



Ricerca di Sistema elettrico

Degradazione di biomasse ad alto contenuto in polisaccaridi (ligno-cellulosa e chitina) tramite funghi filamentosi. Studio di processi aerobici con metodi tradizionali e modellizzazione RSM. Isolamento e studio di funghi anaerobici ruminali

S. Gorrasi, A. Aquilanti, P. Barghini, S. Silvi, M. Fenice



DEGRADAZIONE DI BIOMASSE AD ALTO CONTENUTO IN POLISACCARIDI (LIGNO-CELLULOSA E CHITINA)
TRAMITE FUNGHI FILAMENTOSI. STUDIO DI PROCESSI AEROBICI CON METODI TRADIZIONALI E
MODELLIZZAZIONE RSM. ISOLAMENTO E STUDIO DI FUNGHI ANAEROBICI RUMINALI.

S. Gorrasi, A. Aquilanti, P. Barghini, S. Silvi, M. Fenice (Università della Tuscia)

Settembre 2013

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2012

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Sviluppo di sistemi per la produzione di energia elettrica da biomasse e l'upgrading dei biocombustibili

Obiettivo: Sviluppo dei sistemi di produzione di biocombustibili

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione *"Pretrattamento biologico di biomasse lignocellulosiche per l'ottenimento di substrati idonei alla produzione di biogas"*

Responsabile scientifico ENEA: Giulio Izzo

Responsabile scientifico Università della Tuscia: Massimiliano Fenice

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE	5
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	6
2.1 FASI DELLE ATTIVITÀ SVOLTE	6
2.2 METODI ANALITICI.....	6
2.2.1 <i>Determinazione delle proteine totali</i>	6
2.2.2 <i>Determinazione degli zuccheri riducenti</i>	6
2.2.3 <i>Saggio delle chitinasi</i>	7
2.2.4 <i>Determinazione del peso secco</i>	7
2.2.5 <i>Misura dell'attività idrolitica</i>	7
2.3 SCELTA DELLA BIOMASSE DA IDROLIZZARE.....	8
2.4 SELEZIONE DI FUNGHI LIGNO-CELLULOLITICI E CHITINOLITICI PER IL PRETRATTAMENTO BIOLOGICO (IDROLISI).....	8
2.5 FERMENTAZIONI IN COLTURE AGITATE SOMMERSE	9
2.5.1 <i>1^a prova (febbraio 2013)</i>	9
2.5.1.1 Preparazione dell'inoculo	9
2.5.1.2 Biotrattamento	9
2.5.2 <i>2^a prova (maggio-giugno 2013)</i>	17
2.5.2.1 Pretrattamento di materiale LC	17
2.5.2.2 Preparazione dell'inoculo	17
2.5.2.3 Biotrattamento	17
2.5.2.4 Pretrattamento di residui ad alto contenuto in chitina (chitina grezza)	19
2.5.2.5 Preparazione dell'inoculo	19
2.5.2.6 Biotrattamento (disegno fattoriale)	19
2.5.3 <i>3^a prova (agosto-settembre 2013)</i>	26
2.5.3.1 Pretrattamento di materiale LC	26
2.5.3.2 Preparazione dell'inoculo	26
2.5.3.3 Biotrattamento	26
2.5.3.4 Pretrattamento di residui ad alto contenuto in chitina (chitina grezza)	27
2.5.3.5 Preparazione dell'inoculo	27
2.5.3.6 Biotrattamento	27
2.6 MISURA DELL'ATTIVITÀ IDROLITICA	29
2.6.1 <i>Preparazione dell'inoculo</i>	29
2.7 PROVE DI ISOLAMENTO E MANTENIMENTO DI FUNGHI ANAEROBICI.....	30
2.7.1 <i>Analisi bibliografica</i>	30
2.7.2 <i>Prove preliminari di isolamento e mantenimento di funghi anaerobici</i>	31
3 CONCLUSIONI.....	32
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	33
ABBREVIAZIONI ED ACRONIMI	34
CURRICULUM SCIENTIFICO DEL GRUPPO DI RICERCA	35

Sommario

I batteri anaerobici che producono biogas di solito non sono in grado di effettuare questo processo a partire da matrici biologiche complesse. Pertanto, quando il substrato di partenza è costituito da polimeri ad alto peso molecolare, quali i polisaccaridi, una fase preliminare di idrolisi è importante per produrre composti semplici fermentescibili. In questo caso, l'idrolisi diventa il primo passaggio della produzione di biogas.

I materiali lignocellulosici (LC) e la chitina rappresentano le fonti naturali di carbonio organico rinnovabile più abbondanti in natura. Per questa ragione il loro interesse ai fini delle produzioni bioenergetiche è estremamente rilevante; alcune di queste biomasse risultano le più utilizzate per questi scopi.

Per quanto riguarda gli esperimenti di pretrattamento biologico, effettuati nell'anno corrente, sono stati utilizzati alcuni ceppi fungini ligninolitici white rot (WR) e il fungo chitinolitico *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003, come per la sperimentazione condotta nell'ambito del precedente accordo. I microrganismi citati sono conservati presso le collezioni di funghi di interesse industriale e di microrganismi da ambienti estremi (CCFEE) dell'Università degli Studi della Toscana.

Le biomasse LC sulle quali è stato effettuato il pretrattamento idrolitico (segatura di abete, segatura di pioppo e paglia di grano) sono state scelte sulla base delle considerazioni di seguito riportate:

- Disponibilità locale costante del materiale;
- Diffusione in campo nazionale ed internazionale;
- Esistenza di processi economicamente vantaggiosi per il riutilizzo e la valorizzazione.

Come biomassa chitinoso, invece, è stata scelta chitina grezza commerciale in quanto, in caso di applicazione a livello industriale, risulterebbe decisamente più vantaggiosa economicamente rispetto a quella colloidale utilizzata negli esperimenti effettuati durante l'accordo precedente. Inoltre questo materiale risulta decisamente più simile agli scarti di chitina che potrebbero essere utilizzati in un processo industriale.

I prodotti delle fermentazioni condotte a livello di laboratorio sono stati direttamente utilizzati come substrato per la produzione di biogas presso l'UTRINN (ENEA La Casaccia).

Durante la sperimentazione, sono state prelevate settimanalmente aliquote dei brodi di fermentazione per la determinazione di proteine totali, zuccheri riducenti, pesi secchi ed enzimi chitinolitici (chitinasi). Le analisi effettuate hanno evidenziato in tutti gli esperimenti un aumento delle proteine totali nel tempo mentre gli zuccheri riducenti mostravano un andamento variabile.

I valori inerenti i pesi secchi totali (pellet e surnatante dei prodotti di fermentazione) della prima prova (febbraio 2013) hanno evidenziato un decremento nel tempo, indice di consumo di materiale da parte dell'attività metabolica/respiratoria del fungo e quindi di idrolisi del substrato.

Per la prova inerente l'idrolisi del materiale chitinoso si è utilizzato un disegno fattoriale. Il modello RSM (Response Surface Methodology) è stato ottenuto utilizzando varie combinazioni di fattori nutrienti (chitina grezza ed estratto di lievito (YE)), ed analizzando l'effetto di queste sulla produzione di enzimi chitinolitici (idrolisi della chitina) e sulla produzione di idrogeno nella fermentazione anaerobica successiva. Per quanto riguarda la produzione di enzimi chitinolitici, è evidente un effetto sinergico dei due nutrienti.

Riguardo la produzione di H₂, la concentrazione di chitina sembra essere il parametro più influente: all'aumentare di essa si ha un significativo aumento del volume di H₂ prodotto. Essendo stato anche rilevato un aumento degli zuccheri riducenti nel brodo di fermentazione, in seguito all'inoculo del consorzio batterico anaerobico, si è ipotizzata la presenza in esso di microrganismi chitinolitici.

1 Introduzione

Obiettivo di questo studio è lo sviluppo di biosistemi fungini per il pretrattamento e la valorizzazione di materiali di scarto LC e chitinosi, al fine di ottenere substrati idonei alla successiva fermentazione anaerobica, con consorzio batterico selezionato, per la produzione di biogas (principalmente idrogeno e metano). Si è scelto di utilizzare materiale LC e chitinoso per la grande abbondanza e reperibilità di queste biomasse: il materiale LC rappresenta la componente più abbondante dell'intera biomassa terrestre [1] e la chitina è considerata il secondo polimero naturale più abbondante sul nostro pianeta dopo la cellulosa [2]. I metodi tradizionali di pretrattamento di tali substrati (fisico, chimico, enzimatico o combinazioni di questi) sono, in linea di massima, costosi ed altamente energivori. Pertanto, l'uso di specifici microrganismi idrolitici rappresenta una strategia promettente per ottimizzare a livello economico la valorizzazione di questi scarti. A tal riguardo sono stati presi in considerazione ceppi fungini (alcuni funghi white rot e il fungo *Lecanicillium muscarium*) conservati presso la collezione di microrganismi di interesse industriale e la collezione di ceppi da ambienti estremi (CCFEE) dell'Università della Tuscia. Questi organismi, noti per le loro capacità idrolitiche in condizioni aerobiche [3-7], sono stati utilizzati al fine di ottenere i necessari substrati fermentescibili per la successiva fase anaerobica per la produzione di idrogeno e/o metano. I ceppi oggetti della sperimentazione erano già stati utilizzati in attività precedenti del gruppo di ricerca e, sulla base dei risultati ottenuti dalle sperimentazioni precedenti (Report RdS/2012/290), si è proceduto ad indagarne l'attività su substrati analoghi a quelli già testati.

In concomitanza con la suddetta attività, per diversificare e possibilmente migliorare il processo di produzione del biogas, è stata avviata una sperimentazione relativa ai funghi ruminali (RF). Questi microrganismi sono in grado di degradare materiale LC in condizioni anaerobiche. Pertanto con il loro utilizzo si potrebbe ottimizzare la produzione di biogas, eliminando la pre-idrolisi in fase aerobica ed effettuando l'intero processo in anaerobiosi. In questo contesto si è proceduto ad una dettagliata ricerca bibliografica sui RF ed il loro metabolismo, a prove di isolamento e mantenimento di questi microrganismi.

2 Descrizione delle attività svolte e risultati

2.1 Fasi delle attività svolte

- Scelta della biomassa LC e chitinosa
- Scelta dei microrganismi idrolitici (WR; *Lecanicillium muscarium*)
- Prima prova di idrolisi di materiale LC in colture agitate sommerse (febbraio 2013)
- Seconda prova di idrolisi (materiale LC e biomassa chitinosa) in colture agitate sommerse (maggio-giugno 2013)
- Terza prova di idrolisi (materiale LC e biomassa chitinosa) in colture agitate sommerse (agosto-settembre 2013)
- Prova di isolamento e mantenimento di RF (luglio 2013).

2.2 Metodi analitici

Per quanto riguarda le prove di idrolisi, queste sono state effettuate in in colture agitate sommerse. Nel corso della sperimentazione si è proceduto alle seguenti determinazioni: proteine totali, zuccheri riducenti, peso secco e, nel caso delle colture contenenti biomassa chitinosa, produzione di enzimi chitinolitici (chitinasi).

2.2.1 Determinazione delle proteine totali

Per la determinazione delle proteine totali in soluzione si è proceduto secondo il metodo proposto da Bradford (1976), utilizzando il reattivo Coomassie Brilliant Blue G (CBB).

