



Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia  
e lo sviluppo economico sostenibile



*Ministero dello Sviluppo Economico*

## RICERCA DI SISTEMA ELETTRICO

# Idrolisi di materiale lignocellulosico per l'ottenimento di substrati idonei alla produzione di idrogeno

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



IDROLISI DI MATERIALE LIGNOCELLULOSICO PER L'OTTENIMENTO DI SUBSTRATI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI IDROGENO

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

Settembre 2012

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Studi sulla produzione elettrica locale da biomasse e scarti

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

## Indice

|                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Sommario</b> .....                                                                                         | <b>4</b>  |
| <b>Introduzione</b> .....                                                                                     | <b>5</b>  |
| <b>Descrizione delle attività svolte e risultati</b> .....                                                    | <b>6</b>  |
| <i>Cronologia sintetica delle attività svolte</i> .....                                                       | 6         |
| <i>Metodi analitici</i> .....                                                                                 | 6         |
| <i>Scelta della biomassa lignocellulosica</i> .....                                                           | 7         |
| <i>Selezione di funghi lignino-cellulolitici (screening) per il pretrattamento biologico (idrolisi)</i> ..... | 7         |
| <i>Prove di crescita su piastra</i> .....                                                                     | 7         |
| <i>Fermentazioni in colture agitate sommerse</i> .....                                                        | 9         |
| <b>Conclusioni</b> .....                                                                                      | <b>25</b> |
| <b>Riferimenti bibliografici</b> .....                                                                        | <b>26</b> |
| <b>Abbreviazioni ed acronimi</b> .....                                                                        | <b>26</b> |
| <b>Appendice</b> .....                                                                                        | <b>27</b> |

## Sommario

I funghi “white-rot” (WR), appartenenti generalmente al gruppo dei Basidiomiceti, in natura colonizzano il legno e decomponendo la lignina, per mezzo di vari enzimi, causano il marciume bianco o carie bianca del legno. Per questa loro caratteristica, in questo progetto si è scelto di impiegare alcuni di questi organismi per il pretrattamento di biomasse lignocellulosiche (LC) al fine di ottenere substrati utilizzabili da batteri per la produzione di idrogeno.

Nella fase preliminare del progetto, al fine di individuare l'essenza legnosa più congrua, è stata scelta la segatura di abete (*Abies alba*) sulla base delle seguenti considerazioni:

- Disponibilità locale costante del materiale;
- Diffusione in campo nazionale/internazionale.

Per il pretrattamento biologico (idrolisi della biomassa legnosa), al fine di individuare il ceppo più performante, sono stati utilizzati i seguenti ceppi fungini WR conservati presso la collezione di funghi di interesse industriale dell' Università della Tuscia (screening):

- *Pleurotus ostreatus*;
- *Pleurotus pulmonarius*;
- *Trametes trogii*;
- *Trametes versicolor*;
- *Phanerochaete chrysosporium*;
- *Panus tigrinus*.

I terreni di coltura sono stati scelti sulla base di prove preliminari di crescita in piastra.

Il prodotto delle fermentazioni è stato direttamente utilizzato come substrato per la produzione di biogas nei laboratori dell'ENEA. In seguito alle prime prove di fermentazione in colture sommerse sono stati selezionati i ceppi più idonei tra quelli sottoposti a screening. La quantità di biogas prodotto a partire dal materiale idrolizzato dai vari funghi è stato il criterio di selezione. In aggiunta, è stata allestita una prova per saggiare l'attività chitinolitica del fungo *Lecanicillium muscarium*.

Durante il processo di idrolisi, il metabolismo dei funghi causa un aumento di biomassa fungina e una riduzione di quella LC, nonché una variazione nella composizione del terreno liquido. Pur non essendo possibile separare il fungo dalla segatura, una riduzione del peso secco del pellet è comunque imputabile ad idrolisi. È emblematico il caso di *P. pulmonarius* in MEL (terreno contenente estratto di malto e segatura), per il quale si passa da un peso secco iniziale di biomassa LC pari a 12,5 g/l ad un peso secco del pellet pari a 6,9 g/l alla fine del processo. Questa riduzione di circa il 50% è il risultato di un evidente processo di idrolisi, dal momento che nel peso secco del pellet è compreso il peso del micelio. Misurando il decremento del peso secco totale (pellet e surnatante) si ha un'idea generale di ciò che il fungo ha consumato respirando, che è stato eliminato sotto forma di CO<sub>2</sub>.

L'aumento del peso secco del surnatante, causato da rilascio di sostanze solubili nel terreno (proteine, zuccheri, ecc...), può essere considerato come un indice di idrolisi. Surnatanti ricchi potrebbero rivelarsi buoni substrati per la produzione di idrogeno. Per i WR, l'aumento del peso secco del surnatante è dovuto principalmente alle proteine, mentre per *L. muscarium* è dovuto sia alle proteine, sia agli zuccheri, che aumentano notevolmente soprattutto nel corso della prima settimana.

