



Ricerca di Sistema elettrico

Funghi anaerobi ruminali: saggi enzimatici e scaling up dell'inoculo

Lembo G., Gorrasi S., Mazzurco Miritana V., Fenice M.



FUNGHI ANAEROBI RUMINALI: SAGGI ENZIMATICI E SCALING UP DELL'INOCULO

Lembo G., Gorrasi S., Mazzurco Miritana V., Fenice M.(Università della Tuscia)

Settembre 2016

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2015

Area: Generazione di energia elettrica con basse emissioni di carbonio

Progetto: Bioenergia

Obiettivo: Nuovi processi di co-produzione flessibile e programmabile di elettricità e biometano

Responsabile del Progetto: Vincenzo Gerardi, ENEA

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione "Funghi anaerobi ruminali: saggi enzimatici e scaling up dell'inoculo"

Responsabile scientifico ENEA: Antonella Signorini

Responsabile scientifico Università della Tuscia: Massimiliano Fenice

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	7
2.1 CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO DI PRODUZIONE DI BIOGAS E POTENZIALITÀ IDROLITICA DEI FUNGHI RUMINALI NEOCALLIMASTIX SP. E ORPINOMYCES SP.	7
2.1.1 <i>Descrizione della sperimentazione</i>	7
2.1.2 <i>Materiali e metodi</i>	7
3 RISULTATI	10
3.1 CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO DI PRODUZIONE DI BIOGAS	10
3.2 POTENZIALITÀ IDROLITICA DEI FUNGHI RUMINALI	11
3.3 FUNGHI ANAEROBI RUMINALI: SCALING-UP DELL'INOCULO.....	12
3.3.1 <i>Ottimizzazione del terreno colturale e delle condizioni di anaerobiosi</i>	12
3.3.2 <i>Scaling-up del processo di crescita di Orpinomyces sp.</i>	13
4 CONCLUSIONI.....	17
5 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	18
6 ABBREVIAZIONI ED ACRONIMI.....	20

Sommario

I mammiferi erbivori e numerosi insetti xitofagi non producono enzimi cellulolitici capaci di degradare il materiale vegetale ingerito e per svolgere questa funzione fanno affidamento all'associazione simbiotica con un pool di microrganismi presenti nel loro tratto intestinale. All'interno di questo consorzio giocano un ruolo fondamentale i funghi anaerobi ruminali (ARF). Una caratteristica di questi microrganismi è che sono tra i più attivi degradatori di materiale cellulolitico del mondo biologico conosciuto [1] e producono una gran quantità di enzimi e di complessi enzimatici capaci di degradare la parete cellulare vegetale e le fibre vegetali ingerite dall'animale ospite. Poiché la degradazione del materiale lignocellulosico è attualmente ritenuto il principale collo di bottiglia nel processo di digestione anaerobica, grandi passi avanti potrebbero venire dallo studio di tali funghi.

Attualmente per degradare la biomassa lignocellulosica vengono effettuati dei pre-trattamenti chimico-fisici. Con l'utilizzo degli ARF si apre, invece, la possibilità di effettuare dei co-trattamenti "in situ" tramite il potenziamento di tale comunità nei digestori anaerobici [2].

Nello studio effettuato dall'Università della Tuscia e in quello effettuato dall'ENEA nel precedente Accordo di Programma (Report RdS/PAR2014/143; Report RdS/PAR2014/145) l'utilizzo di un inoculo integrato di Funghi Anaerobi Ruminali (ARF) appartenenti ai generi *Neocallimastix sp.* ed *Orpinomyces sp.* e di un consorzio selezionato di idrogeno produttori (F210), ha consentito di ottenere rilevanti incrementi della produzione di biogas da chitina e da paglia di grano.

Obiettivo di questa annualità di ricerca è caratterizzare il processo di crescita e sviluppo dei funghi ruminali mediante il monitoraggio della produzione di biogas e la messa a punto di saggi enzimatici per il rilevamento dell'attività idrolitica. In un'ottica di una possibile applicazione industriale su larga scala di ceppi fungini ruminali per migliorare i processi di produzione di biogas, si è testata la capacità dei funghi anaerobi di crescere in colture sommerse in bioreattore da banco CSTR con un volume totale di 3 litri, considerato un primo significativo step di scale-up industriale.

Inoltre, dato che il passaggio di scala effettuato in questa sperimentazione utilizzerà volumi di venti volte superiori, si è testata anche la possibilità di ottimizzare il terreno di crescita al fine di ridurre i costi di produzione e di esercizio di tali inoculi per un utilizzo su scala reale.

Ai fini del miglioramento dell'idrolisi dei materiali lignocellulosici è estremamente importante conoscere l'azione dei microrganismi responsabili di questo processo, e come detto in precedenza, in questo contesto gli ARF svolgono un ruolo fondamentale.

Interessanti risultati sono stati raggiunti nell'ottica di uno scaling-up di processo a livello industriale. L'ottimizzazione del terreno di coltura con la forte riduzione dei tempi di flussaggio con CO₂ indispensabili per il mantenimento di un ambiente anaerobico, è particolarmente importante per lo scale-up di bioreattori industriali, dove i volumi maggiori dei terreni di coltura impiegati necessiterebbero, con la procedura comunemente utilizzata, di quantità di CO₂ estremamente elevati ed economicamente non sostenibili.

Altro risultato importante, sempre in un'ottica di una possibile applicazione industriale, è la capacità della comunità fungina di crescere e svilupparsi in nuove condizioni colturali ed in volumi 20 volte maggiori a quelli comunemente utilizzati nei lavori sperimentali presenti in letteratura. Questo risultato non era scontato, in quanto alcuni microrganismi non riescono a svilupparsi sufficientemente in questi sistemi. Proprio a causa della difficoltà di coltivazione e mantenimento, ad oggi gli ARF vengono correntemente coltivati in piccola scala, in tubi o bottiglie sierologiche, con volumi di lavoro che vanno da circa 7 a 100 mL, per cui è necessario effettuare frequentemente subculture per mantenerli; l'ottenimento di quantità significative di biomassa in bioreattore è una condizione basilare per lo scale-up a livello industriale.

1 Introduzione

La biomassa di origine organica sia essa derivante da scarti vegetali o da scarti urbani (FORSU), è la più grande riserva di energia rinnovabile ecosostenibile presente sulla terra [3]. Ma la struttura complessa di questi substrati ricchi di materiale lignocellulosico difficile da degradare porta con sé diversi svantaggi per la produzione di biogas.

Il processo che avviene naturalmente all'interno del rumine degli erbivori può servire da modello per migliorare la conversione di queste biomasse lignocellulosiche in energia. I funghi anaerobi ruminali giocano in questo contesto un ruolo chiave nel sistema digerente di tali animali, grazie alla produzione esogena di famiglie di enzimi idrolitici capaci di degradare i costituenti della parete cellulare delle piante quali lignina, cellulosa ed emicellulosa. Questa attività enzimatica accoppiata alla crescita e penetrazione del micelio fungino all'interno della parete cellulare vegetale, permette una degradazione dei polisaccaridi di membrana superiore a quella operata dagli eubatteri.

Questa doppia azione meccanica ed enzimatica di degradazione del materiale lignocellulosico rende i funghi anaerobi ruminali dei candidati promettenti per il loro utilizzo all'interno di impianti di digestione anaerobica al fine di aumentare la produzione di biogas e/o il metano in esso contenuto.