Un'aliquota dei prodotti di fermentazione è stata centrifugata (15 min a 6000 rpm) e il surnatante è stato impiegato come soluzione per la determinazione delle proteine. A 30 µl di campione opportunamente diluito è stato aggiunto 1 ml di reattivo CBB; dopo avere agitato ed incubato per 15 minuti è stato letto l'assorbimento a 595 nm contro bianco (30 µl di terreno colturale e 1 ml di acqua deionizzata).

Per la costruzione della retta di taratura è stata preparata una soluzione a concentrazione 1 g/L di albumina da siero bovino (BSA) e si è eseguita una serie di diluizioni scalari nel range 0-1 g/L.

2.2.2 Determinazione degli zuccheri riducenti

Il metodo utilizzato (Miller, 1959) prevede la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti tramite reazione ossidativa con acido 3,5-dinitrosalicilico (DNSA) utilizzando un reattivo composto da: 500 ml di NaOH al 2%, 10 g di Acido DinitroSalicilico, 2 g di fenolo, 0,5 g di sodio solfito, 200 g di potassio sodio tartrato e acqua deionizzata per portare a volume finale di 1 l.

La retta di taratura si costruisce preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio a concentrazioni da 0,1 a 1 g/L in acqua deionizzata. A 500 µl di tali soluzioni si aggiunge 1 ml di reattivo DNSA. I campioni così preparati vengono fatti bollire per 15 minuti e trasferiti in ghiaccio per 10 min, l'assorbanza è letta a 640 nm contro bianco costituito da 500 µl di acqua deionizzata e 1 ml di DNSA.

Per la determinazione degli zuccheri riducenti in soluzione nei campioni, un'aliquota dei prodotti di fermentazione è stata centrifugata (15 min a 6000 rpm) e il surnatante è stato impiegato nel saggio con le modalità sopra descritte leggendo l'assorbanza contro bianco, costituito da 500 µl di terreno colturale e 1 ml di DNSA, non sottoposto a reazione di riscaldamento e raffreddamento.

2.2.3 Saggio delle chitinasi

Per quantificare l'attività degli enzimi chitinolitici in termini di unità internazionali (UI, $\mu\text{mol min}^{-1}$) si è utilizzato nuovamente il metodo del DNSA tenendo in considerazione che l'azione globale delle chitinasi rilascia zuccheri riducenti dal polimero di chitina. Lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è l'N-acetilglucosammina (NAG), monomero della chitina, a concentrazioni da 0,1 a 1 g/L in acqua deionizzata. A 500 μl di tali soluzioni si aggiunge 1 ml di reattivo DNSA. I campioni così preparati vengono fatti bollire per 15 minuti e trasferiti in ghiaccio per 10 min, l'assorbanza è letta a 640 nm contro bianco costituito da 500 μl di acqua deionizzata e 1 ml di DNSA.

Per la determinazione della quantità di NAG in soluzione nei campioni, sono state prelevate due aliquote per ciascuno dei prodotti di fermentazione (da utilizzare una come attivo e l'altra come inattivo al fine di eliminare l'interferenza di zuccheri riducenti presenti nel terreno e non rilasciati dall'azione dell'enzima), centrifugate (15 min a 6000 rpm) e il surnatante è stato impiegato nel saggio. Gli attivi (A), costituiti da 0,5 ml di surnatante e 0,5 ml di soluzione di chitina all'1% in tampone fosfato/citrato pH 5.0 (10,30 ml di Na_2HPO_4 + 9,70 ml di acido citrico; tabella McIlvaine), sono stati posti ad incubare a 45°C per 15 min. Dopo essere stati incubati si è proceduto a centrifugarli (15 min a 6000 rpm) e 500 μl del surnatante così ottenuto sono stati impiegati nel saggio del DNSA con le modalità sopra descritte leggendo l'assorbanza contro bianco, costituito da 500 μl di terreno colturale e 1 ml di DNSA, non sottoposto a reazione di riscaldamento e raffreddamento. Gli inattivi (I), costituiti da 0,5 ml di surnatante e 0,5 ml di soluzione di chitina all'1% in tampone fosfato/citrato pH 5,0, non sono stati posti ad incubare a 45 °C per 15 min, ma impiegati direttamente nel saggio del DNSA. Dai valori di assorbanza degli attivi e dei corrispettivi inattivi si è calcolato il valore di assorbanza Δ_{ABS} al quale corrispondeva la concentrazione di NAG presente nei campioni ($\Delta_{\text{ABS}} = \text{ABS}_A - \text{ABS}_I$). Per calcolare la concentrazione di attività enzimatica: $\text{UI/ml} = 1 \mu\text{mol}_{\text{NAG}} \text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

2.2.4 Determinazione del peso secco

I campioni della prima prova di idrolisi, al termine di ogni processo fermentativo anaerobico, sono stati sottoposti a centrifugazione (3900 rpm per 15 min) e si è proceduto alla determinazione del peso secco separatamente per surnatante e pellet.

Per i campioni delle prove successive si è deciso di determinare esclusivamente il peso secco dell'inoculo fungino iniziale.

2.2.5 Misura dell'attività idrolitica

L'attività idrolitica è stata correlata con l'attività metabolica (respiratoria) di un inoculo quantizzato tramite misurazione del B.O.D.

Sono stati rilevati i valori di B.O.D. ottenuti inoculando 10 ml di biomassa fungina in 100 ml di terreni contenenti materiali LC e chitinosi selezionati, per avere un'indicazione dell'attività idrolitica dei ceppi sui substrati considerati supponendo che a BOD maggiore corrisponde un maggiore consumo di ossigeno dovuto a maggior attività metabolica.

2.3 Scelta della biomasse da idrolizzare

Le biomasse LC (segatura di abete e di pioppo, paglia di grano) sono state scelte sulla base delle seguenti considerazioni:

- Disponibilità locale costante del materiale;
- Diffusione in campo nazionale ed internazionale;
- Esistenza di processi economicamente vantaggiosi per il riutilizzo e la valorizzazione;

Come biomassa chitinosa, invece, è stata scelta chitina grezza commerciale in quanto economicamente vantaggiosa rispetto a quella colloidale in un eventuale processo trasferito su scala industriale. La chitina grezza impiegata è molto più simile di quella colloidale agli scarti chitinosi prodotti da industrie del settore ed eventualmente utilizzabili come substrato per la produzione energetica.

2.4 Selezione di funghi ligno-cellulolitici e chitinolitici per il pretrattamento biologico (idrolisi)

Sulla base dei risultati ottenuti dalla sperimentazione precedente sono stati scelti i seguenti ceppi ligno-cellulolitici: *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus* (Report RdS/2012/290)

Riguardo al pretrattamento di biomassa chitinosa è stato scelto il ceppo antartico *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003, noto in letteratura per la sua notevole capacità chitinolitica [7].

2.5 Fermentazioni in colture agitate sommerse

2.5.1 1^a prova (febbraio 2013)

Sono stati testati singolarmente i 4 ceppi di WR (*Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus*) in colture agitate sommerse utilizzando terreni di coltura contenenti segatura di pioppo o paglia di grano.

2.5.1.1 Preparazione dell'inoculo

La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata (beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti 50 ml di terreno), incubate per 96 h in agitatore orbitale a 28 °C e 180 rpm. Il terreno di pre-cultura utilizzato aveva la seguente composizione: estratto di malto (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 30 g/L.

Il micelio è stato omogeneizzato con Mixer Ultra Turrax (Ika, Germany).

Dopo omogeneizzazione, 2 ml di sospensione miceliare sono stati utilizzati come inoculo.

2.5.1.2 Biotrattamento

Sono stati preparati due diversi terreni di coltura in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti:

- 80 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (0,1 g) e 1 g di segatura di pioppo (PI).
- 80 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (0,1 g) e 1 g di paglia (PA).

I terreni sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 30 min.

Negli esperimenti precedenti si era osservata una certa difficoltà da parte dei funghi white rot a colonizzare le scaglie di materiale LC. Pertanto, in questa prova le biomasse LC sono state frammentate ulteriormente per ridurre la granulometria a c.a. 2 mm. È evidente che la frammentazione fine del materiale può incidere negativamente sui costi di un eventuale processo su scala industriale.

L'esperimento è stato condotto per quattro settimane e ciascun ceppo fungino è stato inoculato nei terreni colturali sopra descritti. Sono state allestite tre repliche, due delle quali utilizzate per monitorare il processo fermentativo su base settimanale (3 settimane). Alla fine di ogni settimana sono state prelevate aliquote di 20 ml previa omogeneizzazione con Mixer Ultra Turrax. I campioni prelevati sono stati inviati ai laboratori UTRINN per essere utilizzati direttamente come substrato per la produzione di biogas. La terza replica è stata utilizzata direttamente alla quarta settimana senza prelievi intermedi.

A cadenza settimanale si è proceduto alla determinazione delle proteine totali e degli zuccheri riducenti. Le analisi sono state condotte su base settimanale al fine di minimizzare il numero di prelievi e conservare la maggior quantità possibile di materiale per la successiva fase di produzione di biogas. Dopo la fermentazione anaerobica, oltre ai suddetti parametri, è stato misurato anche il peso secco (Figg.1-8 e Figg.9-16).