## Introduzione

Obiettivo di questo studio è l'individuazione di un processo biologico, semplice ed economico, alternativo alle tecnologie già esistenti, quali, ad esempio, la "steam explosion". Oggetto di studio è stato il pre-trattamento biologico, in diverse condizioni, del materiale di scarto dell'industria del legno (trucioli e/o segatura), che mira all'ottenimento di un substrato idoneo per la successiva fermentazione batterica in condizioni di anaerobiosi per la produzione di biogas. Tra i materiali utilizzati ai fini delle produzioni bioenergetiche (principalmente biogas, idrogeno e metano) infatti vi sono le biomasse LC, che rappresentano la componente più abbondante dell'intera biomassa terrestre, costituendone circa il 50% [1] e vengono prodotte ogni anno in notevoli quantità (10-50 miliardi di tonnellate) [2].

Nell'ambiente, la degradazione del materiale lignocellulosico è realizzata principalmente da funghi, generalmente appartenenti al gruppo dei basidiomiceti, denominati "white rot", che utilizzano la lignina come fonte di carbonio ed energia. Noti come agenti della carie bianca, questi organismi sono responsabili di patologie del legno e di specie arboree; colonizzano il legno e preferenzialmente decompongono la lignina, caratterizzata da una notevole eterogeneità e complessità strutturale, grazie alla produzione di enzimi extracellulari a bassa specificità di substrato (Laccasi, Mn-perossidasi, lignina-perossidasi, ecc.).

L'attacco fungino è quindi una fase indispensabile della degradazione del materiale lignocellulosico negli ambienti naturali e, predominante sul materiale grossolano, contribuisce alla produzione di materia organica fine generalmente colonizzata dalla componente batterica.

A livello tecnologico l'idrolisi delle biomasse LC può essere effettuata con varie tecnologie chimico fisiche compreso l'idrolisi enzimatica. Quest'ultima prevede un pre-trattamento poiché l'insolubilità in acqua [3], le forti interazioni interne al nucleo cristallino di cellulosa [4] e la complessità della struttura tridimensionale dovuta al rivestimento da parte delle strutture amorfe di cellulosa ed emicellulose [5] ostacolano l'accesso degli enzimi idrolitici alle catene di cellulosa [6]. Con l'idrolisi della cellulosa si ottengono poi gli zuccheri semplici fermentabili che possono essere usati in vari processi fermentativi aerobi e anaerobi.

A seguito di queste considerazioni, si è ipotizzato di sfruttare l'azione ligninolitica dei funghi WR per ottenere substrati fermentescibili a partire da biomasse LC al fine di utilizzarli per successive fermentazioni per la produzione di idrogeno.

A tale scopo è stata approntata una serie di esperimenti intesi ad identificare il ceppo di funghi WR più performante e le condizioni di crescita più idonee all'idrolisi di materiale LC.

Il criterio di selezione è stato quello della maggiore produzione di idrogeno ottenuta da esperimenti successivi effettuati presso i laboratori ENEA diretti dal Dr. Giulio Izzo.

## Descrizione delle attività svolte e risultati

### *Cronologia sintetica delle attività svolte*

- Scelta della biomassa LC (novembre 2011)
- Scelta dei microrganismi idrolitici WR (novembre 2011)
- Prima prova di crescita dei funghi WR su piastra (14-11-2011)
- Seconda prova di crescita dei funghi WR su piastra (25-11-2011)
- Terza prova di crescita dei funghi WR su piastra (14-12-2011)
- Prima prova di idrolisi di materiale LC in colture agitate sommerse (16-01-2012)
- Seconda prova di idrolisi di materiale LC in colture agitate sommerse (13-02-2012)
- Terza prova di idrolisi di materiale LC in colture agitate sommerse (08-03-2012)
- Quarta prova di idrolisi di materiale LC in colture agitate sommerse (18-07-2012)

### *Metodi analitici*

Per quanto riguarda le prove di idrolisi in colture agitate sommerse, al termine delle sperimentazioni si è proceduto alla determinazione delle proteine totali, degli zuccheri riducenti e del peso secco.

#### **Determinazione delle proteine totali**

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

Un'aliquota dei prodotti di fermentazione è stata centrifugata (15 min a 6000 rpm) e il surnatante è stato impiegato nel saggio. A 800 µl di campione opportunamente diluito sono stati aggiunti 200 µl di reattivo di Coomassie; dopo avere agitato si è lasciato incubare per 15 minuti ed è stato letto l'assorbimento a 595 nm contro bianco (800 µl di terreno colturale e 200 µl di acqua deionizzata).

Per la costruzione della retta di taratura è stata preparata una soluzione a concentrazione 100 µg/ml di albumina da siero bovino (BSA) e si è eseguita una serie di diluizioni scalari operando nel range 0-10 µg/ml.

#### **Determinazione degli zuccheri riducenti**

Il metodo dell'ADNS consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5-dinitrosalicilico utilizzando il reattivo ADNS (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).

Lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è il D (+)-glucosio. La retta di taratura utilizzata per monitorare gli zuccheri si costruisce preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio a concentrazioni da 0,1 a 1 mg/ml in acqua deionizzata. A 500 µl di tali soluzioni si aggiunge 1 ml di reattivo ADNS. 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 ADNS.

Per la determinazione degli zuccheri riducenti in soluzione nei campioni, un'aliquota del surnatante 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 ADNS, non sottoposto a reazione di riscaldamento e raffreddamento.

## Determinazione del peso secco

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

### Scelta della biomassa lignocellulosica

Nella fase preliminare del processo è stata scelta la segatura di abete (*Abies alba*) sulla base delle seguenti considerazioni:

- Disponibilità locale costante del materiale;
- Diffusione in campo nazionale ed internazionale dell'essenza legnosa studiata.

### Selezione di funghi lignino-cellulolitici (screening) per il pretrattamento biologico (idrolisi)

Oggetto dello screening sono stati alcuni ceppi di funghi WR già noti in letteratura per la loro notevole attività ligninolitica [7-10]. Si sono testati i seguenti ceppi: *Trametes versicolor*, *T. trogii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* e *Panus tigrinus*, conservati nelle collezioni di funghi di interesse industriale dell'Università della Tuscia. Per questi organismi, già studiati in attività precedenti del gruppo, non era stata verificata in precedenza l'attività sul substrato selezionato per questo progetto.

Inoltre è stata allestita una prova utilizzando quattro isolati fungini precedentemente isolati da un substrato lignocellulosico e non ancora identificati a livello molecolare.

In seguito alle prime prove di fermentazione in coltura sommersa, per l'ultima prova si è deciso di utilizzare soltanto alcuni dei ceppi sottoposti a screening. Il criterio di selezione è stato la quantità di biogas prodotto a partire dal materiale idrolizzato.

### Prove di crescita su piastra

Per l'ottimizzazione delle condizioni di crescita degli organismi sono state effettuate delle prove di crescita su piastra. Una prima prova (14-11-2011) è stata effettuata utilizzando Malt Extract Agar (20g/l) e 1 g di segatura precedentemente sterilizzata in autoclave a 121° C per 20 minuti (Fig.1).

Una seconda prova (25-11-2011) è stata effettuata utilizzando esclusivamente agar (15g/l) e 1 g di segatura sterile (Fig.2) come unica fonte di carbonio ed energia.

La terza prova (14-12-2011) è stata effettuata con M9 contenente: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodecaidrato (25,06 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30 g/l), NaCl (5g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25,1 g/l), CaCl<sub>2</sub> (14,7 g/l), MgSO<sub>4</sub> (24,07 g/l), agar (15g/l) e 1 g di segatura sterile (Fig.3) come unica fonte di carbonio ed energia.

Le piastre sono state incubate a 28°C.

Dopo questa serie di sperimentazioni è emerso che, come atteso, la maggior crescita si è realizzata sulle piastre contenenti estratto di malto.

Per quanto riguarda i ceppi fungini, è risultato evidente che, su piastre contenenti estratto di malto, la maggior crescita è stata ottenuta con *T. versicolor* e *P. tigrinus*.