I funghi anaerobi, scoperti per la prima volta da Colin Orpin nel 1975 nel rumine degli animali, rappresentano un promettente e nuovo settore di ricerca. Sono considerati gli organismi con le più elevate capacità di idrolisi della cellulosa [1]. Ciò è dovuto all'estensiva produzione di enzimi idrolitici quali cellulasi, emicellulasi, xilanasi, proteasi, amilasi, amiloglicosidasi, pectinasi etc. A differenza di quanto avviene per i batteri idrolitici aerobi, che secernano enzimi in forma solubile a livello extracellulare, nei microrganismi anaerobi, compreso gli ARF, viene frequentemente prodotto un complesso multi enzimatico ad elevato peso molecolare, detto cellulossoma. La complessa struttura del cellulossoma degli ARF non è ancora ben caratterizzata. A livello funzionale però è noto che il cellulossoma favorisce in primo luogo l'adesione alla parete cellulare vegetale: la formazione di un complesso macromolecolare consente la prossimità spaziale delle unità catalitiche, che ne potenzia le interazioni sinergiche [4]. In questo modo, il microrganismo produttore del cellulossoma è in grado di controllare la stechiometria enzimatica che consente di ottenere una sinergia maggiore dell'attività enzimatica che non è possibile realizzare quando gli enzimi sono secreti liberi nello spazio extracellulare [5]. Oltre a svolgere un'azione chimica i ARF ne svolgono anche una fisica: infatti riescono a penetrare all'interno delle fibre vegetali con la formazione di miceli, contribuendo così ad una disgregazione meccanica dei substrati. Oltre al cellulossoma, che converte il materiale vegetale in zuccheri fermentabili, alcuni ceppi di ARF come ad esempio *Neocallimastix sp.*, posseggono una particolare struttura intracellulare chiamata idrogenosoma, che converte, a seguito di idrolisi, lo zucchero rilasciato in idrogeno (H_2) [6], fornendo ulteriore energia alla cellula fungina. Inoltre la produzione di idrogeno attraverso il metabolismo degli idrogenosomi permette ad altri microrganismi di ridurre l' H_2 a prodotti energeticamente più favorevoli come il metano. Questo trasferimento dell'idrogeno inter-specifico mantiene l'equilibrio termodinamico della flora ruminale ed ha un impatto positivo sull'attività cellulolitica dei funghi ruminali [5].

I funghi anaerobi sono presenti nel tratto digerente di molti mammiferi erbivori, ruminali e non, e nel tratto intestinale di alcuni insetti xitofagi, come termiti e tarli del legno [7] dove costituiscono circa l'8-10% della biomassa microbica [8] ed insieme a batteri e protozoi compongono la comunità dell'ecosistema "rumine". Diversi studi hanno sottolineato l'importanza della cooperazione o simbiosi tra questi microrganismi, sviluppando il concetto di alimentazione incrociata dei nutrienti tra e nelle micronicchie del rumine [8].

La cellulosa è un omopolimero costituito da ripetizioni di unità di glucosio unite tra loro da un legame β -1,4 glucosidico: queste lunghe catene sono disposte parallelamente le une alle altre e si legano fra loro per mezzo di legami ad idrogeno molto forti, formando fibrille, catene molto lunghe, difficili da dissolvere. Queste fibrille localmente sono molto ordinate al punto da raggiungere una struttura cristallina alternata a regioni amorfe. La cellulosa è idrolizzata da un complesso enzimatico noto come cellulasi. Questo complesso è formato da almeno tre enzimi: le endoglucanasi (endo1-4- β -D-glucanasi, carbossimetilcellulasi), che agiscono randomicamente nella parte solubile ed insolubile della cellulosa; le esoglucanasi (eso1-4- β -D-glucanasi), che

liberano cellobiosio dalle porzioni terminali riducenti e non riducenti delle catene di cellulosa; e le β -glucosidasi che liberano glucosio dal cellobiosio.

Visti i risultati ottenuti nelle annualità precedenti circa l'utilizzo di funghi ruminanti anaerobi (ARF) come potenziatori della fase idrolitica della Digestione Anaerobica per migliorare l'efficienza del processo di produzione di metano, nella presente annualità l'attività di ricerca ha avuto gli obiettivi di:

1. Caratterizzazione del processo di crescita e sviluppo dei funghi ruminanti mediante il monitoraggio della produzione di biogas e messa a punto di saggi enzimatici per il rilevamento dell'attività idrolitica.
2. Nell'ottica di una possibile applicazione industriale su larga scala di ceppi fungini ruminanti per migliorare i processi di produzione di biogas, si è testata la capacità dei funghi anaerobi di crescere in colture sommerse in bioreattore da banco CSTR con un volume totale di 3 litri, considerato un primo significativo step di scale-up industriale. Inoltre visti i volumi utilizzati, maggiori di venti volte, si è testata anche la possibilità di una ottimizzazione del terreno di crescita al fine di ridurre i costi di produzione e di esercizio di tali inoculi per l'utilizzo industriale.

2 Descrizione delle attività svolte e risultati

2.1 Caratterizzazione del processo di produzione di biogas e potenzialità idrolitica dei funghi ruminanti *Neocallimastix sp.* e *Orpinomyces sp.*

2.1.1 Descrizione della sperimentazione

Le attività sperimentali sono state svolte presso il laboratorio di Microbiologia coordinato dal Prof. M. Fenice, presso il Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche (DEB) dell'Università della Tuscia in collaborazione con ENEA.

Per sviluppare la prima linea sperimentale, colture pure di ARF, *Neocallimastix sp.* e *Orpinomyces sp.*, crioconservate (-20 °C) presso i laboratori ENEA sono state attivate mediante uno specifico protocollo utilizzato nelle precedenti attività [9-modificato]. Dopo l'attivazione delle singole colture di ARF è iniziata l'attività sperimentale di monitoraggio del biogas prodotto e di misura dell'attività idrolitica.

L'esperimento di monitoraggio del biogas prodotto, è stato condotto in serum bottle da 120 mL (tre repliche), in condizioni di mesofilia (39 °C ± 1), per circa 7 giorni. I batch erano riempiti con 50 mL del terreno di coltura, [9-modificato] e 50 grammi di paglia di grano. Ogni batch era inoculato con 5 mL (10% v/v) delle colture attivate di *Neocallimastix sp.* e *Orpinomyces sp.* e flussati con CO₂ 100% per garantire un ambiente anaerobico. Ogni 24 ore veniva misurata la produzione di biogas ed analizzata la sua composizione percentuale di H₂ (attesa solo per *Neocallimastix sp.*) e CO₂ tramite analisi al gascromatografo.

Trascorsi i sette giorni, quando ormai la produzione di biogas era cessata, per ogni ceppo fungino è stata derivata una subcoltura (in triplicato), inoculando un'aliquota del 10% della coltura madre in nuovi batch preparati come i precedenti. Tale procedimento è stato ripetuto due volte, ottenendo, quindi, tre diverse subcolture per ogni ceppo fungino, chiamate "SUB1, SUB2 e SUB3". Di tutte e tre le subcolture è stato monitorato e caratterizzato nel tempo il biogas prodotto.

L'applicazione dei test enzimatici per lo studio della potenzialità idrolitica è la parte della sperimentazione che ha richiesto il maggior impegno, sia in termini di tempo che di studio della letteratura in merito. La bibliografia a disposizione è limitata, ma soprattutto non vi sono dei protocolli univoci internazionalmente riconosciuti.

Il metodo utilizzato (Miller, 1959) prevede la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti tramite reazione ossidativa col reagente acido 3,5-dinitrosalicilico (DNSA). Ampia eterogeneità riguardo questo metodo è stata riscontrata sul valore del pH di esercizio del saggio enzimatico e quindi del sistema tampone utilizzato per le diluizioni del campione. Alcuni autori [10][11] utilizzano un tampone citrato 50 mM a pH 4,5-4,8, mentre altri [12] utilizzano tampone fosfato 40 mM a pH 6,5-6,8, altri ancora usano un tampone citrato-fosfato 50 mM a pH 6 [13][14].