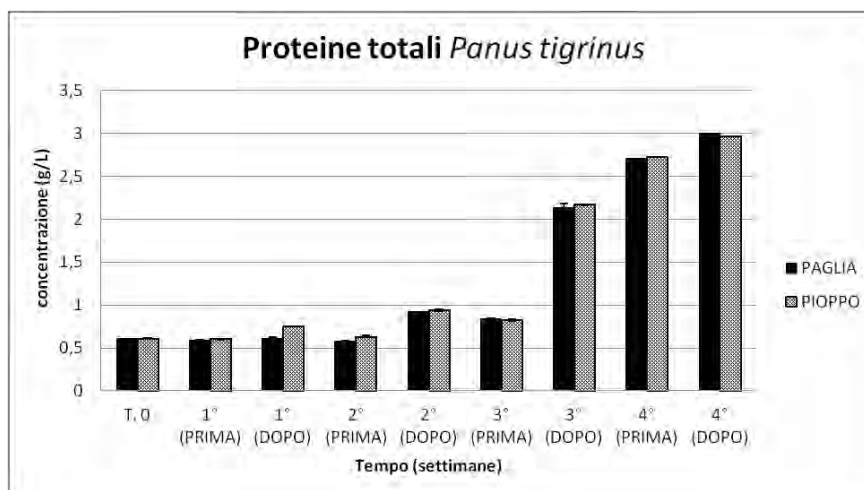


Figura 1. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

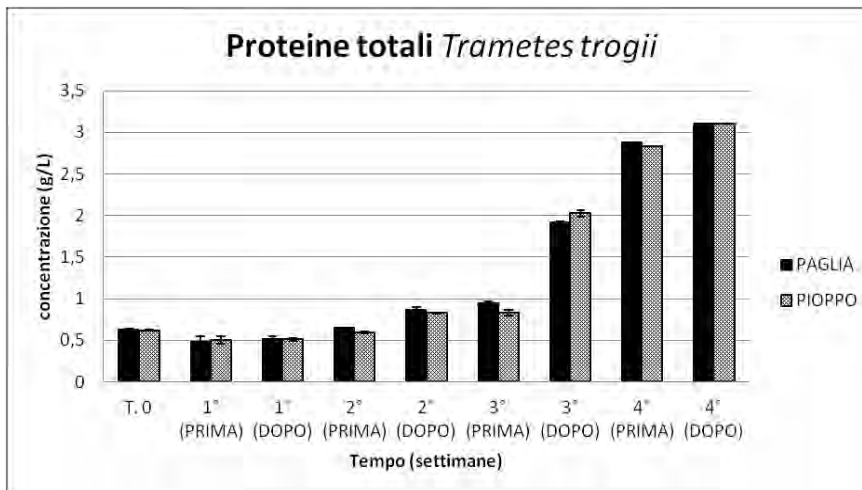


Figura 2. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

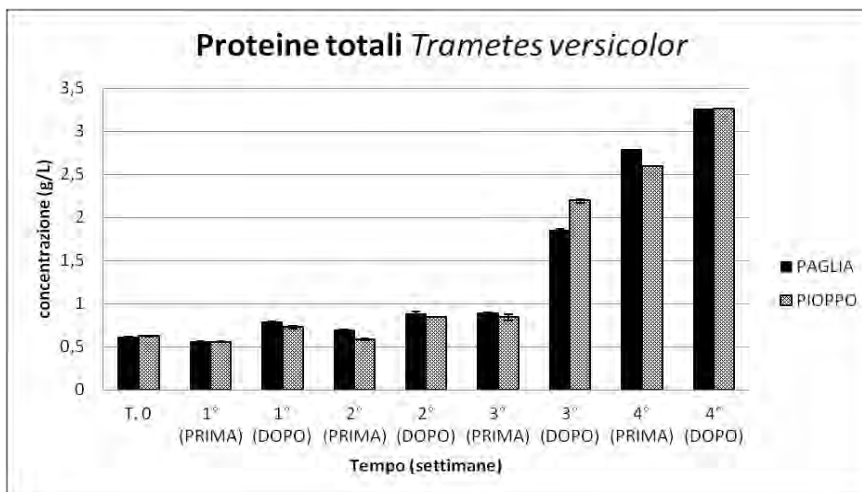


Figura 3. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

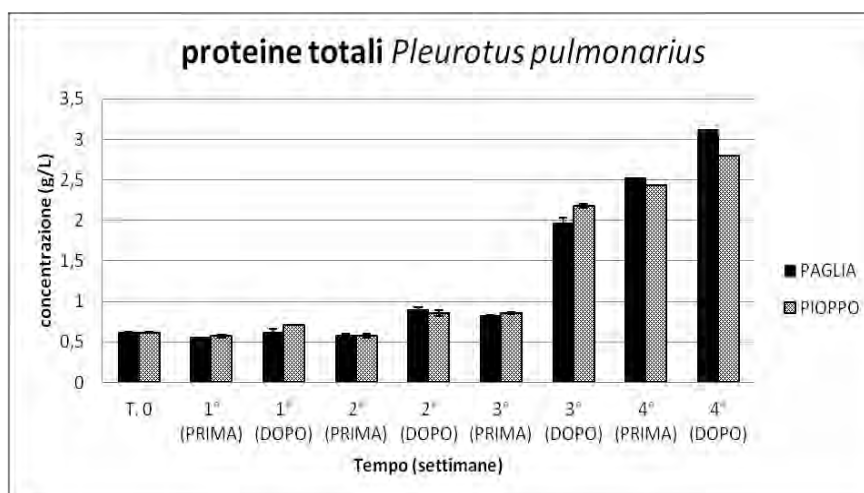


Figura 4. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

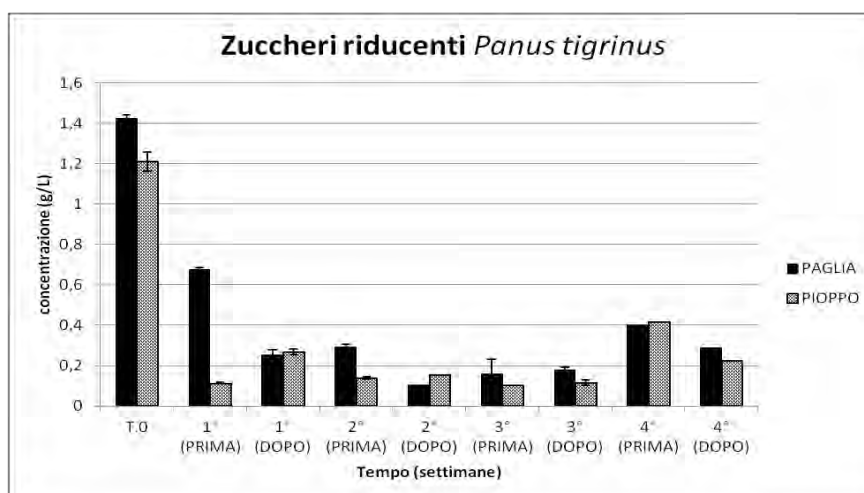


Figura 5. Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

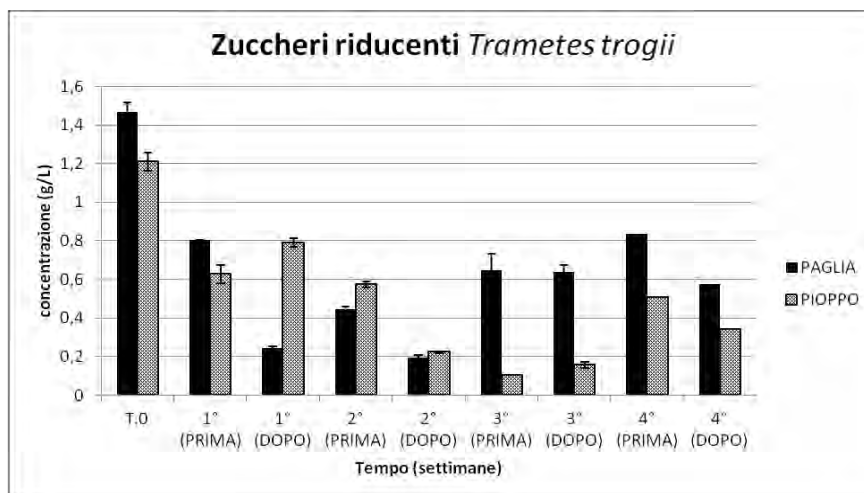


Figura 6. Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

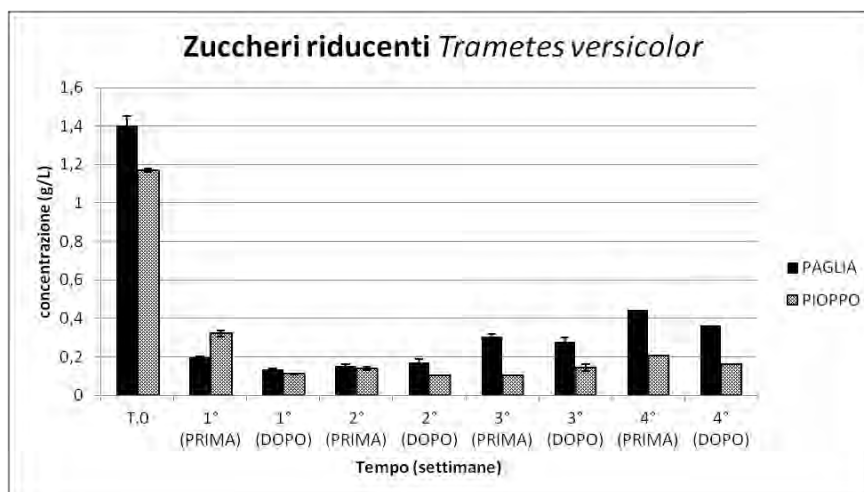


Figura 7. Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

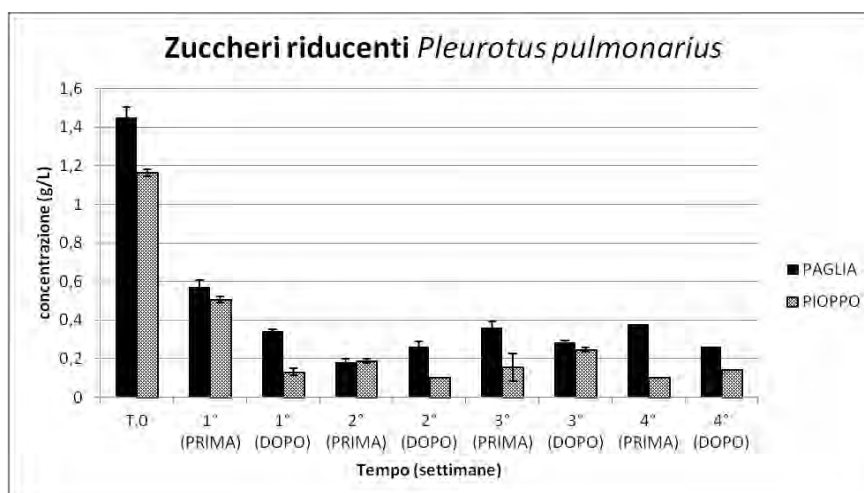


Figura 8. Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

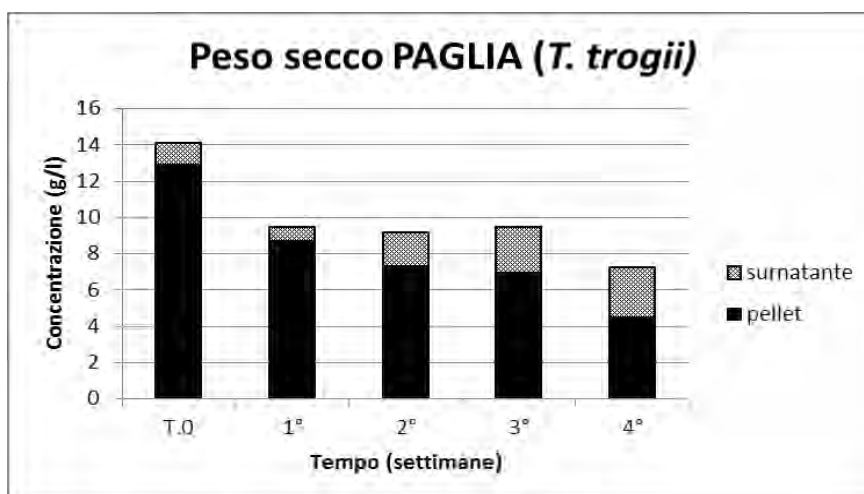


Figura 9. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

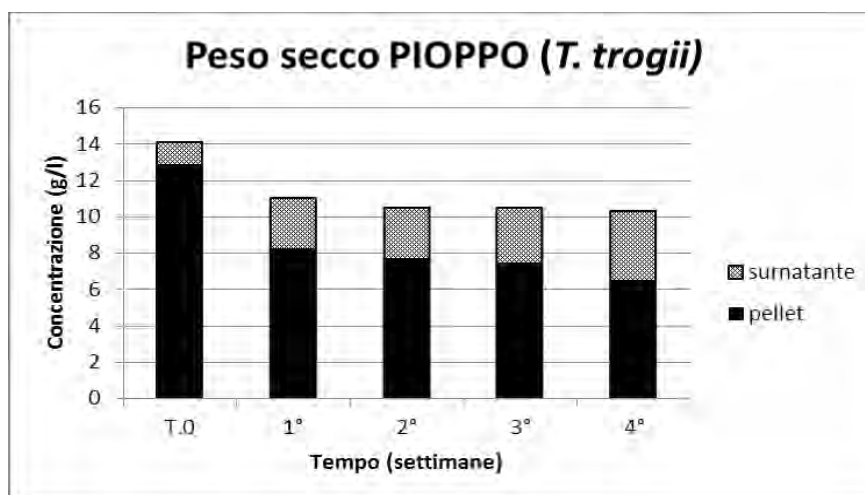


Figura 10. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

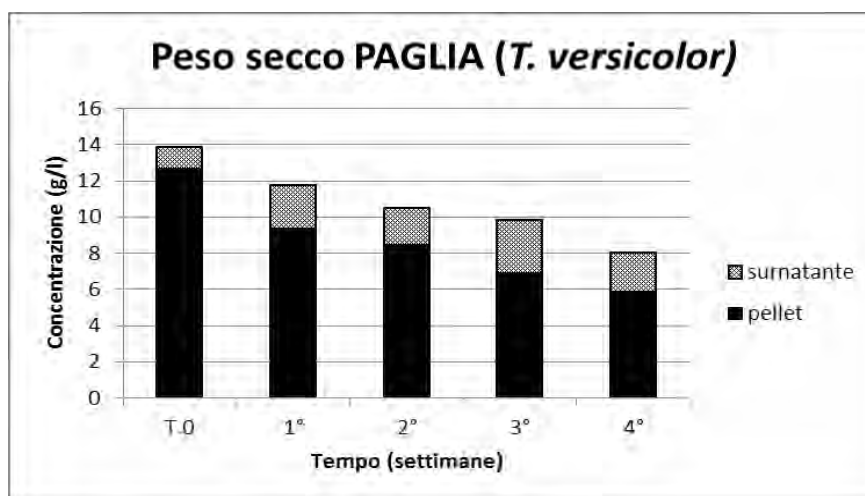


Figura 11. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

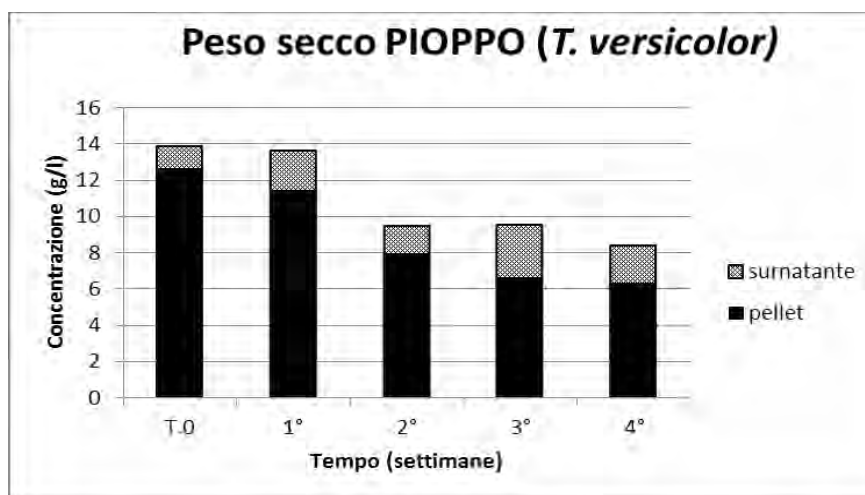


Figura 12. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

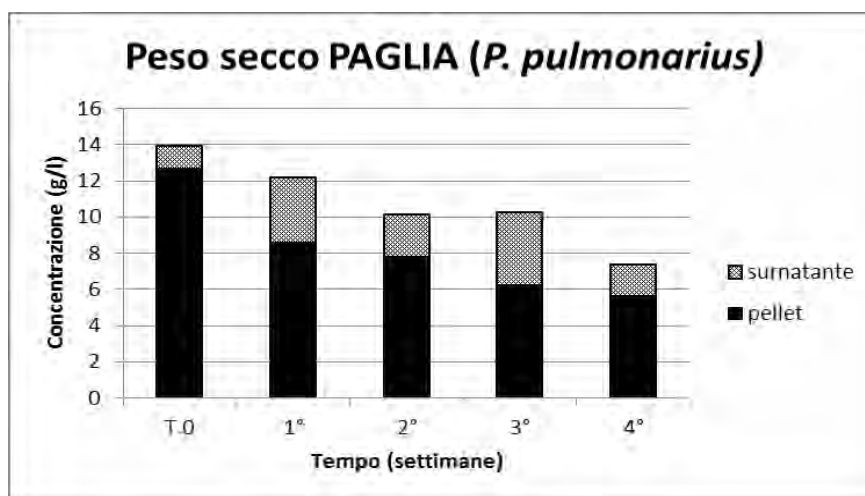


Figura 13. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

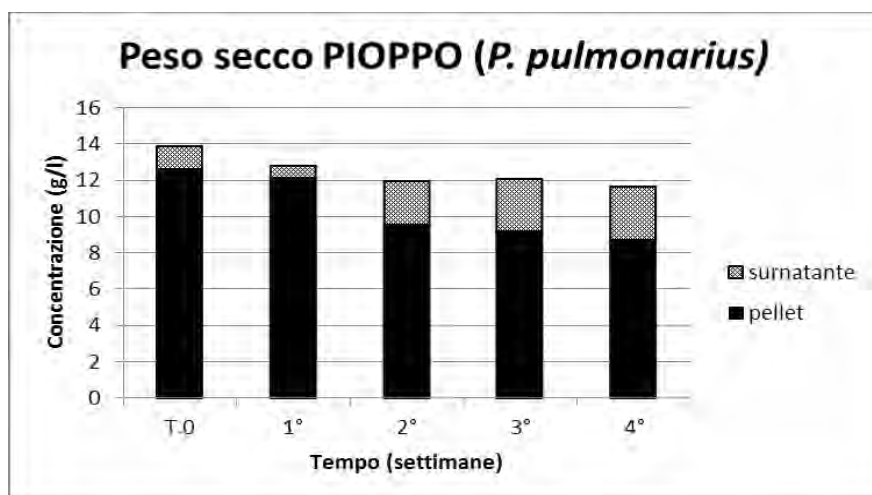


Figura 14. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

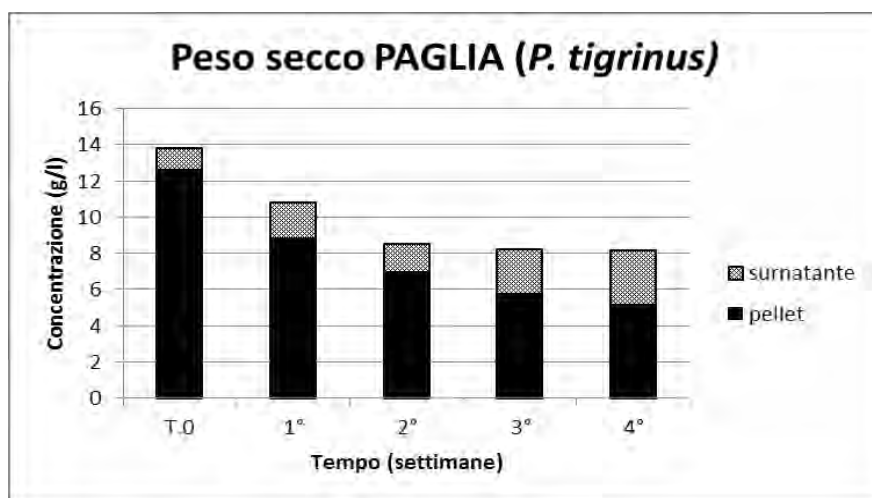


Figura 15. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

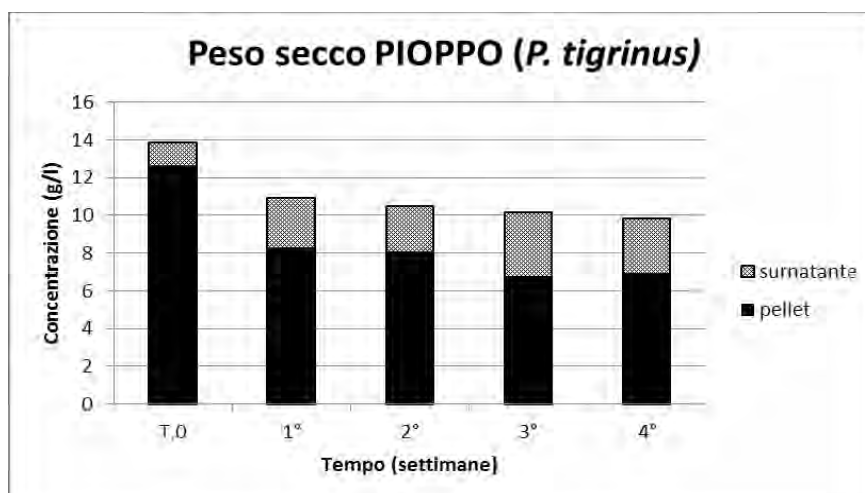


Figura 16. Rilevazione dei pesi secchi di pellet e surnatante negli esperimenti di idrolisi con funghi white rot

Per la prima, la seconda e la terza settimana i dati (dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. Per la quarta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T.0 rappresenta peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è inferiore al 20%.

2.5.2 2^a prova (maggio-giugno 2013)

2.5.2.1 Pretrattamento di materiale LC

E' stata testata una miscela (mix) dei 4 ceppi di WR (*Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus*) in colture agitate sommerse utilizzando diversi terreni contenenti segatura di pino, segatura di abete, paglia di grano.