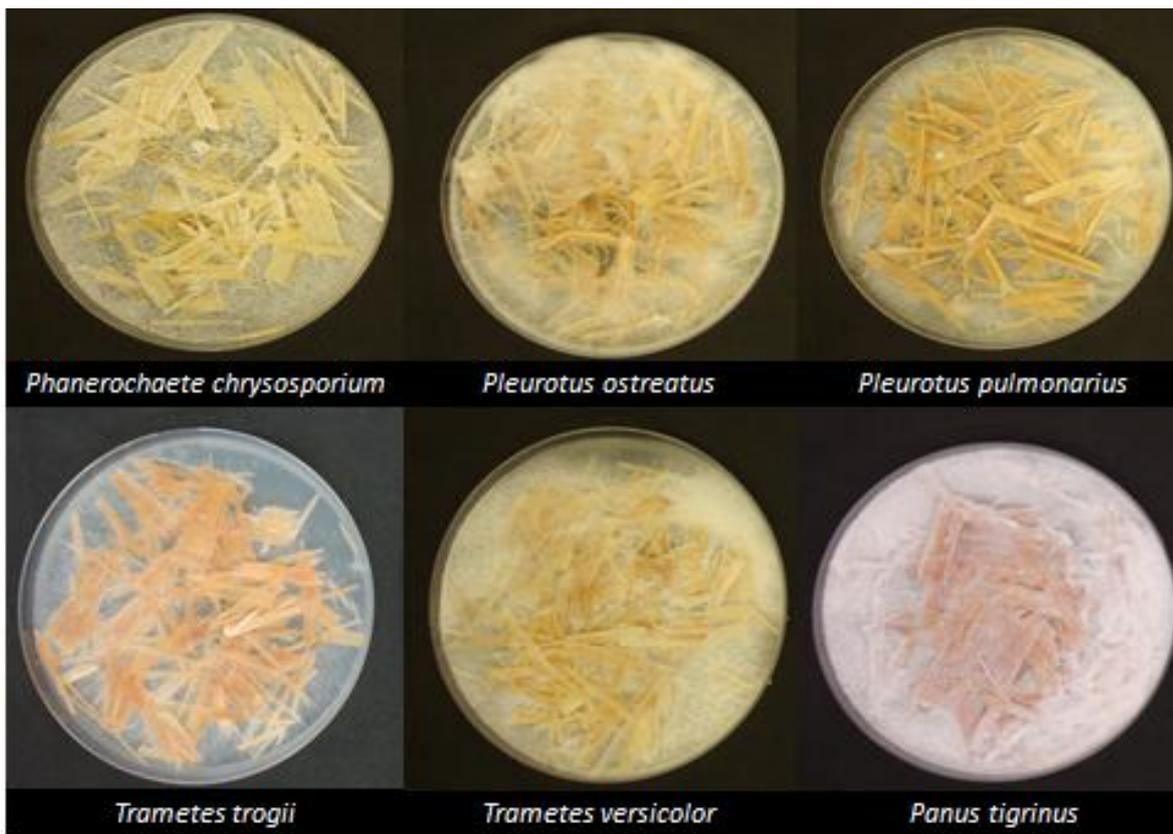


Fig.1 Prova in piastra con Malt Extract Agar (20 g/l) e 1 g di segatura di abete.

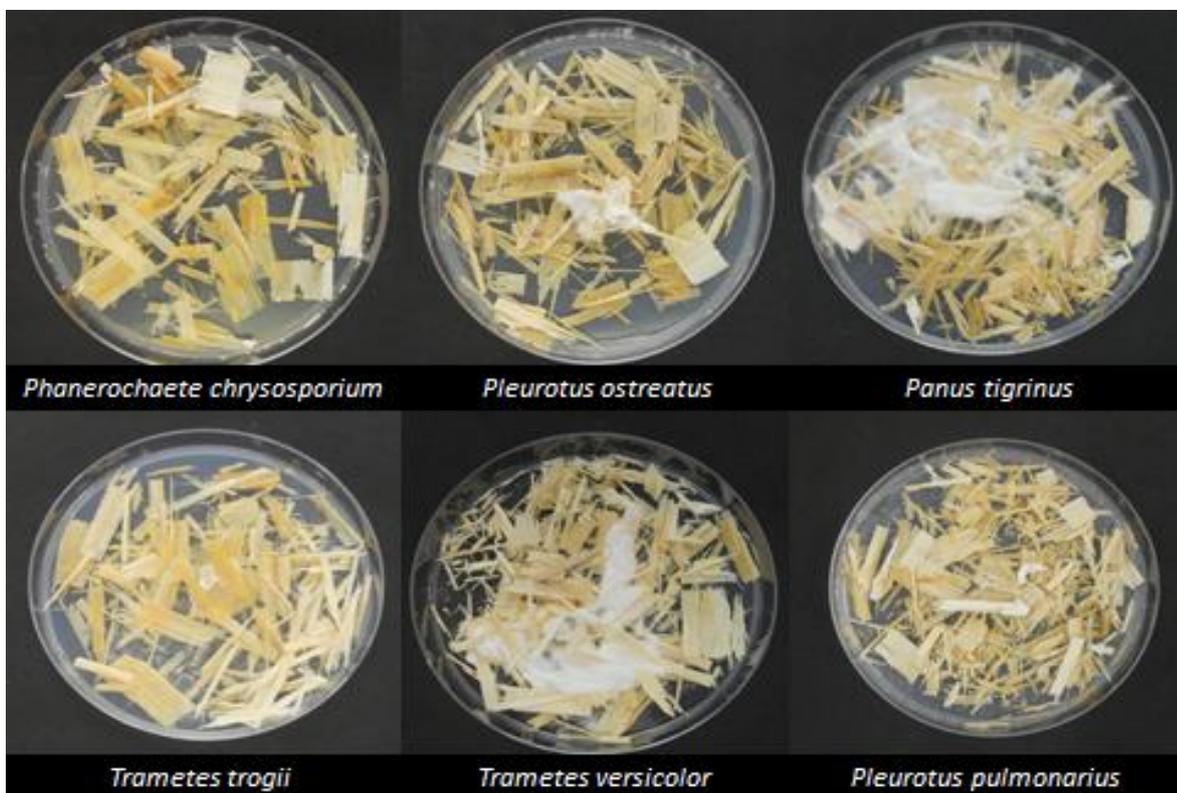


Fig.2 Prova in piastra con agar (15 g/l) e 1 g di segatura.