Il saggio si basa sulla cinetica di produzione di glucosio da parte di un campione liquido di estratto enzimatico in presenza di Carbossimetilcellulosa, CMC, (Sigma C4567-50G) che agisce come substrato dell'enzima. Facendo reagire il glucosio con DNSA, si ottiene un composto colorato che viene misurato spettrofotometricamente a 540nm per cui è possibile stabilire l'attività della Carbossimetilcellulasi (CMCasi) del campione.

2.1.2 Materiali e metodi

Analisi quantitativa e qualitativa del biogas

Il volume del biogas è stato misurato attraverso un water displacement system [15]. La percentuale di H₂ e CO₂ presenti nel biogas prodotto nei batch è stata misurata tramite l'utilizzo di un gascromatografo (GC) Thermo con colonna in acciaio inossidabile con riempimento Hayesep Q 800/100 mesh e rilevatore a conducibilità termica (TCD). Tale colonna consente la rilevazione di H₂ e CO₂ in un'unica corsa. Il gas carrier utilizzato è stato l'azoto ad un flusso di 30-35 mL/min, le temperature di colonna e iniettore sono state rispettivamente di 120 °C e 120 °C.

Inoculi funghi

I due ceppi di funghi anaerobi ruminali (ARF) utilizzati nel presente studio, *Neocallimastix sp.* ed *Orpinomyces sp.* (Tab. 1) sono state fornite da ENEA stoccate in glicerolo a -20 °C. Per la loro riattivazione, necessaria al ripristino dell'attività biologica, sono stati cresciuti su terreno mediante uno specifico protocollo utilizzato nelle precedenti attività [9-modificato]. Tale protocollo prevede, sotto continuo flusso di CO₂, lo scongelamento dei pellets funghi a temperatura ambiente, il prelievo di una quantità pari al 10%v/v ed il suo inoculo in batch contenenti 50 mL di terreno di coltura e 50 mg di paglia di grano utilizzata come substrato per la crescita del micelio fungino. I batch erano preventivamente sterilizzati a secco in autoclave. Le colture venivano mantenute a 39 °C.

Tab.1. Principali caratteristiche morfologiche degli ARF utilizzati in questo studio [16]

Caratteristiche		<i>Orpinomyces sp.</i>	<i>Neocallimastix sp.</i>
tipologia sporangio		Policentrico	Monocentrico
Sporangio	Forma	Irregolare	Sferica
	Dimensione (µm)	45-90	35-120
Spore	Forma	Ovale	Globosa
	Dimensione (µm)	6-15	5-13
	Flagelli	Bi/Multi	Multi
Rizomicelio		Filamentoso	Filamentoso
Idrogenosomi		Assenti	Presenti

Saggi enzimatici

Per la presente ricerca è stata scelta come tecnica d'indagine la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con il DNSA (Tab. 2). Per quanto riguarda il tampone utilizzato per le diluizioni dei campioni sono stati testati due dei sistemi tampone riportati in bibliografia. Sono state prodotte di conseguenza due diverse rette di calibrazione del glucosio, una utilizzando tampone citrato (TC) 50 mM ed un'altra utilizzando tampone fosfato (TP) 40 mM. Il protocollo per entrambe le rette di calibrazione e per le prove sperimentali rimaneva identico, differendo solamente nel tampone utilizzato per le diluizioni.

Lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è il D(+)-glucosio. La retta di taratura è stata costruita preparando delle soluzioni standard di D(+)-glucosio a concentrazioni da 0,25 a 1 g/L in acqua deionizzata, come riportato in Tab.2. A 500 µL di tali soluzioni si aggiungono 500 µL di tampone. I campioni così preparati vengono incubati per 30 minuti a 50 °C. Trascorso questo tempo di incubazione, la reazione era terminata con l'aggiunta di 2 mL di DNSA e i campioni venivano posti in acqua bollente per 5 minuti e subito dopo trasferiti in ghiaccio fino al completo raffreddamento. I campioni venivano poi diluiti a 20 mL con acqua distillata e l'assorbanza letta allo spettrofotometro a 540 nm [17] contro il bianco costituito da 1000 µL di tampone e 2 mL di DNSA.

Per la determinazione dell'attività enzimatica, da ogni coltura di ARF è stata prelevata una aliquota di 5 mL e inocolata in un terreno di coltura (50 mL) contenente CMC 5 g/L come unica fonte di carbonio.

Dopo 7 giorni di incubazione a 39 °C, 1 mL di brodo di coltura è stato centrifugato (10 min a 11500 rpm) ed il surnatante utilizzato come estratto enzimatico per operare il saggio con le modalità sopra descritte: lettura dell'assorbanza contro il "bianco reagente" costituito da 1000 µL di tampone e 2 mL di DNSA.

La quantità di glucosio rilasciata viene determinata plottando sulla retta di taratura l'assorbanza netta (Δ_{ABS}), ovvero il valore di assorbanza del campione incognito (ADS_{campione}) al netto del valore dell'assorbanza del "bianco enzima" ($ADS_{\text{biancoE.}}$) costituito da 1000 µL di estratto enzimatico privo di substrato e 2mL di DNSA, questo al fine di eliminare l'interferenza di zuccheri riducenti presenti nel terreno e non rilasciati dall'azione dell'enzima. ($\Delta_{ABS} = ADS_{\text{campione}} - ADS_{\text{biancoE.}}$),

Una unità di CMCasi riferita come Unità Internazionale (UI) è definita come la quantità di enzima richiesto per rilasciare 0,5 mg di glucosio per minuto. (1 UI = 0,185 µmol*min⁻¹).

Tab.2. Reagente acido 3,5-dinitrosalicilico (DNSA)

Reagenti	In 1 litro
Acido 3,5-Dinitrosalicilico (g)	10
Fenolo (g)	2
Sale di Rochelle (g) (Tartarato di Na-K)	200
NaOH (g)	10
Solfito di sodio (g)	0,5

Retta di taratura del glucosio

L'assorbanza letta per ogni campione è stata plottata in funzione della retta di calibrazione del glucosio ottenuta riportando sulle ascisse la concentrazione assoluta di glucosio come riportato in Tab.3 e sulle ordinate la relativa assorbanza (Fig. 1 e 2).

Tab.3. Diluizioni effettuate per ottenere la retta di taratura del glucosio

Soluzione di glucosio alla concentrazione di 2 mg/mL	Tampone (mL)	Diluizione	Concentrazione assoluta
2 mL	0	0	2 mg mL ⁻¹ (1,0 mg/0,5 mL)
1 mL	0,5	1:1,5	1,33 mg mL ⁻¹ (0,67 mg/0,5 mL)
1 mL	1,0	1:2,0	1 mg mL ⁻¹ (0,5 mg/0,5 mL)
1 mL	3,0	1:4,0	0,5 mg mL ⁻¹ (0,25 mg/0,5 mL)

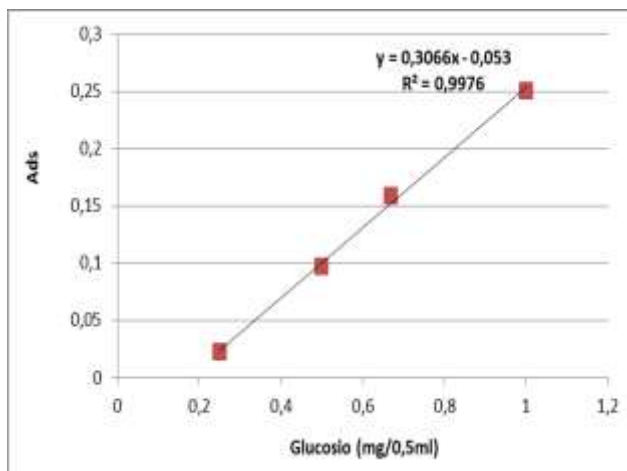


Fig. 1. Retta di calibrazione del glucosio in tampone fosfato 40 mM utilizzata nella determinazione dei saggi enzimatici