2.5.2.2 Preparazione dell'inoculo

L'inoculo per le prove è stato prodotta in coltura agitata (beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti 50 ml di terreno), incubate per 96 h in agitatore orbitale a 28 °C e 180 rpm.

La biomassa da inoculare è stata ottenuta centrifugando (10 min 8000 rpm) il brodo di coltura dei quattro ceppi. Inoltre, al fine di eliminare ogni traccia del vecchio terreno, per evitare problemi di inibizione da catabolita, i pellet fungini ottenuti sono stati lavati estensivamente con acqua deionizzata sterile, ricentrifugati, risospesi tutti insieme ed omogeneizzati con Mixer Ultra Turrax.

Dopo omogeneizzazione, sono stati utilizzati 6 ml di sospensione miceliare (concentrazione biomassa fungina 1,497 g/L) come inoculo.

2.5.2.3 Biotrattamento

Sono stati preparati tre diversi terreni di coltura in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti:

- 60 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (0,45 g) e 0,75 g di segatura di abete (A).
- 60 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (0,45 g) e 0,75 g di paglia (PA).
- 60 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (0,45 g) e 0,75 g di segatura di pino (PI).

I terreni sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 20 min.

L'esperimento è stato condotto per quattro settimane: per ciascun terreno inoculato con la mix fungina sono state allestite due repliche, utilizzate per monitorare il processo fermentativo a cadenza settimanale. I

prelievi sono stati trattati come già riportato (aliquote di 20 ml, dopo omogeneizzazione con Mixer Ultra Turrax). Si è deciso di monitorare le produzioni bioenergetiche a partire dalla seconda settimana di idrolisi, perché si è visto dalle sperimentazioni precedenti che durante la prima settimana non si registrano livelli produttivi significativi di H_2 . Per tutto il periodo di sperimentazione le colture sono state incubate a 28 °C e 160 rpm in agitatore orbitale. Per i campioni si è proceduto alla determinazione delle proteine totali e degli zuccheri riducenti sia al termine della fase di idrolisi aerobica, sia dopo la fermentazione anaerobica (Figg.17-18).