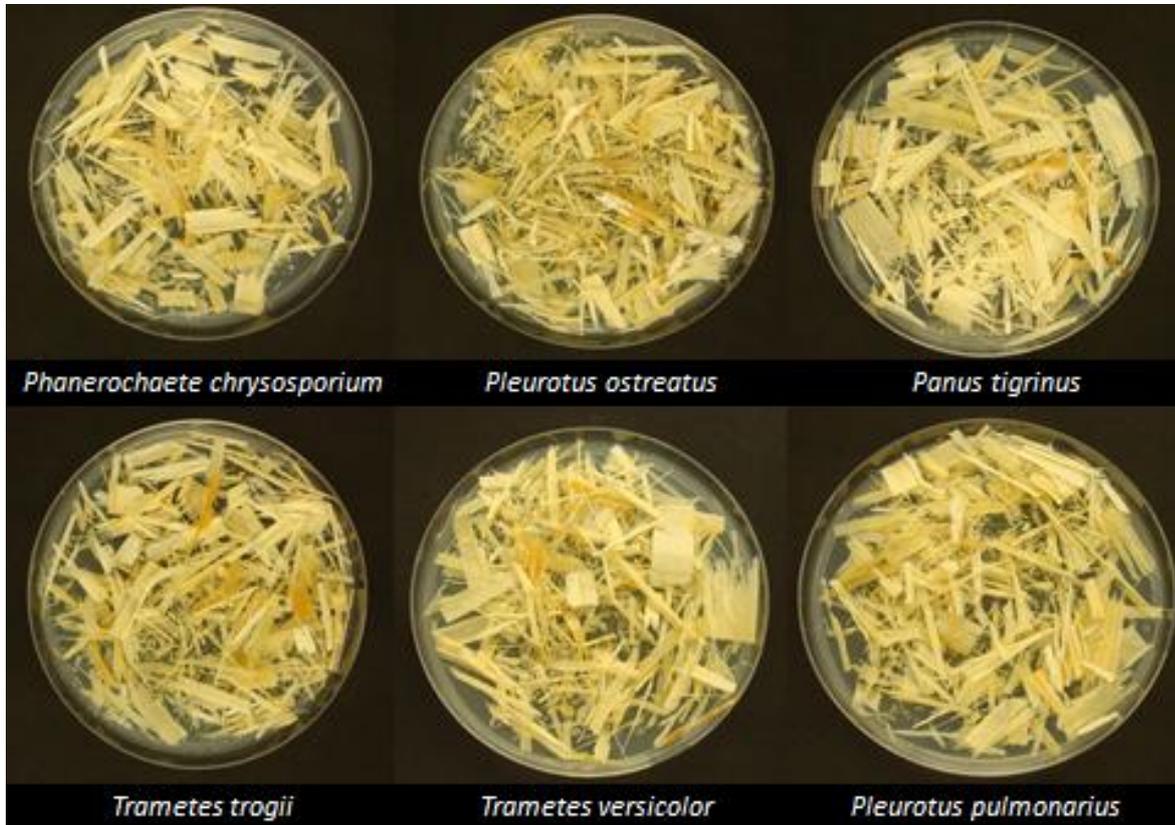


Fig.3 Prova in piastra con M9, agar (15 g/l) e 1 g di segatura.

### Fermentazioni in colture agitate sommerse

#### 16-01-2012

È stata allestita una prima prova in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti: 50 ml di acqua deionizzata e 1 g di segatura di abete. Il tutto è stato autoclavato a 121°C per 20 min.

Quindi si è proceduto all'inoculo con 3 g in peso umido di micelio.

Le beute sono stati incubate a 28°C in shaker orbitale sotto agitazione costante di 150 rpm.

Tale prova non ha però evidenziato, nel periodo di tempo studiato, la crescita dei microrganismi utilizzati (15 giorni).

#### 13-02-2012

Sono state preparate beute Erlenmeyer da 250 ml, contenenti: 100 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (15 g/l) e 2 g di segatura di abete. Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 min e vi sono stati inoculati 3 g in peso umido di micelio, ottenendo all'interno delle beute una concentrazione di biomassa pari a circa 2,25 mg/ml (peso secco). La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata in beuta, utilizzando per la pre-coltura estratto di malto (30 g/l) . La precoltura è stata condotta in beute Erlenmeyer da 250 ml (contenenti 50 ml di terreno), incubate a 28 °C in shaker orbitale sotto agitazione costante di 150 rpm, per 12 giorni.

Dopo l'inoculo, le beute sono state incubate per 5 mesi. Il prodotto delle fermentazioni (contenente biomassa microbica, biomassa lignocellulosica parzialmente idrolizzata e prodotti dell'idrolisi) è stato direttamente utilizzato come substrato per la produzione di biogas nei laboratori ENEA. Al termine della sperimentazione si è proceduto alla determinazione delle proteine totali, degli zuccheri riducenti e del peso secco (figg. 4, 5, 6).