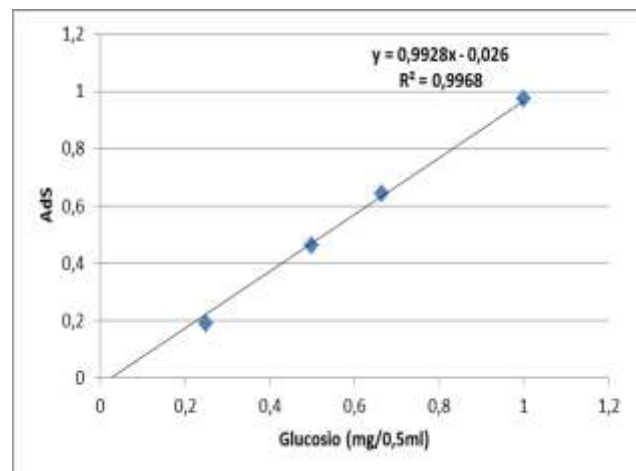


Fig. 2. Retta di calibrazione del glucosio in tampone citrato 50 mM utilizzata nella determinazione dei saggi enzimatici

3 RISULTATI

3.1 Caratterizzazione del processo di produzione di biogas

Le produzioni di biogas per entrambi i ceppi da noi testati, *Neocallimastix* sp ed *Orpinomyces* sp. sono mostrate in Fig. 3. E' possibile osservare in tutte e tre le subcolture di *Neocallimastix* sp. una produzione esponenziale della produzione di biogas che termina dopo circa 24 ore di incubazione. La massima produzione viene raggiunta alle 48 ore, con produzioni di biogas di 129 ± 13 mL, 119 ± 3 mL e 113 ± 3 mL, rispettivamente per SUB1, SUB2 e SUB3.

Anche la concentrazione di H₂ nel biogas per quanto concerne esclusivamente il ceppo *Neocallimastix* sp presenta degli andamenti simili tra le tre subcolture, raggiungendo già alle 24 ore dall'inoculo la massima percentuale (SUB1=18,1±2,07%; SUB2=28,1±5,28%; SUB3=18,0±0,8%).

Risultati ben diversi sono invece stati registrati monitorando nel tempo la produzione di biogas di *Orpinomyces* sp. diversità che si è riscontrata anche all'interno delle diverse subcolture. Se in SUB1 alle 24 ore si è registrata una modesta produzione di biogas ($9 \pm 8,5$ mL) in SUB2 e SUB3 alle 24 ore non si era ancora registrata alcuna produzione. In queste due serie sperimentali, la fase lag si è protratta ben oltre le 48 ore. Tale diversità di comportamento delle tre serie sperimentali si è registrata anche riguardo alle produzioni finali, SUB1= $34,8 \pm 15,3$ mL; SUB2= $60,7 \pm 0,64$ mL e SUB3= $56,8 \pm 8,84$ mL.

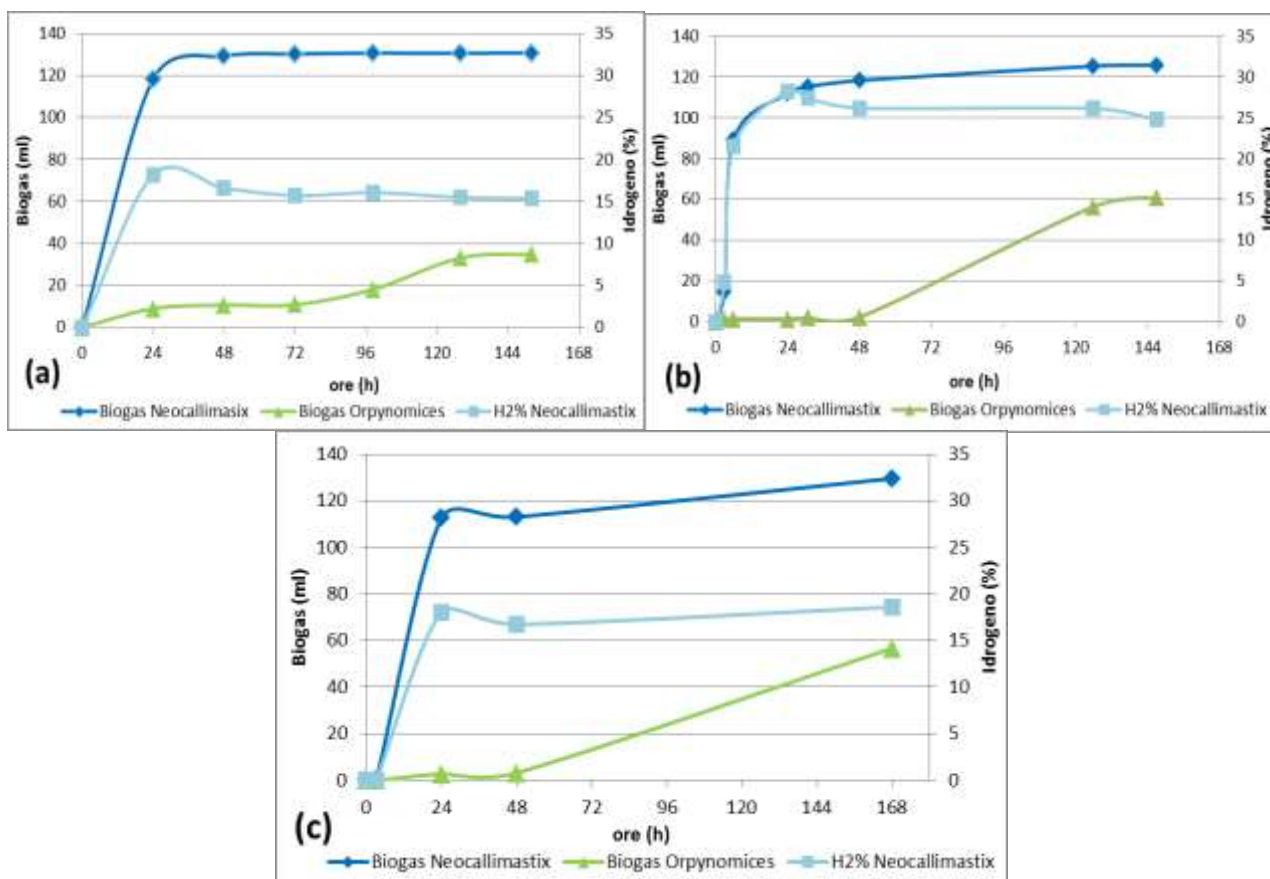


Fig. 3. Produzione cumulativa di biogas e H₂ registrate nelle tre diverse subcolture di *Neocallimastix* sp. ed *Orpinomyces* sp.: (a) Subcultura 1; (b) Subcultura 2; (c) Subcultura 3

3.2 Potenzialità idrolitica dei funghi ruminali

Come descritto nei paragrafi precedenti, l'applicazione dei test enzimatici per lo studio della potenzialità idrolitica è la parte della sperimentazione che ha richiesto il maggior impegno. Numerose prove sperimentali sono state effettuate per standardizzare la tecnica. Gli stessi campioni sono stati testati utilizzando due diversi sistemi tampone: tampone citrato 50 mM (pH 4,5-4) e tampone fosfato 40 mM (pH 6,5-6,8).