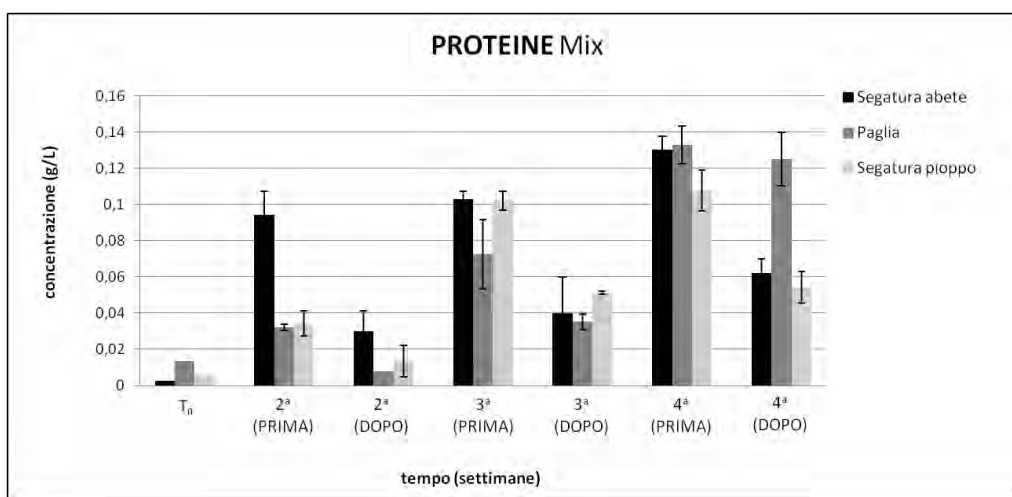


Figura 17 Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con mix di funghi white rot.

Per la seconda, la terza settimana e la quarta settimana i dati (prima e dopo la fermentazione anaerobica) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

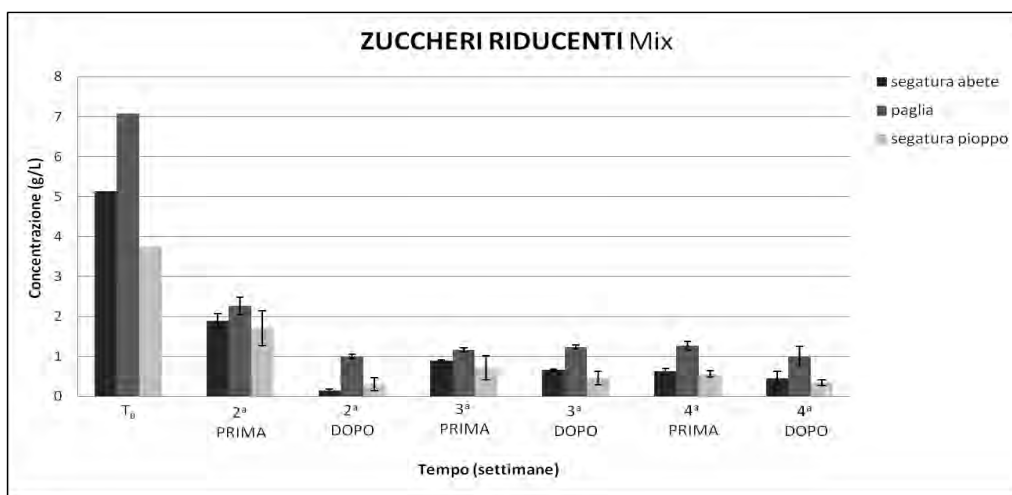


Figura 18 Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con mix di funghi white rot

Per la seconda, la terza settimana e la quarta settimana i dati (prima e dopo l'inoculo batterico) sono ottenuti dalla media dei valori delle due repliche. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

2.5.2.4 Pretrattamento di residui ad alto contenuto in chitina (chitina grezza)

Per ottimizzare l'attività idrolitica del ceppo antartico *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 in colture agitate sommerse è stato messo a punto un disegno fattoriale (RSM). Questo prevedeva l'uso di terreni di coltura che differivano tra loro in contenuto di chitina grezza ed estratto di lievito.

2.5.2.5 Preparazione dell'inoculo

La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata (in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti 50 ml di terreno), a 28 °C e 160 rpm, per 96 h. Il terreno di pre-coltura utilizzato aveva la seguente composizione: yeast nitrogen base 0,5 g/L e glucosio 20 g/L.

L'inoculo è stato ottenuto centrifugando il brodo di coltura (10 min 8000 rpm). Inoltre, al fine di eliminare ogni traccia del vecchio terreno, per eliminare problemi di inibizione da catabolita, il pellet fungino ottenuto è stato lavato più volte con acqua deionizzata sterile, centrifugato, risospeso ed omogeneizzato con Mixer Ultra Turrax.

Dopo omogeneizzazione, sono stati utilizzati come inoculo 6 ml di sospensione miceliare (concentrazione biomassa fungina 5,836 g/L).

2.5.2.6 Biotrattamento (disegno fattoriale)

Sono stati preparati dodici diversi terreni di coltura contenenti 60 ml di acqua deionizzata, chitina grezza ed estratto di lievito a diverse concentrazioni, in base al modello suggerito dal disegno fattoriale elaborato tramite software Modde 5 (Tabella 1). La sperimentazione si è eseguita in coltura agitata in beute Erlenmeyer da 250 ml a 28 °C e 160 rpm. I terreni sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 20 min.

Tabella 1. Disegno fattoriale per la RSM: terreni a diversa concentrazione di chitina grezza ed estratto di lievito

Esperimento No	Terreno	CHITINA (g/L)	YE (g/L)
1	N1	5	0,1
2	N2	30	0,1
3	N3	5	5
4	N4	30	5
5	N5	5	1,73333
6	N6	30	3,36667
7	N7	13,3333	0,1
8	N8	21,6667	5
9	N9	17,5	2,5
10	N10	17,5	2,5
11	N11	17,5	2,5
12	N12	17,5	2,5

L'esperimento si è protratto per quattro settimane: per ciascun terreno inoculato con il ceppo *L. muscarium* CCFEE 5003 si è monitorato il processo fermentativo mediante il prelievo, a cadenza settimanale, di aliquote di 20 ml come già riportato. Si è deciso di monitorare le produzioni a partire dalla seconda settimana di idrolisi, perché si è visto dalle sperimentazioni precedenti che durante la prima settimana non si registrano livelli di produzione di H₂ significativi. Per tutto il periodo di sperimentazione le colture sono state incubate in agitatore orbitale a 28 °C e 160 rpm. Per i campioni (20 ml) si è proceduto alla determinazione delle proteine totali e degli zuccheri riducenti sia al termine della fase aerobica sia dopo la fermentazione anaerobica (Tabb. 2-9) Alla quarta settimana non sono stati determinati proteine totali e zuccheri riducenti dopo la fermentazione anaerobica, perché i campioni sono stati trattenuti presso i laboratori ENEA per monitorarne la produzione di idrogeno per un periodo più lungo (576 h dall'inoculo).

batterico). Settimanalmente, a partire dalla seconda settimana di idrolisi, è stata determinata anche l'attività chitinolitica (Tabella 10).

ZUCCHERI RIDUCENTI (fermentazione aerobica)

Tabella 2. Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

CAMPIONE	Concentrazione (g/L)			
	T ₀	2 ^a settimana idrolisi	3 ^a settimana idrolisi	4 ^a settimana idrolisi
N1	0,104	0,098	0,083	0,070
N2	0,161	0,142	0,099	0,074
N3	0,244	0,129	0,091	0,072
N4	0,110	0,101	0,097	0,075
N5	0,125	0,123	0,093	0,071
N6	0,148	0,121	0,112	0,078
N7	0,153	0,139	0,108	0,071
N8	0,223	0,087	0,083	0,072
N9	0,169	0,146	0,123	0,071
N10	0,169	0,124	0,089	0,068
N11	0,169	0,109	0,104	0,077
N12	0,169	0,169	0,138	0,076

PROTEINE TOTALI (fermentazione aerobica)

Tabella 3. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

CAMPIONE	Concentrazione (g/L)			
	T ₀	2 ^a settimana idrolisi	3 ^a settimana idrolisi	4 ^a settimana idrolisi
N1	0,553	0,081	0,010	0,049
N2	0,556	0,186	0,031	0,015
N3	0,700	0,090	0,036	0,044
N4	0,592	0,048	0,034	0,034
N5	0,684	0,026	0,037	0,016
N6	0,553	0,029	0,044	0,036
N7	0,551	0,023	0,039	0,037
N8	0,596	0,040	0,055	0,725
N9	0,622	0,050	0,046	0,736
N10	0,622	0,044	0,032	0,732
N11	0,622	0,043	0,039	0,735
N12	0,622	0,064	0,034	0,708

ZUCCHERI RIDUCENTI (prima e dopo la fermentazione anaerobica)

Tabella 4. Rilevazione di zuccheri riducenti alla seconda settimana prima e dopo la fermentazione anaerobica

seconda settimana			
prima		dopo	
CAMPIONE	CONCENTRAZIONE E (g/L)	CAMPIONE	CONCENTRAZIONE E (g/L)
N1	0,098	N1	0,196
N2	0,142	N2	0,200
N3	0,129	N3	0,096
N4	0,101	N4	0,125
N5	0,123	N5	0,0696
N6	0,121	N6	0,0806
N7	0,139	N7	0,2986
N8	0,087	N8	0,1826
N9	0,146	N9	0,075
N10	0,124	N10	0,119
N11	0,109	N11	0,245
N12	0,169	N12	0,131

Tabella 5. Rilevazione di zuccheri riducenti alla terza settimana prima e dopo la fermentazione anaerobica

terza settimana			
prima		dopo	
CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)	CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)
N1	0,083	N1	0,090
N2	0,099	N2	0,101
N3	0,091	N3	0,074
N4	0,097	N4	0,071
N5	0,093	N5	0,069
N6	0,112	N6	0,093
N7	0,108	N7	0,082
N8	0,083	N8	0,068
N9	0,123	N9	0,071
N10	0,089	N10	0,076
N11	0,104	N11	0,147
N12	0,138	N12	0,075

Tabella 6 Rilevazione di zuccheri riducenti alla quarta settimana prima della fermentazione anaerobica

quarta settimana			
prima		dopo	
CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)	CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)
N1	0,070	N1	
N2	0,074	N2	
N3	0,072	N3	
N4	0,075	N4	
N5	0,071	N5	
N6	0,078	N6	
N7	0,071	N7	
N8	0,072	N8	
N9	0,071	N9	
N10	0,068	N10	
N11	0,077	N11	
N12	0,076	N12	

Alla quarta settimana non sono stati determinati zuccheri riducenti dopo la fermentazione anaerobica, perché i campioni sono stati trattenuti presso i laboratori ENEA per monitorarne la produzione di idrogeno fino a 576 h dall'inoculo batterico.