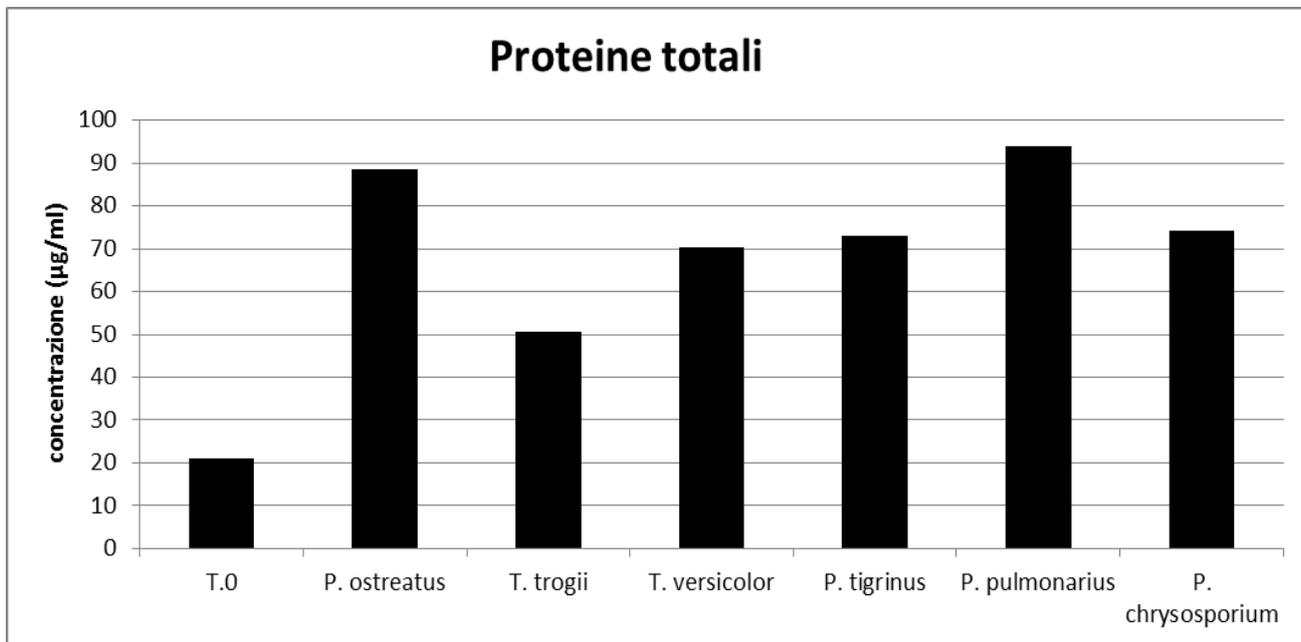


Fig.4 Valori relativi alle proteine totali dopo 5 mesi di incubazione. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

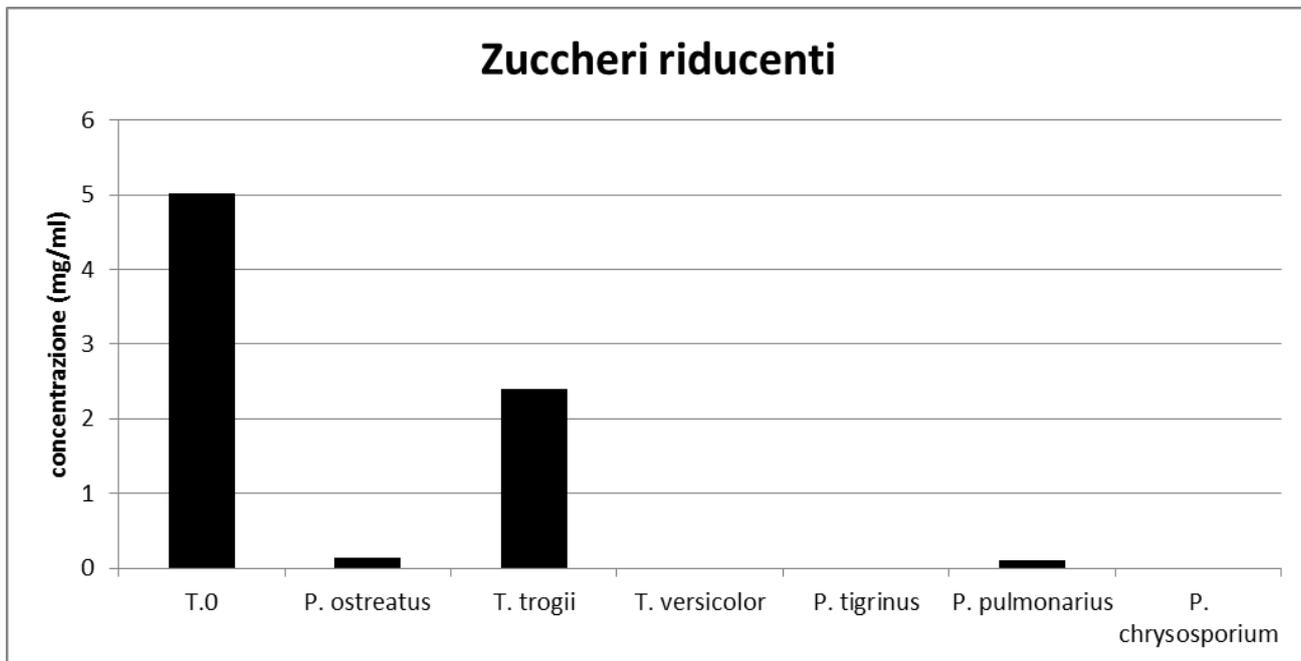


Fig.5 Valori relativi agli zuccheri riducenti dopo 5 mesi di incubazione. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