In Tab.3 sono riassunti i dati delle assorbanze nette ($\Delta_{ABS} = ADS_{\text{campione}} - ADS_{\text{biancoE}}$), lette allo spettrofotometro e le relative concentrazioni di glucosio rilasciato (mg/0,5 mL) dalla degradazione della CMC, calcolate plottando il valore di Δ_{ABS} in funzione della relativa retta di calibrazione del glucosio.

Tali valori di glucosio sono stati utilizzati per il calcolo dell'attività enzimatica della CMCasi espressa come Unità Internazionale (UI) (Tabelle 4-5).

Per tutti e due i ceppi fungini testati, e per entrambe le tipologie di tamponi utilizzati nel saggio, la produzione di enzimi alla fine dei 7 giorni di incubazione risulta essere estremamente bassa (Tab.6).

Infatti con l'adozione delle stesse condizioni sperimentali (temperatura di 39 °C, tampone fosfato 40 mM, sette giorni di incubazione in CMC) e lo stesso protocollo di rilevazione dell'attività enzimatica (Miller 1959), ComLekcioglu et al.[12] riportano valori di produzione di CMCasi di 46,6 UI per colture fungine di *Neocallimastix sp.* Una così bassa produzione enzimatica giustifica anche l'estrema variabilità riscontrata tra le repliche, come evidenziato dall'elevata deviazione standard.

Tab.4. Risultati saggi enzimatici effettuati su campioni diluiti in TP 40 mM

Campione	Δ_{ADS}	Glucosio rilasciato (mg/0,5 mL)
<i>Orpinomyces</i> tal quale	0,031±0,00503	0,274
<i>Orpinomyces</i> dil 1:2	0,019±0,0128	0,235
<i>Orpinomyces</i> dil 1:4	0,006±0,0099	0,192

Tab.5. Risultati saggi enzimatici effettuati su campioni diluiti in TC 50 mM

Campione	Δ_{ADS}	Glucosio rilasciato (mg/0,5 mL)
<i>Neocallimastix</i> tal quale	0,133±0,00424	0,160
<i>Neocallimastix</i> dil 1:5	0,032±0,0396	0,058
<i>Neocallimastix</i> dil 1:10	0,011±0,00283	0,037
<i>Orpinomyces</i> tal quale	2,024±0,0361	2,00
<i>Orpinomyces</i> dil 1:5	1,193±0,041	1,19
<i>Orpinomyces</i> dil 1:10	0,651±0,0643	0,67

Tab.6. Determinazione dell'attività di CMCasi

	Orpynomices in TP 40 mM	Neocallimastix in TC 50 mM	Orpynomices in TC 50 mM
UI ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	0,0613	0,0810	1,083

3.3 Funghi anaerobi ruminali: scaling-up dell'inoculo

3.3.1 Ottimizzazione del terreno colturale e delle condizioni di anaerobiosi

Per la coltivazione dei funghi anaerobici ruminali (ARF) sono disponibili diverse tipologie di terreni colturali che essenzialmente si differenziano per la presenza o meno di liquido ruminale [18]. In studi preliminari si era verificato come terreni non contenenti liquido ruminale potessero consentire comunque una crescita ottimale degli ARF. Data la difficoltà di reperimento e successiva manipolazione del liquido ruminale, si è deciso di utilizzare questa tipologia di terreni. In tutte le formulazioni dei terreni di crescita utilizzate sia in letteratura sia dal nostro gruppo di ricerca, è presente una forte quantità di carbonato o bicarbonato di sodio. Questo in parte per simulare la presenza di carbonati nel rumine e in parte per questioni di controllo del pH. Per instaurare le condizioni di anaerobiosi, essenziali alla crescita degli ARF, sono necessarie alcune procedure piuttosto lunghe ed economicamente dispendiose. In particolare, occorre flussare i contenitori a lungo con CO₂ sterile al fine di ottenere sia le condizioni anaerobiche sia una riduzione del pH dai valori iniziali di circa 9,0, a quelli fisiologici per gli ARF di circa 6,7. Queste condizioni si verificano al viraggio dell'indicatore redox "resazurina". Il processo dura ben più di un'ora implicando, tra l'altro, una lunga bollitura preliminare (1 ora) e flussaggio con CO₂ fino a completo viraggio.

È risultato evidente, da studi effettuati presso il laboratorio di microbiologia UNITUS, che la quantità di CO₂ necessaria all'instaurarsi dell'anaerobiosi e per il raggiungimento dei valori di pH richiesti, sia decisamente inferiore a quella utile per il completo viraggio, secondo le procedure riportate in bibliografia e finora adottate.

Alcune considerazioni, frutto di indagine teorica e prove preliminari, hanno portato a modificazioni del terreno di coltura che possono avere importanti risvolti in caso di scale-up.

In primo luogo, la grande concentrazione iniziale di "carbonati" (4 g/L Na₂CO₃ o 6 g/L NaHCO₃) crea un sistema tampone che contrasta fortemente l'azione acidificante della CO₂ richiedendo grandi quantitativi di quest'ultima. Si è pensato quindi di ridurre il quantitativo iniziale di questi al fine di instaurare un sistema tampone meno sfavorevole.

Sono state effettuate varie prove in bottiglie sierologiche (serum bottles) utilizzate per le coltivazioni su piccola scala (50 mL di volume di lavoro): si è effettivamente riscontrata una forte diminuzione dei tempi di flussaggio necessari a raggiungere il pH ottimale (condizione che è essenziale allo sviluppo degli ARF). Il viraggio completo del terreno si è ottenuto dopo qualche minuto dalla cessazione del flusso gassoso (Fig. 4).



Fig. 4. Fasi dell'ottenimento delle condizioni di anaerobiosi in serum bottles, tramite flussaggio con CO₂ del terreno modificato riducendo la concentrazione di carbonato di sodio

Questo risultato è particolarmente importante per lo scale-up a bioreattori da laboratorio (ed in seguito, per eventuali applicazioni industriali), dove i volumi maggiori dei terreni di coltura impiegati necessiterebbero, con la procedura comunemente utilizzata, di quantità di CO₂ veramente ingenti.

La composizione del terreno di coltura, modificato (concentrazione finale di Na₂CO₃ di 2,4 g/L) rispetto al precedente protocollo adottato, è riportata in Tab.7.

Tab.7. Terreno di coltura modificato

BM		(in 1 L)
Soluzione di sali I		40 mL
Soluzione di sali II		40 mL
Na ₂ CO ₃ (80 g/L)		30 mL
Glucosio		5 g
Estratto di lievito		2 g
Peptone		5 g
Resazurina (1 g/L)		10 mL
Cisteina-HCl		1,2 g
Soluzione di acidi grassi		1 mL
Soluzione sali I (% P/V)	Soluzione sali II (% P/V)	Soluzione acidi grassi (% V/V)
K ₂ HPO ₄ 0,6	NaCl 1,2	Acetico 60
	KH ₂ PO ₄ 0,6	Butirrico 13,3
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,6	Propionico 26,7
	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,245	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,159	

3.3.2 Scaling-up del processo di crescita di *Orpinomyces* sp.

Lo stadio successivo dei lavori è stato eseguito in bioreattore CSTR (Continuous Stirred-Tank Reactor) da 3 litri (volume totale) riempito con 1 litro di terreno di coltura modificato come descritto sopra.