PROTEINE TOTALI

Tabella 7 Rilevazione di proteine totali alla seconda settimana prima e dopo la fermentazione anaerobica.

seconda settimana			
prima		dopo	
CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)	CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)
N1	0,081	N1	0,012
N2	0,186	N2	0,006
N3	0,090	N3	0,015
N4	0,048	N4	0,017
N5	0,026	N5	0,009
N6	0,029	N6	0,018
N7	0,023	N7	0,007
N8	0,040	N8	0,028
N9	0,050	N9	0,016
N10	0,044	N10	0,025
N11	0,043	N11	0,037
N12	0,064	N12	0,038

Tabella 8 Rilevazione di proteine totali alla terza settimana prima e dopo la fermentazione anaerobica.

terza settimana			
prima		dopo	
CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)	CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)
N1	0,010	N1	0,006
N2	0,031	N2	0,015
N3	0,036	N3	0,036
N4	0,034	N4	0,028
N5	0,037	N5	0,056
N6	0,044	N6	0,094
N7	0,039	N7	0,064
N8	0,055	N8	0,037
N9	0,046	N9	0,020
N10	0,032	N10	0,078
N11	0,039	N11	0,101
N12	0,034	N12	0,002

Tabella 9. Rilevazione di proteine totali alla quarta settimana prima della fermentazione anaerobica

quarta settimana			
prima		dopo	
CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)	CAMPIONE	CONCENTRAZIONE (g/L)
N1	0,049	N1	/
N2	0,015	N2	
N3	0,044	N3	
N4	0,034	N4	
N5	0,016	N5	
N6	0,036	N6	
N7	0,037	N7	
N8	0,725	N8	
N9	0,736	N9	
N10	0,732	N10	
N11	0,735	N11	
N12	0,708	N12	

Alla quarta settimana non sono state determinate le proteine totali dopo la fermentazione anaerobica, perché i campioni sono stati trattenuti presso i laboratori ENEA per monitorarne la produzione di idrogeno fino a 576 h dall'inoculo batterico.

Attività chitinolitica

Tabella 10. Rilevazione di chitinasi prodotte alla seconda, alla terza e alla quarta settimana di idrolisi in aerobiosi

Terreno	Attività UI/L		
	2 ^a settimana idrolisi	3 ^a settimana idrolisi	4 ^a settimana idrolisi
N1	70	90	82
N2	83	82	91
N3	71	76	84
N4	78	90	78
N5	82	93	74
N6	72	79	142
N7	86	90	75
N8	118	70	72
N9	76	70	68
N10	85	83	82
N11	154	69	80
N12	73	71	73

RSM SECONDA SETTIMANA:

Tabella 11. Chitinasi prodotte alla seconda settimana di idrolisi e i relativi ml di H₂ rilevati nella successiva fase di fermentazione anaerobica

Esperimento No	Terreno	CHITINA (g/L)	YE (g/L)	CHITINASI (UI/L)	H ₂ (ml)
1	N1	5	0,1	70	0,696
2	N2	30	0,1	83	1,612
3	N3	5	5	71	0,324
4	N4	30	5	78	0,461
5	N5	5	1,73333	82	0,602
6	N6	30	3,36667	72	0,468
7	N7	13,3333	0,1	86	0,048
8	N8	21,6667	5	118	0,515
9	N9	17,5	2,5	76	0,935
10	N10	17,5	2,5	85	0,575
11	N11	17,5	2,5	154	0,853
12	N12	17,5	2,5	73	1,038

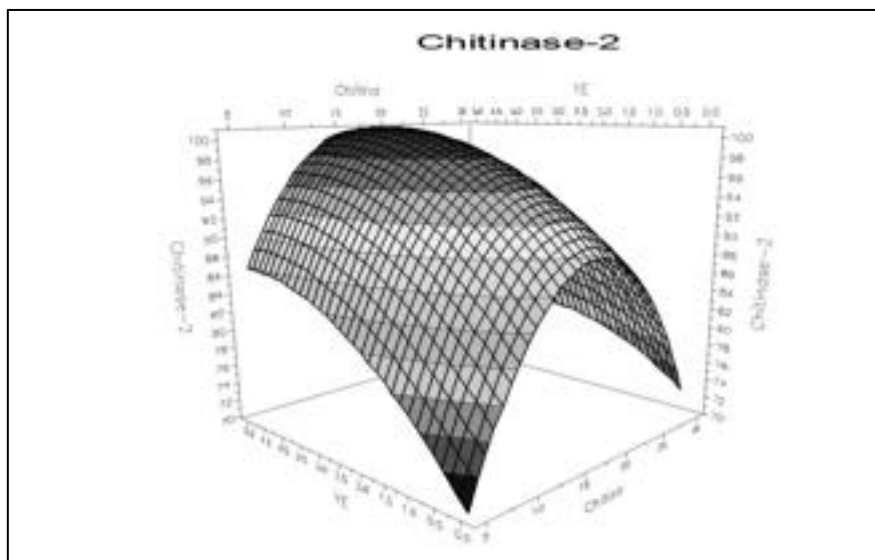


Figura 19. RSM (Response Surface Methodology) relativo alla produzione di chitinasi alla seconda settimana di idrolisi

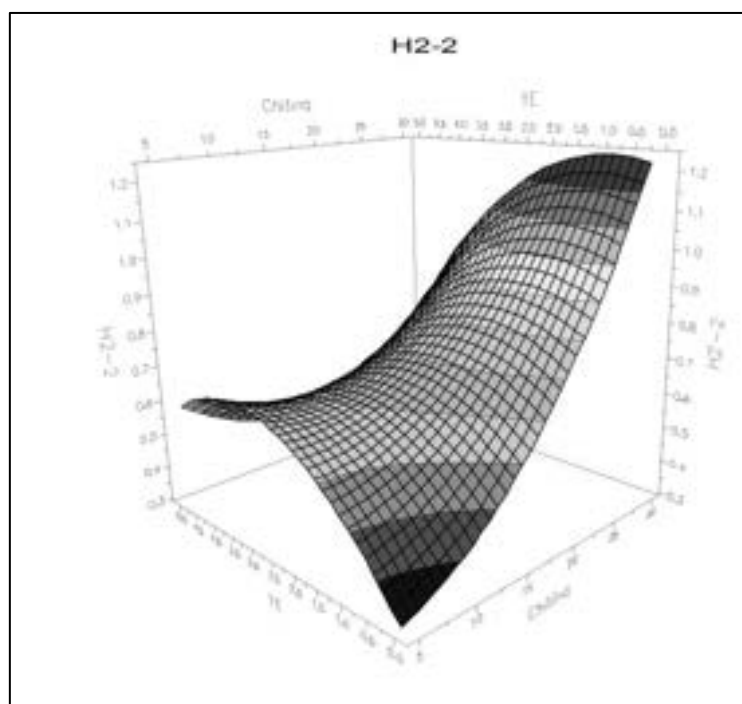


Figura 20. RSM (Response Surface Methodology) relativo alla produzione di idrogeno, rilevata fino a 48 h dall'inoculo batterico, alla seconda settimana

2.5.3 3° prova (agosto-settembre 2013)

2.5.3.1 Pretrattamento di materiale LC

E' stata testata la mix dei 4 ceppi di WR (*Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus*) in colture agitate sommerse utilizzando terreni contenenti segatura di abete o paglia di grano (le due biomasse LC che hanno dato migliori risultati nelle prove precedenti). Si è deciso di utilizzare un quantitativo di estratto di malto inferiore alle prove precedenti, perché in fase di applicazione industriale risulterebbe una scelta economicamente più vantaggiosa. In questa prova è stato effettuato uno scale-up di processo.

2.5.3.2 Preparazione dell'inoculo

La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata (in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti 50 ml di terreno), incubate per 96 h a 28 °C e 160 rpm in agitatore orbitale. Il terreno di pre-coltura utilizzato aveva la seguente composizione: estratto di malto 2 g/L e glucosio 20 g/L.

Sono stati utilizzati come inoculo 20 ml di sospensione miceliare (biomassa fungina pari a c.a. 1,513 g/L) ottenuta unendo aliquote uguali (5 ml) dei vari ceppi.

I singoli brodi di coltura sono stati centrifugati (10 min 8000 rpm) per separare la biomassa. Inoltre, al fine di eliminare ogni traccia dei vecchi terreni, per evitare problemi di inibizione da catabolita, i pellet fungini ottenuti sono stati lavati più volte con acqua deionizzata sterile e centrifugati, risospesi ed omogeneizzati con Mixer Ultra Turrax.

2.5.3.3 Biotrattamento

Sono stati preparati due diversi terreni di coltura in beute Erlenmeyer da 500 ml contenenti:

- 135 ml di acqua deionizzata, 0,169 g estratto di malto e 1,69 g di segatura di abete (A).
- 135 ml di acqua deionizzata, 0,169 g estratto di malto e 1,69 g di paglia (PA).

I terreni sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 min.

L'esperimento è stato condotto per 2 settimane perché si è constatato, nelle sperimentazioni precedenti, che con questa tempistica si verificavano le migliori condizioni di idrolisi per ottenere maggiore produzione di biogas durante la successiva fermentazione anaerobica. Per ciascun terreno inoculato con la mix fungina sono state allestite 3 repliche, due da utilizzare come replicati nella successiva fermentazione anaerobica (presso i laboratori ENEA) ed una come bianco (a meno dell'inoculo batterico). Per tutto il periodo di pretrattamento idrolitico le colture sono state incubate a 28 °C e 160 rpm in agitatore orbitale. Per le aliquote si è proceduto alla determinazione delle proteine totali e degli zuccheri riducenti alla seconda settimana di idrolisi (Figg.21-22). La prova è ancora in corso, si stanno monitorando le produzioni di bioidrogeno presso i laboratori ENEA.

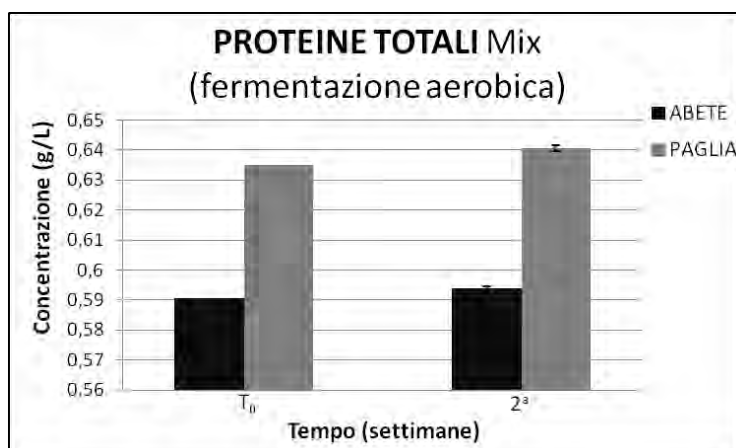


Figura 21. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con mix di funghi white rot.
T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

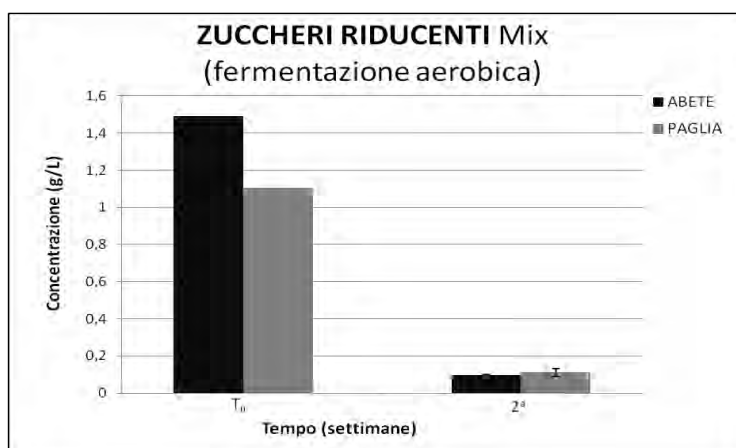


Figura 22. Rilevazione degli zuccheri riducenti negli esperimenti di idrolisi con mix di funghi white rot. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

2.5.3.4 Pretrattamento di residui ad alto contenuto in chitina (chitina grezza).

In questa prova è stato effettuato uno scale-up di processo per ottimizzare il rilevamento del biogas prodotto. Non essendo possibile effettuare un'altra sperimentazione RSM completa nel processo di scale-up a questo punto si è scelto di testare il ceppo antartico *L. muscarius* CCFEE 5003 in coltura agitata sommersa utilizzando il terreno N7 (vedi disegno fattoriale della prova maggio-giugno 2013).