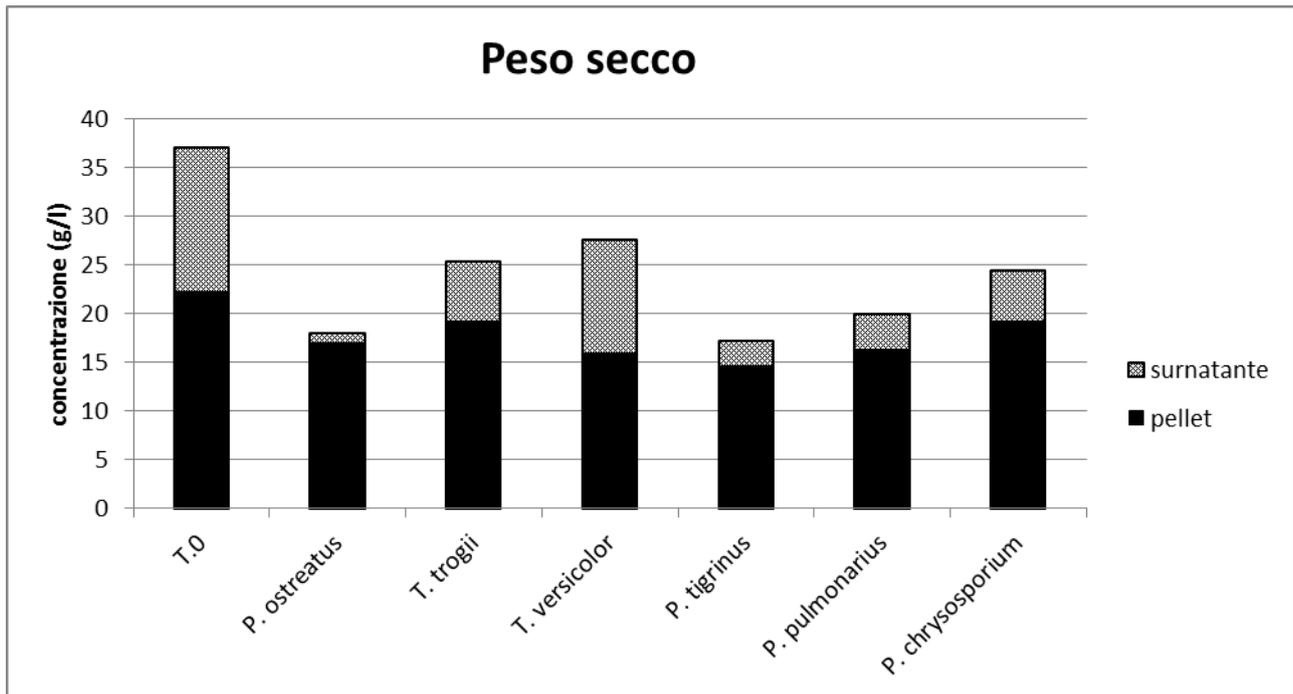


Fig.6 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante dopo 5 mesi di incubazione. T.0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo

#### 08-03-2012

È stata allestita una prova utilizzando quattro isolati fungini precedentemente isolati da un substrato lignocellulosico e non ancora identificati a livello molecolare. Sono state preparate cinque beute Erlenmeyer da 250 ml, contenenti ciascuna: 50 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (7,5 g/l) e 1 g di segatura di abete. Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 min. Vi sono stati trasferiti 2 g in peso umido di micelio ed è stata inoltre allestita una prova utilizzando una coltura mista (mix) costituita dai quattro microrganismi, inoculando 0,5 g in peso umido per ogni ceppo, ottenendo all'interno di ogni beuta una concentrazione di biomassa pari a circa 3 mg/ml (peso secco).

La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata in beuta, utilizzando per la pre-coltura estratto di malto (30 g/l). La precoltura è stata condotta in beute Erlenmeyer da 250 ml (contenenti 50 ml di terreno), incubate a 28 °C in shaker orbitale sotto agitazione costante di 150 rpm, per 12 giorni.

Dopo essere state inoculate, le beute sono state incubate per 4 mesi. Il prodotto delle fermentazioni (contenente biomassa microbica, biomassa lignocellulosica parzialmente idrolizzata e prodotti dell'idrolisi) è stato direttamente utilizzato come substrato per la produzione di biogas nei laboratori ENEA.

Al termine della sperimentazione si è proceduto alla determinazione delle proteine totali, degli zuccheri riducenti e del peso secco (figg. 7, 8, 9).