Il bioreattore utilizzato è un fermentatore da banco della Applikon Dependable Instruments, accessorio con un agitatore dotato di elica marina, per minimizzare gli stress meccanici alla coltura. Il bioreattore è dotato di sensori di temperatura, pH e ossigeno disciolto (non utilizzato in questo esperimento) e comandato da un sistema analogico/digitale ADI 1010, accessorio con consolle ADI 1025 per il controllo dei parametri chimico-fisici della fermentazione (flussimetri, controllori di massa dei gas e pompe peristaltiche). Durante la sperimentazione sono stati monitorati il pH (tramite aggiunta automatica di Na₂CO₃ e manuale di CO₂), la temperatura (tramite mantello riscaldante e serpentina di raffreddamento) e l'agitazione. Quest'ultimo parametro veniva utilizzato a regimi relativamente elevati (200 rpm) durante le fasi di insufflazione dei gas, prima dell'aggiunta dell'inoculo, per ottenere le condizioni di anaerobiosi e al fine di aumentare lo scambio gassoso. Durante lo sviluppo della biomassa fungina l'agitazione era mantenuta a regimi molto bassi (50 rpm), al fine di consentire fenomeni di trasferimento (nutrienti, ecc.), ma senza causare stress meccanici.

Il primo esperimento in bioreattore ha riguardato la ripetizione delle condizioni testate precedentemente nelle serum bottles, senza inoculo di microrganismi. Anche in bioreattore la riduzione dei tempi di flussaggio si è mostrata consistente. In questo caso, però, dati i maggiori volumi di lavoro, i tempi di flussaggio erano leggermente superiori a quelli registrati nell'esperimento nelle serum bottles. Il monitoraggio in continuo del pH ha consentito un maggiore controllo del processo. Anche in questo caso, al raggiungimento del pH ottimale si è interrotto il flussaggio con CO₂ e dopo qualche minuto si è potuto apprezzare il completo viraggio del terreno (Fig. 5).



Fig. 5. Fasi dell'ottenimento delle condizioni di anaerobiosi in bioreattore, tramite flussaggio con CO₂, del terreno modificato (con Na₂CO₃ 2,4 g/L)

In vista di un'applicazione industriale, per ottenere lo stato di anaerobiosi, è stato effettuato un secondo esperimento inserendo un'iniziale fase di degasaggio con azoto, che ha permesso di ridurre a soli 2-3 minuti il successivo flussaggio con CO₂.

Questa prima fase di ottimizzazione si è resa necessaria al fine di consentire la configurazione di un processo che abbattesse drasticamente i costi relativi al flussaggio con CO₂. Si è quindi proceduto alla coltivazione in bioreattore del fungo ruminale *Orpinomyces* sp. Sono state allestite tre prove dove la crescita fungina è stata monitorata mediante conte al microscopio delle zoospore poliflagellate e determinazioni del peso secco.

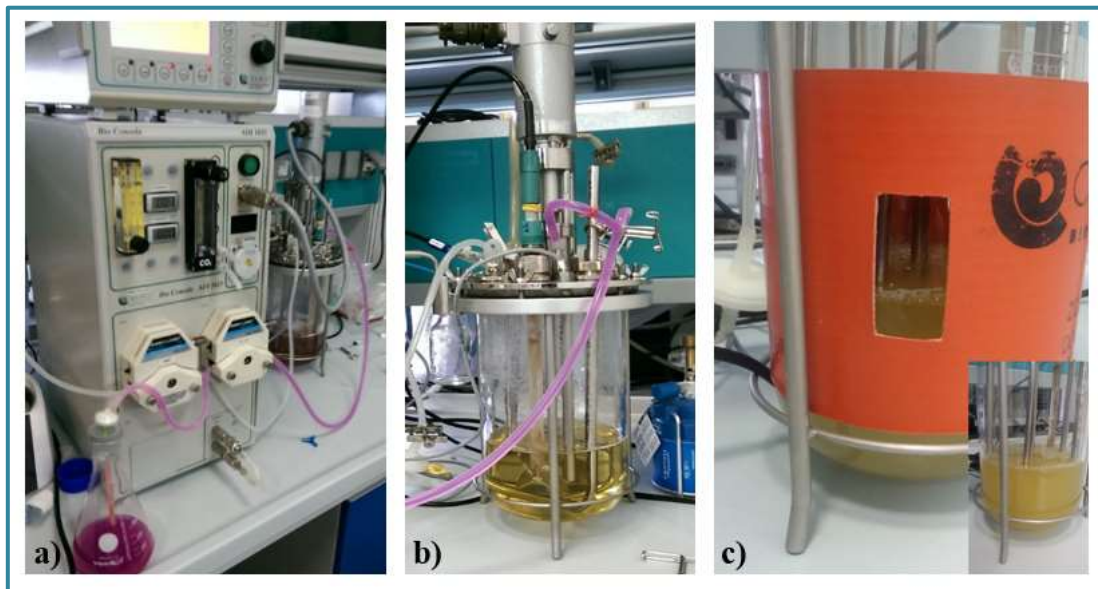


Fig. 6. Fasi della coltivazione di ARF in bioreattore: a) sistema prima dell'instaurarsi delle condizioni di anaerobiosi e pH ottimale; b) sistema a pH ottimale e in anaerobiosi; c) sviluppo di biomassa dopo 24 ore di incubazione

Il bioreattore riempito con 900 mL di terreno è stato sterilizzato in autoclave (concentrazione dei nutrienti per 1 litro di brodo di coltura) e inoculato con 100 mL (inoculo 10% del totale) di pre-inoculo (coltura di *Orpinomyces* sp. in serum bottles). In Fig. 6 si mostrano le varie fasi del processo fermentativo in bioreattore

a partire dalle procedure per l'ottenimento delle condizioni di anaerobiosi tramite insufflazione, in successione, di N₂ e CO₂ sterili.

Il processo di crescita microbica è stato monitorato ogni 24 ore, per un totale di 6 giorni, tramite conte al microscopio delle zoospore poliflagellate e determinazioni del peso secco (Figure 7, 8 e 9). Per le analisi dei pesi secchi e la conta delle zoospore poliflagellate, sono state prelevate aliquote (20 mL) dal fermentatore a diversi tempi (0, 24, 48, 72, 130 e 140 ore) dall'inoculo con la biomassa fungina.

Per l'analisi dei pesi secchi 15 mL delle aliquote prelevate sono stati filtrati su filtri di nitrato di cellulosa 0,45 µm (mantenuti anidri in essiccatore, e pesati), utilizzando una beuta da vuoto. I filtri con la biomassa sono poi stati posti in stufa (70 °C overnight). Il calcolo del peso secco è stato effettuato applicando la seguente equazione:

$$\text{Peso secco (g/L)} = \frac{\text{massa tot (filtro + biomassa)} - \text{massa del filtro}}{\text{mL di campione}}$$

Per tutti i campioni si è proceduto alla conta delle zoospore poliflagellate con la camera di Thoma (Fig. 7).