2.5.3.5 Preparazione dell'inoculo

La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata (in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti 50 ml di terreno), incubate per 96 h nelle condizioni suddette. Il terreno di pre-coltura utilizzato aveva la seguente composizione: estratto di lievito 2 g/L e glucosio 20 g/L.

L'inoculo è stato ottenuto come già riportato.

Dopo omogeneizzazione sono stati utilizzati come inoculo 20 ml di sospensione miceliare (concentrazione biomassa fungina 6,020 g/L).

2.5.3.6 Biotrattamento

E' stato preparato il terreno N7 in beuta Erlenmeyer da 500 ml contenente:

- 135 ml di acqua deionizzata, 1,8 g chitina e 0,014 g di estratto di lievito.

Il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121 °C per 20 min.

Si è visto nelle sperimentazioni precedenti, che durante la fermentazione anaerobica, si registra maggiore produzione di biogas nella fase anaerobica utilizzando materiale idrolizzato per due settimane. Pertanto si è deciso di condurre l'esperimento per due settimane. Per il medium N7 inoculato con la biomassa fungina sono state allestite 3 repliche, due da utilizzare come replicati nella successiva fermentazione anaerobica (presso i laboratori ENEA) ed una come bianco (a meno dell'inoculo batterico). Per tutto il periodo di pretrattamento idrolitico le colture sono state incubate come già riportato per gli esperimenti precedenti. Per i campioni si è proceduto alla determinazione delle proteine totali, degli zuccheri riducenti (Figg.23-24) e delle chitinasi alla fine della seconda settimana di idrolisi. La prova di fermentazione anaerobica è ancora in corso: si stanno monitorando le produzioni di bioidrogeno presso i laboratori ENEA.

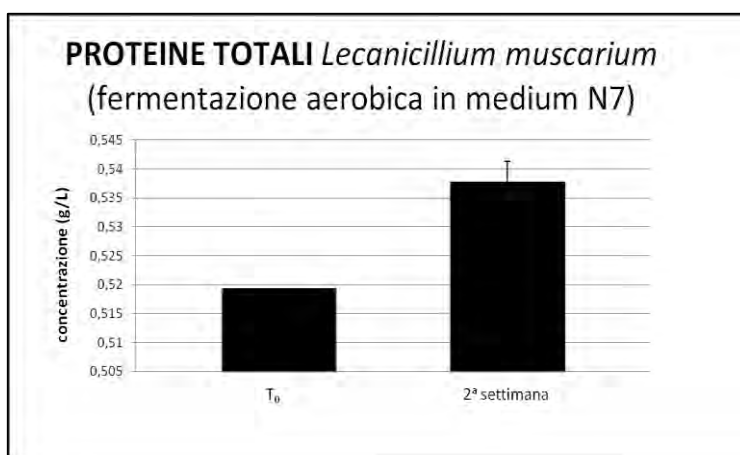


Figura 23. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 in medium N7. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

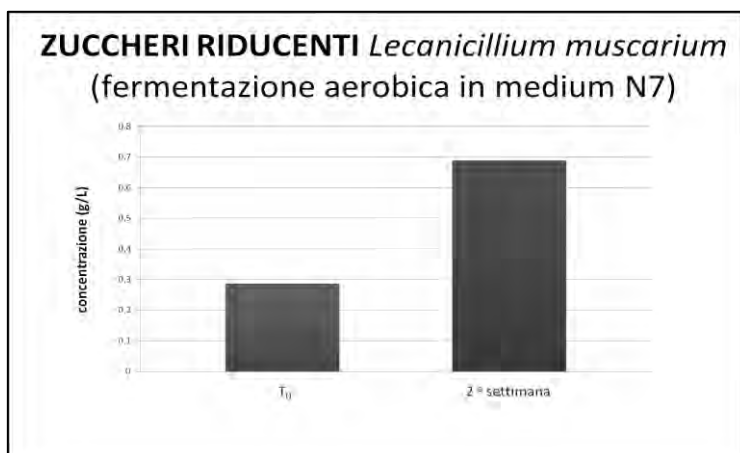


Figura 24. Rilevazione delle proteine totali negli esperimenti di idrolisi con *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 in medium N7. T₀ rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo.

CHITINASI

Sono state determinate le chitinasi prodotte alla seconda settimana di pretrattamento idrolitico aerobico. Il valore medio delle tre repliche è risultato pari a 113,1 ± 10,4 UI/L

2.6 Misura dell'attività idrolitica

In parallelo alla prova allestita ad agosto 2013, si è deciso di misurare l'attività idrolitica correlandola con l'attività metabolica di un inoculo quantizzato tramite misurazione del B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand).

Sono stati rilevati i valori di B.O.D. (lettura a 99 h) ottenuti inoculando 10 ml di biomassa fungina in 100 ml di media contenenti materiali LC e chitinosi selezionati, per avere un'indicazione dell'attività idrolitica dei ceppi sui substrati considerati supponendo che a B.O.D maggiore corrisponde un maggiore consumo di ossigeno dovuto a maggior attività metabolica (Tabella 12).

2.6.1 Preparazione dell'inoculo

Sono stati preparati due diversi terreni di coltura ed inoculati con 10 ml di sospensione miceliare di *Trametes trogii* (concentrazione biomassa fungina 0,663 g/L):

- 100 ml di acqua deionizzata, 0,125 g estratto di malto e 1,25 g di segatura di abete (A).
- 100 ml di acqua deionizzata, 0,125 g estratto di malto e 1,25 g di glucosio (G).

I terreni sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 20 min.

Al fine di confrontare l'attività idrolitica del ceppo fungino su materiale LC, difficilmente metabolizzabile rispetto al glucosio, abbiamo utilizzato due diversi terreni di coltura, uno contenete glucosio e l'altro segatura di abete

Sono stati inoculati nel medium N7 10 ml di sospensione miceliare di *L. muscarium* (concentrazione biomassa fungina 6,020 g/L):

- 100 ml di acqua deionizzata, 0,01 g estratto di lievito e 1,33 g di chitina.

Il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121 °C per 20 min.

Tabella 12. Valori di B.O.D. rilevati a 99h

CEPPO	Terreno	B.O.D.
Trametes trogii	G	507
	A	464
Lecanicillium muscarium	N7	459

2.7 Prove di isolamento e mantenimento di funghi anaerobici.

E' stata avviata un'analisi bibliografica relativa ai funghi ruminali (RF) in grado di degradare il materiale LC direttamente in condizioni anaerobiche. L'utilizzo di questi microrganismi si pensa possa potenziare la fase anaerobica di produzione del biogas eliminando la pre-idrolisi in condizioni aerobiche. In questo contesto si è proceduto a prove preliminari di isolamento e mantenimento di RF.

2.7.1 Analisi bibliografica

I funghi intestinali anaerobi si pensa derivino da forme libere di Chitridiomycetes che hanno evoluto l'abilità di sopravvivere in condizioni anaerobiche nel tratto digestivo degli erbivori che li ospitano, in particolare ruminanti (i RF costituiscono c.a. 89% dei funghi intestinali anaerobi) [8-10]. L'assenza di mitocondri, la presenza di idrogenosomi sono indubbiamente un adattamento all'anaerobiosi, mentre altri adattamenti e peculiarità biochimiche si sono sviluppati in risposta al duro ambiente chimico del rumine [8,11].

Inquadramento tassonomico dei funghi del rumine:

CLASSE: *Chytridiomycetes*

FAMIGLIA: *Neocallimastigaceae*

GENERI: *Neocallimastix* [8,12]; *Piromyces* [8,13], *Caecomyces* [8,14]; *Orpinomyces* [8,13]; *Anaeromyces* [8,15]

Caratteri morfologici generali:

- *Neocallimastix*: monocentrico; zoospore poliflagellate; molte specie presentano sia sviluppo endogeno che esogeno; sistema rizoidale miceloide filamentoso [8]
- *Piromyces*: monocentrico; zoospore uniflagellate; molte specie presentano sia sviluppo endogeno che esogeno; sistema rizoidale miceloide filamentoso [8]
- *Caecomyces* (*Sphaeromonas*): monocentrico; zoospore uniflagellate; molte specie presentano sia sviluppo endogeno che esogeno; sistema rizoidale bulboso [8]
- *Orpinomyces*: policentrico, zoospore poliflagellate, nella fase iniziale di crescita presenta sporangiofori e sporangi intercalati nelle ife, presenta sporangi nella zona terminale degli sporangiofori maturi e quest'ultimi possono svilupparsi come singoli o come complessi ramificati [8]
- *Anaeromyces*: policentrico; zoospore uniflagellate; non presenta complessi sporangiofori e gli sporangi (che sono soprattutto ellissoidali e fusiformi) si trovano nella zona terminale su sporangiofori singoli [8]

I funghi anaerobici sono autoctoni nel rumine e degradano attivamente la parete cellulare delle piante ed i carboidrati. Producono cellulasi altamente attive ed emicellulasi, soprattutto xilanasi.

I RF possiedono la capacità di penetrare la cuticola superficiale delle piante ed i tessuti lignificati delle pareti cellulari. Inoltre, digeriscono substrati recalcitranti, come la paglia, più facilmente (37-50%) di quanto non facciano i batteri ruminali [16,17].

Questi microrganismi sono i colonizzatori iniziali del materiale lignocellulosico negli animali erbivori e giocano un ruolo fondamentale nella biodegradazione della biomassa vegetale da questi ingerita [16,18].

I RF sono in grado di colonizzare estensivamente frammenti vegetali fibrosi con conseguente sviluppo di talli. Le forme uniflagellate sono state identificate come stadio iniziale del ciclo vitale. L'attacco delle zoospore al materiale LC è rapido e massivo e la colonizzazione elevata (osservata su substrati vegetali: fibra SISAL, steli di erba medica fresca, paglia di erba medica e paglia di grano) [19].

Dall'analisi bibliografica si è visto che esistono vari lavori di caratterizzazione della produzione enzimatica dei RF. Al contrario, solo recentemente si è focalizzata l'attenzione sull'incremento di produzione di biogas mediante l'impiego di questi microrganismi.

L'aggiunta di funghi ruminali e di insilati di mais o erba in fanghi di fermentazione anaerobica, influenza positivamente la resa di biogas [20].

Pertanto la ricerca su questi interessanti degradatori di biomasse lignocellulosiche in condizioni anaerobiche è moderna e particolarmente coerente con le problematiche del nostro progetto.

2.7.2 Prove preliminari di isolamento e mantenimento di funghi anaerobici

Dall'analisi bibliografica condotta si è potuto constatare che i funghi anaerobici richiedono molta cura nelle procedure di prelievo di campioni, trasporto, isolamento e mantenimento. Inoltre, sono solo poche le collezioni a livello mondiale di questi funghi (in Italia nessuna micoteca dispone di ceppi di RF). Analizzando vari lavori scientifici si è individuato un gruppo di ricerca particolarmente esperto del settore: il gruppo del Dott. Ugur Comlekcioglu (Università Kahramanmaraş Sütçü İmam, Turchia). Al fine di abbreviare i tempi di apprendimento delle tecniche di campionamento e di coltivazione degli RF, si è preso contatto con i colleghi suddetti. Nel mese di luglio 2013 nell'ambito di un programma ERASMUS tra Università della Tuscia ed il gruppo di ricerca suddetto, i colleghi hanno trascorso una settimana in Italia durante la quale ci sono stati numerosi interscambi e confronti sulla tematica RF sia presso l'Università della Tuscia che presso l'UTRINN. Inoltre i colleghi Turchi hanno trasferito alcune nozioni per il campionamento e messa in coltura degli RF attraverso attività di laboratorio (presso i laboratori ENEA) alle quali hanno partecipato tutti i ricercatori interessati al progetto.

