K., GADKARI D., MEYER O. (1992): *Microbial growth on carbon monoxide*, «Biodegradation», 3, pp. 61-82. <https://doi.org/10.1007/BF00189635>
- PATIL V., TRAN K.Q., GISELRØD H.R. (2008): *Towards sustainable production of bio-fuels from microalgae*, «Int. J. Mol. Sci.», 9, pp. 1188-1195. <https://doi.org/10.3390/ijms9071188>
- PHILLIPS J.R., CLAUSEN E.C., GADDY J.L. (1994): *Synthesis gas as substrate for the biological production of fuels and chemicals*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 45 (1), pp. 145-157. <https://doi.org/10.1007/BF02941794>
- PHILLIPS J.R., ATIYEH H.K., TANNER R.S., TORRES J.R., SAXENA J., WILKINS M.R., HUHNE R.L. (2015): *Butanol and hexanol production in Clostridium carboxidivorans syngas fermentation: Medium development and culture techniques*, «Bioresour. Technol.», 190, pp. 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.043>
- RAGSDALE S.W. (1997): *The eastern and western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: How the east and west were won*, «BioFactors», 6 (1), pp. 3-11. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060102>
- RAHMAN Z., NAWAB J., SUNG B.H., KIM S.C. (2018): *A Critical Analysis of Bio-Hydro-carbon Production in Bacteria: Current Challenges and Future Directions*, «Energies», 11(10), p. 2663. <https://doi.org/10.3390/en11102663>
- SANSAWA H., ENDO H. (2004): *Production of intracellular phytochemicals in Chlorella under heterotrophic conditions*, «J. Biosci. Bioeng.», 98, pp. 437-444.
- SCHENK P.M., THOMAS-HALL S.R., STEPHENS E., MARX U.C., MUSSGNUM J.H., POSTEN C., KRUSE O., HANKAMER B. (2008): *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*, «Bioenergy Res.», 1, pp. 20-43.
- SINGH B., GULDHE A., RAWAT I., BUX F. (2014): *Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae Renew*, «Sustain. Energy Rev.», 29, pp. 216-245. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.067>
- SINGH J.K., VYAS P., DUBEY A., PRAKASH UPADHYAYA C., KOTHARI R., TYAGI V.V., KUMAR A. (2018): *Assessment of different pretreatment technologies for efficient bioconversion of lignocellulose to ethanol*, «Front. Biosci.» (Schol. Ed.), 10 (2), pp. 350-371. <https://doi.org/10.2741/S521>
- STATISTA (2021): *Volume of plastic waste generated in the municipal solid waste stream in the U.S. from 1960 to 2018*. <https://www.statista.com/statistics/1097290/us-plastic-waste-generation/>
- THANGARAJ B., SOLOMON P.R., MUNIYANDI B., RANGANATHAN S., LIN L. (2019): *Catalysis in biodiesel production - a review*, «Clean Energy», 3 (1), pp. 2-23. <https://doi.org/10.1093/ce/zky020>
- VEGA J.L., CLAUSEN E.C., GADDY J.L. (1990): *Design of bioreactors for coal synthesis gas fermentations*, «Resour. Conserv. Recycl.», 3 (2-3), pp. 149-160. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(90\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0921-3449(90)90052-6)

- VEGA J.L., PRIETO S., ELMORE B.B., CLAUSEN E.C., GADDY J.L. (1989): *The biological production of ethanol from synthesis gas*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 20 (1), pp. 781-797. <https://doi.org/10.1007/BF02936525>
- WILKINS M.R., ATIYEH H.K. (2011): *Microbial production of ethanol from carbon monoxide*, «Curr. Opin. Biotechnol.», 22 (3), pp. 326-330. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.005>
- WOOD H.G., RAGSDALE S.W., PEZACKA E. (1986): *The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth*, «FEMS Microbiol. Lett.», 39 (4), pp. 345-362. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90022-4)
- XIN F., DONG W., ZHANG W., MA J., JIANG M. (2019): *Biobutanol Production from Crystalline Cellulose through Consolidated Bioprocessing*, «Trends in Biotechnology», 37 (2), pp. 167-180. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.007>
- YEN H.-W., HO S.-H., CHEN C.-Y., CHANG, J.-S. (2015): *CO₂, NO_x and SO_x removal from flue gas via microalgae cultivation - A critical review*, «Biotechnology Journal», 10, pp. 829-839. <https://doi.org/10.1002/biot.201400707>
- ZHAO B., SU Y. (2014): *Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review*, «Renewable and Sustainable Energy Reviews», 31 (1), pp. 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.054>
- ZHOU W., LU Q., HAN P., LI J. (2020): *3. Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design*, in *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, Ed(s): Abu Yousuf, Academic Press, pp. 31-50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00003-5>