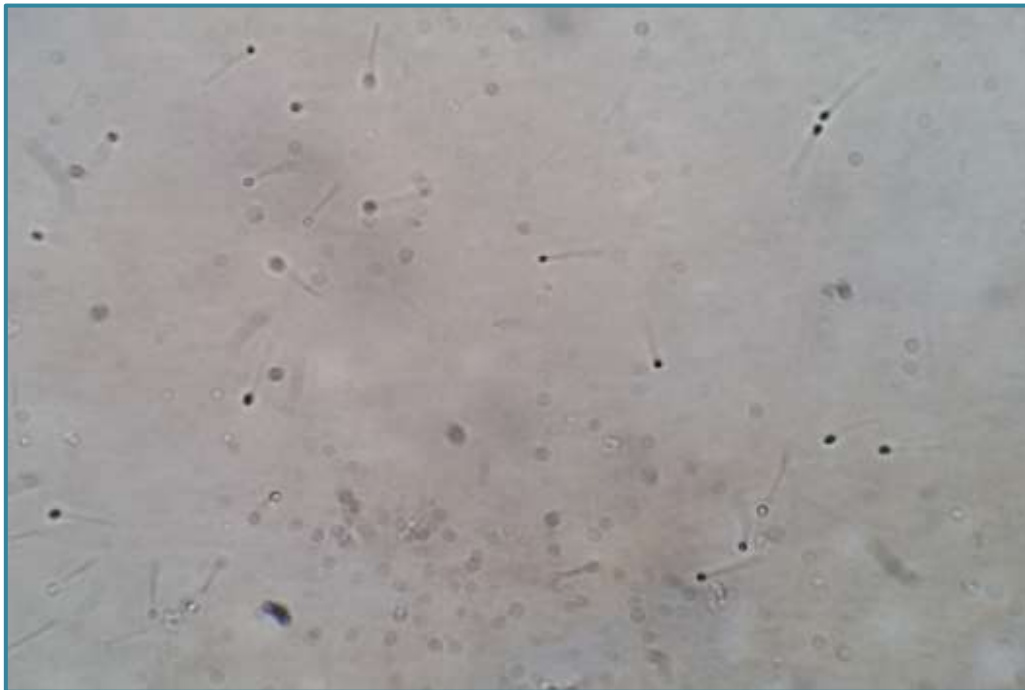


Fig. 7. Micrografia (1000 x) di zoospore poliflagellate di *Orpinomyces* sp.

La crescita fungina è risultata molto buona e sembra rispondere bene alle nuove condizioni colturali in bioreattore. Questo risultato non era scontato, in quanto alcuni microrganismi non riescono a svilupparsi sufficientemente in questi sistemi. L'ottenimento di quantità significative di biomassa in bioreattore è condizione basilare per lo scale-up a livello industriale.

La cinetica di crescita presentava un andamento alquanto peculiare. Dopo 24 ore di incubazione, si è ottenuto il massimo di biomassa fungina (peso secco), la quale andava subito decrescendo a partire dalle 24 ore successive (Fig. 8). La concentrazione di zoospore mostrava analoga tendenza, con un picco a 24 ore ed una drastica riduzione alle 48 ore (Fig. 9). È comunque noto come il solo monitoraggio di queste forme riproduttive non sia particolarmente significativo [18] [19]. Veniva rilevata anche presenza di alcuni sporangi.

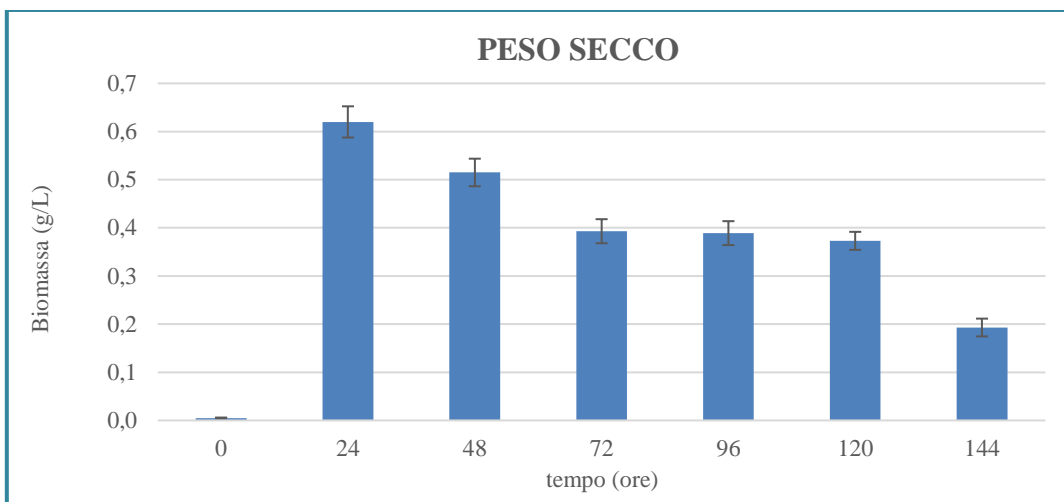


Fig. 8. Andamento nel tempo del peso secco della biomassa fungina durante la crescita del *Orpinomyces* sp. in bioreattore STR da 3 litri. I dati sono ottenuti dalla media dei valori ottenuti nei tre esperimenti; sono riportate le relative barre di errore

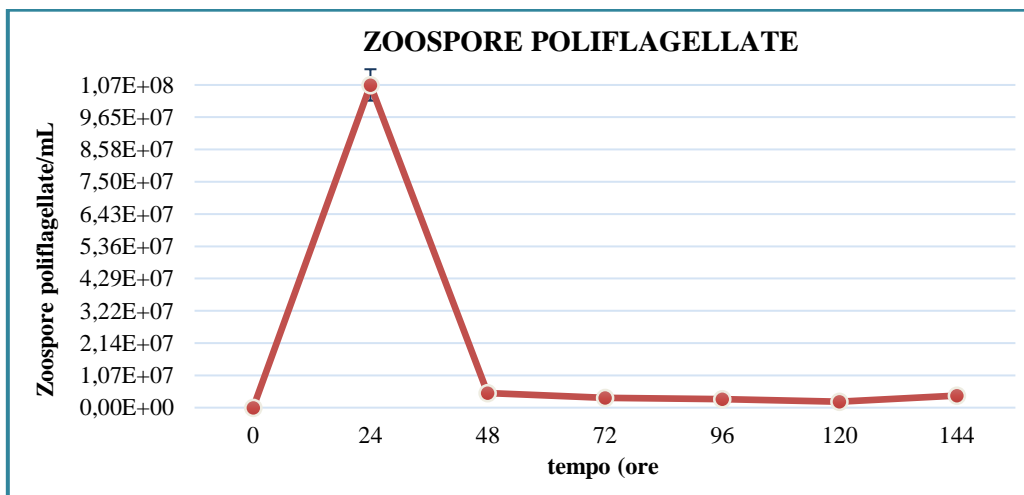


Fig. 9. Andamento nel tempo della concentrazione di zoospore poliflagellate durante la crescita del fungo ruminale *Orpinomyces* sp. in bioreattore STR da 3 litri. I dati sono ottenuti dalla media dei valori ottenuti nei tre esperimenti; sono riportate le relative barre di errore

Non è stato possibile effettuare un confronto con i dati di altri autori in quanto in bibliografia non sono presenti lavori riguardanti la crescita in bioreattore di funghi ruminali appartenenti al genere *Orpinomyces*. Infatti, va ricordato che, data la difficoltà di coltivazione e mantenimento, ad oggi gli ARF vengono correntemente coltivati in piccola scala, in tubi o bottiglie sierologiche, con volumi di lavoro che vanno da circa 7 a 100 mL ed è necessario effettuare frequentemente subculture per mantenerli [18][19][20]. Scarsi sono i lavori pubblicati sui funghi anaerobi ruminali con l'utilizzo di volumi di lavoro più elevati [20] [21]. In questi studi, gli autori avevano allestito prove in fermentatore per indagare la produzione da parte di alcuni ceppi di *Piromyces* sp. e *Neocallimastix patriciarum* di enzimi cellulolitici e/o xilanolitici. Anche in questo caso non è stato possibile confrontare i dati ottenuti nel nostro lavoro con quelli riportati in questi studi, trattandosi di ARF appartenenti a generi diversi da quello di nostro interesse, ma soprattutto essendo diverse le condizioni colturali ed il target della ricerca effettuata.