3 Conclusioni

L'analisi dei risultati ottenuti dalle prove effettuate ha evidenziato che, durante il processo di idrolisi, anche se in maniera differenziata a secondo delle varie tesi, in tutti gli esperimenti le proteine totali aumentano nel corso delle settimane. L'andamento degli zuccheri riducenti è al contrario variabile. Questo va a confermare i risultati ottenuti nelle precedenti sperimentazioni (Report RdS/2012/290).

Nel corso della prima prova (febbraio 2013) si è registrato un decremento dei valori dei pesi secchi totali (pellet e surnatante). Ricordiamo che questo parametro dà un'idea generale di ciò che il fungo ha consumato respirando e che è stato eliminato sotto forma di CO₂.

L'aumento del peso secco del surnatante, causato dal rilascio di sostanze solubili nel terreno (proteine, zuccheri, ecc...), può essere considerato comunque un indice dell'idrolisi. Teoricamente, un surnatante ricco di composti fermentescibili dovrebbe essere buon substrato per la fermentazione a idrogeno successiva.

Per quanto riguarda il disegno fattoriale, come esempio abbiamo riportato la produzione di idrogeno e di enzimi chitinolitici alla seconda settimana. I grafici mostrati rappresentano la proiezione del modello RSM sulle variabili suddette mentre gli esperimenti effettivamente condotti sono quelli proposti dal modello e riportati nella tabella 1.

Possiamo notare un effetto sinergico della concentrazione di chitina e YE sulla produzione enzimatica. Infatti, le chitinasi aumentano proporzionalmente all'aumentare della concentrazione di questi substrati. Mentre l'aumento di enzima è sempre proporzionale alla concentrazione di YE, per la chitina questo avviene solo fino a c.a. 16 g/L. Effettivamente, all'ulteriore aumentare di questa, probabilmente per problemi reologici, la produzione di enzima diminuisce (Figura 19).

Per quanto riguarda la produzione di H₂, invece, il parametro più influente sembra essere la concentrazione di chitina (Figura 20). La produzione del gas, infatti, aumenta proporzionalmente alla concentrazione di chitina ed è massima a c.a. 30 g/l di chitina e 0,75 g/L di YE.

Questo risultato, apparentemente contrastante con i risultati di produzione enzimatica, potrebbe essere spiegato con la presenza di microrganismi chitinolitici nel consorzio batterico utilizzato nella fermentazione anaerobica. Questa ipotesi è supportata dal generale aumento degli zuccheri riducenti durante questa fase, chiaro segno di idrolisi del polisaccaride.

Inoltre, la prova che ha ottenuto i migliori risultati di produzione enzimatica e quindi di idrolisi aerobica ha generato la minore produzione di H₂. Questo perché probabilmente il fungo aerobico con l'idrolisi e conseguente crescita ha sottratto substrato ai microrganismi anaerobici.

Pertanto, alla luce di queste considerazioni, se si confermasse la presenza di batteri chitinolitici nella mix anaerobica, la fase idrolitica in aerobiosi non sarebbe determinante e potrebbe essere evitata. Inoltre gli scarti di chitina potrebbero essere davvero considerati substrati molto promettenti per la produzione di bioidrogeno.

Riguardo alla caratterizzazione dell'attività idrolitica del ceppo *Trametes trogii*, inoculato nei due terreni contenenti glucosio e segatura di abete, si può affermare dai valori di B.O.D. rilevati (Tabella 12), che non vi è sostanziale differenza di metabolizzazione dei due substrati testati. In altre parole, essendo simile il consumo di ossigeno, il ceppo sembra crescere in maniera analoga su entrambi i substrati mostrando un indice di un'attività metabolica simile.

Comparando, invece, i valori di B.O.D. rilevati per *Trametes trogii* e *Lecanicillium muscarium*, si può notare che sono simili. Tuttavia, essendo la biomassa del primo, dieci volte inferiore a quella del secondo (come misurato con i pesi secchi), si può concludere che l'attività idrolitica di *T. trogii* è nettamente superiore a quella di *L. muscarium* sui terreni testati.

Per quanto concerne eventuali sviluppi futuri, oltre a caratterizzare ulteriormente il processo idrolitico di *L. muscarium* inoculandolo nel medium più produttivo, si proseguirà ad isolare i ceppi di funghi ruminali ed impostare prove preliminari di pretrattamento idrolitico in condizioni anaerobiche.

Riferimenti bibliografici

1. Claassen P. A. M., van Lier J. B., Lopez Contreras A. M., van Niel E. W. J., Sijtsma L., Stams A. J. M., de Vries S. S. and Weusthuis R. A.. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(6) (1999): 741-755.
2. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006): 603-632
3. Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation FEMS Microbiol. Rev. 13 (1994): 125-135
4. Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotech.* 41 (1995): 1-17.
5. Platt M.W., Hadar Y., Chet I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 20 (1984):150-154.
6. Cohen R., Persky L. and Hadar Y.. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002): 582-594.
7. Fenice M., Selbmann L., Di Giambattista R. and Federici F. Chitinolytic activity at low temperature of an antarctic strain (A3) of *Verticillium* cfr. *Lecanii*. *Res. Microbiol.* 149 (1998): 289-300.
8. Ho, Abdullah, Jalaludin. *The diversity and taxonomy of anaerobic gut fungi*.
9. Heath, I.B. *Gut fungi*. Trends in Ecology and Evolution 3 (1988). 167-171.
10. Davies D.R., Theodorou M.K., Lawrence M.I. and Trinci A.P.J. (1993). *Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces*. *Journal of General Microbiology* 139: 1395-1400.
11. Heath I.B., Bauchop T. and Skipp R.A. *Assignment of the rumen anaerobe Neocallimastix frontalis to the Spizellomyces (Chytridiomycetes) on the basis of its spore ultrastructure*. *Canadian Journal of Botany* 61 (1983): 295-307.
12. Vavra J. and Joyon, L. *Etude sur la morphologie, le cycle evolutif et la position systematique de Callimastix cyclops* is Weissenberg 1912. *Protistologica* 2 (1966): 15-16.
13. Barr D.J.S., Kudo H., Jaboker K.D. and Cheng K.J. *Morphology and development of rumen fungi: Neocallimastix sp., Piromyces communis and Orpinomyces bovis gen. nov., sp. novo*. *Canadian Journal of Botany* 67 (1989): 2815-2824.
14. Gold J.J., Heath L.B. and Bauchop T. *Ultrastructure description of a new chytrid genus of caecum anaerobes, Caecomyces equi gen. nov., sp. nov., assigned to the Neocallimasticeae*. *BioSystem* 21. (1988): 403-415.
15. Breton A., Bernalier A., Dusser M., Fonty G., Gaillard-Martinie B. and Guillot J. *Anaeromyces mucronatus* novo gen., novo sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS Microbiology Letters* 70 (1990): 177-182.
16. Comlekcioglu U., Ozkose E., Yazdic F. C., Akyol I and Ekinici M. S. Polysaccharidase and Glycosidase Production of Avicel Grown Rumen Fungus *Orpinomyces* sp. GMLF5. *Acta Biologica Hungarica* 61(3) (2010), pp. 333-343
17. Joblin K. N. *Physical disruption of plant fibre by rumen fungi of the Sphaeromonas group*. In: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. (eds) *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Penambul Books, Armidale, Australia (1989): 259-260.
18. Dijkerman R., Bhansing D. C. P., Op den Camp H. J. M., van der Drift C., Vogels G. D. *Degradation of structural polysaccharides by the plant cell wall degrading enzyme system from anaerobic fungi: an application study*. *Enz. Microbiol. Technol.* 21(1997): 130-136.
19. Bauchop T. *Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep*. *Applied and Environmental Microbiology* 38 (1979a): 148-158.
20. Procházka J., Mrázek J., Štrosová L. *Enhanced biogas yield from Energy crops with rumen anaerobic fungi*. *Engineering in Life* 12 (3) (2012): 343-351

Abbreviazioni ed acronimi

- A: abete
- DNSA: acido dinitrosalicilico
- G: glucosio
- LC: lignocellulosica
- NAG: N-acetilglucosammina
- PA: paglia
- PI: pioppo
- RF: rumen fungi
- RSM: response surface methodology
- WR: white rot
- YE: yeast extract

Curriculum scientifico del gruppo di ricerca

Il Laboratorio di Microbiologia e Microbiologia Applicata fa parte del DEB (Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche) dell'Università della Toscana. Il DEB si articola in numerosi laboratori, che afferiscono a network quali CONISMA (Consorzio Interuniversitario per le Scienze del Mare) e CNISM (Consorzio Nazionale Interuniversitario per le Scienze Fisiche della Materia). Il laboratorio, cui afferisce anche il "Laboratorio di Microbiologia Marina Applicata" del CONISMA (Consorzio Interuniversitario Scienze del Mare), è attivo in vari campi di ricerca tra loro interconnessi, che comprendono:

- La biodiversità di microrganismi marini;
- La biodiversità di microrganismi estremofili;
- Le biotecnologie microbiche;
- La microbiologia ambientale;
- L'ecologia microbica.

Tra i numerosi progetti di ricerca, finanziati a livello nazionale ed internazionale, che afferiscono alle suddette tematiche alcuni riguardano i seguenti argomenti:

- Lo studio di microrganismi marini e loro potenziali applicazioni.
- Lo studio di microrganismi o consorzi microbici per la degradazione ed il riuso di effluenti o scarti agro-industriali.

Sono attivi studi sui seguenti ambienti estremi o sub-estremi:

- Mare Mediterraneo;
- Mar Bianco (Circolo Polare Artico, Russia);
- Mare di Ross (Antartide);
- Lago "La Caldera" (Sierra Nevada, Spagna)..

Sono attivi studi su:

- Produzione e caratterizzazione di enzimi da microrganismi marini;
 - Produzione e caratterizzazione di enzimi da microrganismi estremofili (in particolare psicrofili e psicrotolleranti);
 - Ottimizzazione della produzione di Biogas (idrogeno e metano).
 - Utilizzo di microrganismi (batteri, funghi e alghe) o enzimi microbici nel trattamento biologico di sostanze recalcitranti ed effluenti o scarti agro-industriali; applicazione delle interazioni tra microrganismi
- Sono attivi studi su:
- Trattamento microbico di scarti dell'industria olearia;
 - Applicazione di funghi micoparassiti o loro enzimi.

Il laboratorio ha collaborato o collabora attivamente con numerose istituzioni nazionali e internazionali tra cui:

- University of Aberdeen, Dep. of Molecular and Cell Biology, Aberdeen, Scotland.
- University of Granada, Instituto del Agua, Granada, Spain.
- University of Moscow (Lomonosov), (White Sea Oceanographic Station), Moscow, Russia.
- NESTEC, Centre Recherche Nestlé, Lausanne, CH.
- ENEA, Sez. Biologia Ambientale e Conservazione della Natura, Casaccia Roma, Italy.
- Barone Ricasoli s.p.a. Brolio, Siena, Italy.