4 Conclusioni

L'attività fungina ha mostrato una rapida crescita esponenziale entro le 24 ore dall'inoculo sia in piccoli volumi di lavoro (serum bottle da 50 mL) che in quelli utilizzati per lo scale-up (reattore da banco da 1 litro). Tutti i parametri monitorati, come la produzione di biogas, la biomassa batterica e la concentrazione di zoospore hanno avuto degli andamenti simili, ovvero dopo 24 ore di incubazione si sono ottenuti i valori più elevati di produzione di biogas, di biomassa (peso secco), e di concentrazione di zoospore. A partire dalle 24 ore successive invece si è registrata una rapida riduzione sia della biomassa fungina che della concentrazione delle zoospore.

L'attività enzimatica studiata invece è risultata essere sempre molto bassa, nonostante la dimostrata azione di "bioaugmentation" di questi funghi nella produzione di metano da paglia di grano e chitina (Report RdS/PAR2014/143; Report RdS/PAR2014/145). D'altra parte la messa a punto di tali saggi enzimatici si è confrontata con una bibliografia a disposizione limitata, ma soprattutto con l'assenza di protocolli univoci internazionalmente riconosciuti. Indubbiamente questo aspetto della ricerca merita un maggiore attenzione ed approfondimento in quanto come detto prima aumentare l'efficienza di idrolisi della biomassa lignocellulosica significa migliorare l'efficienza dell'intero processo. Efficienza vista non solo come maggiore produzione di biogas e di concentrazione del metano nella miscela, ma anche come un miglior utilizzo della biomassa in entrata. E' importante sottolineare che il potenziale metanigeno residuo del digestato è un indice dell'efficienza della digestione anaerobica: a parità di biomasse in ingresso nel digestore, maggiori valori di questo parametro sono sintomo di gravi inefficienze del processo che si riflettono sulla redditività economica e sulla performance ambientale dell'impianto.

Ai fini del miglioramento dell'idrolisi dei materiali lignocellulosici è estremamente importante conoscere l'azione dei microrganismi responsabili di questo processo, e come detto in precedenza, in questo contesto gli ARF svolgono un ruolo fondamentale.

Interessanti risultati invece sono stati raggiunti nell'ottica di uno scaling-up di processo a livello industriale. L'ottimizzazione del terreno di coltura con la forte riduzione dei tempi di flussaggio con CO₂ indispensabili per il mantenimento di un ambiente anaerobico, è particolarmente importante per lo scale-up di bioreattori industriali, dove i volumi maggiori dei terreni di coltura impiegati necessiterebbero, con la procedura comunemente utilizzata, di quantità di CO₂ estremamente elevati ed economicamente non sostenibili.

Altro risultato importante, sempre in un'ottica di una possibile applicazione industriale, è la capacità della comunità fungina di crescere e svilupparsi in nuove condizioni colturali ed in volumi venti volte maggiori a quelli comunemente utilizzati nei lavori sperimentali presenti in letteratura. Questo risultato non era scontato, in quanto alcuni microrganismi non riescono a svilupparsi sufficientemente in questi sistemi. Proprio a causa della difficoltà di coltivazione e mantenimento, ad oggi gli ARF vengono correntemente coltivati in piccola scala, in tubi o bottiglie sierologiche, con volumi di lavoro che vanno da circa 7 a 100 mL ed è necessario effettuare frequentemente subculture per mantenerli, ma l'ottenimento di quantità significative di biomassa in bioreattore è una condizione basilare per lo scale-up a livello industriale.

5 Riferimenti bibliografici

1. Wood T.M., Wilson C.A., 1995. Studies on the capacity of the cellulose of the anaerobic rumen fungus *Piromonas communis* P to degrade hydrogen bond-ordered cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:572-578.
2. Youssef N.H., Couger M.B., Struchtemeyer C.G., Liggenstoffer A.S., Prade R.A., Najar F.Z., Atiyeh H.K., Wilkins M.R., Elshahed M.S. 2013. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl Environ Microbiol* 79(15):4620–4634.
3. Dollhofer V., Podmirseg S.M., Callaghan T.M., Griffith G.W., Fliegerová K. 2015. Anaerobic Fungi and Their Potential for Biogas Production. In *Biogas. Science and Technology* 151:41-61.
4. Fontes CM, Gilbert HJ 2010. Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry* Vol. 79: 655-681.
5. Haitjema CH., Solomon KV., Henske JK., Theodorou MK., O'Malley MA. 2014. Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8):1471-1482.
6. Yarlett N., Orpin CG., Munn EA., Yarlett NG. Greenwood CA. 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem. J.* 236(3):729-739
7. Griffith G.W., Baker S., Filegerova K., Liggenstoffer A., Giezen M., Voigt K., Beakes G., 2010. Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *Ima Fungus*, vol.1-N°2:181-185.
8. Krause D.O., Nagaraja T.G., Wright A.D.G., Callaway T.R., 2013. Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.*, 91:331-341.
9. Miller T.L., Wolin M.J. 1973 Formation of hydrogen and formate by *Ruminococcus albus*. *Journal of Bacteriology* 116(2): 836-846.
10. Ghose, T.K. 1987 Measurement of cellulase activities *Pure and Applied Chemistry* 59(2): 257-268
11. Acharya B.K., Mohana S., Jog, R., Divecha J., Madamwar D. 2010 Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management* 91(10): 2019-2027.
12. ComLekcioglu U., Akyol I., Ozkose E., Kar B., Ekinci M.S. 2008 Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7 *Annals of Microbiology*, 58(1): 115-119.
13. Borneman W.S., Akin D.E., Ljungdahl L.G. 1989 Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 55(5): 1066-1073.
14. Lowe S.E., Theodorou M.K., Trinci A.P.J. 1987 Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan *Applied and Environmental Microbiology* 53(6): 1216-1223.
15. Kalia V.C., Jain S.R., Kumar A., Joshi, A.P. 1994 Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis* *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10(2): 224-227.
16. Leis S, Dresch P, Peitner U, Fliegerova K, Sandbichler AM, Insam H, Podmirseg SM, 2014. Finding a robust strain for biomethanation: Anaerobic fungi (Neocallimastigomycota) from the Alpine ibex (*Capra ibex*) and their associated methanogens. *Anaerobe*, 29: 34-43.

17. Miller G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* ,31:426-428.
18. Theodorou M.K., Brookman J., Trinci A.P. 2005 Anaerobic fungi. *Methods in gut microbial ecology for ruminants*: 55-66.
19. Fliegerova K., Kaerger K., Kirk P., Voigt K. 2015 Rumen fungi. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*: 97-112. Springer, India.
20. Gruninger R.J., Puniya A.K., Callaghan T.M., Edwards J.E., Youssef N., Dagar S.S., Fliegerova K., Elshahed, M.S., 2014. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): Advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*,90(1): 1-17.
21. Dijkerman R., Den Camp H.O., Van der Drift C.1996 Cultivation of anaerobic fungi in a 10-l fermenter system for the production of (hemi-) cellulolytic enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(1): 85-91.

6 Abbreviazioni ed acronimi

FORSU – Frazione Organica Rifiuti Solidi Urbani
ARF – Funghi Anaerobici Ruminanti
CSTR – Continuous Stirred-Tank Reactor
CMC – Carbossimetilcellulosa
CMCasi – Carbossimetilcellulasi
GC – Gascromatografo
TCD – Rilevatore a Conducibilità Termica
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
DNSA – Reagente Acido 3,5-dinitrosalicilico
TC – Tampone Citrato
TP – Tampone Fosfato
UI – Unità Internazionale