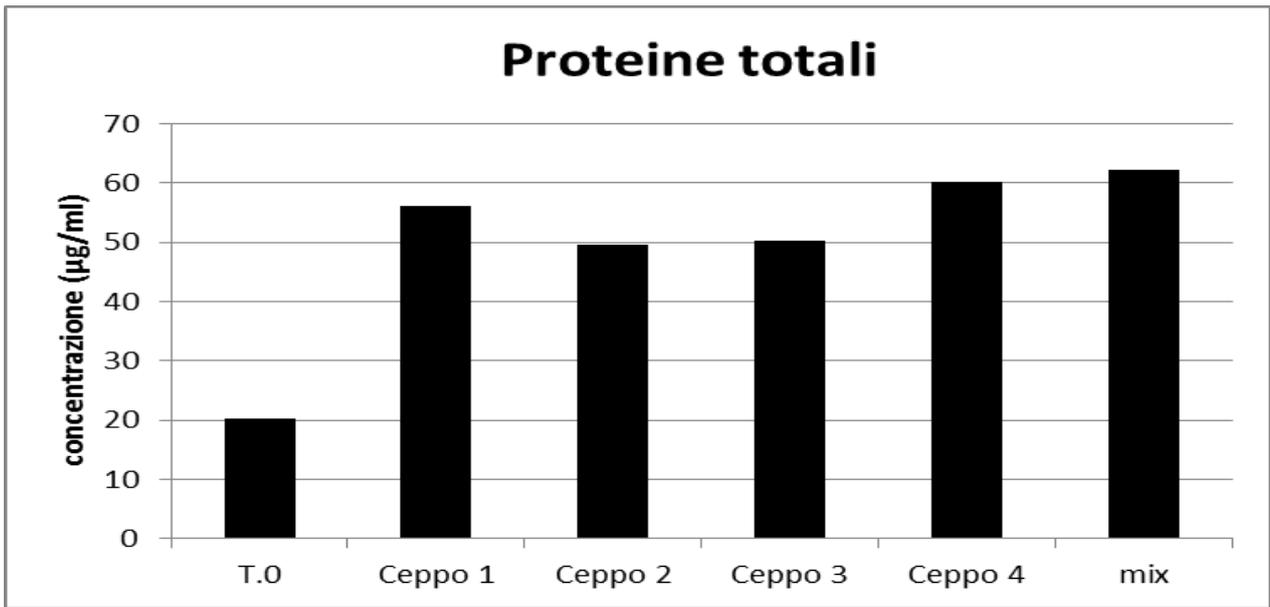


Fig.7 Valori relativi alle proteine totali dopo 4 mesi di incubazione. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

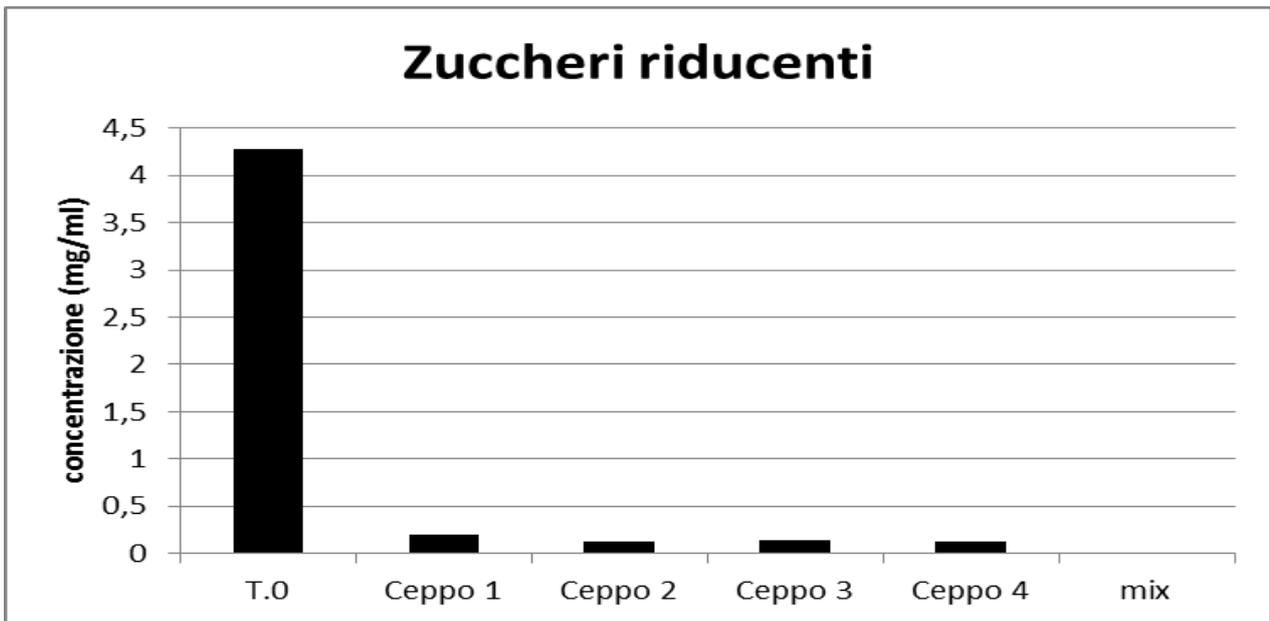


Fig.8 Valori relativi agli zuccheri riducenti dopo 4 mesi di incubazione. T.0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

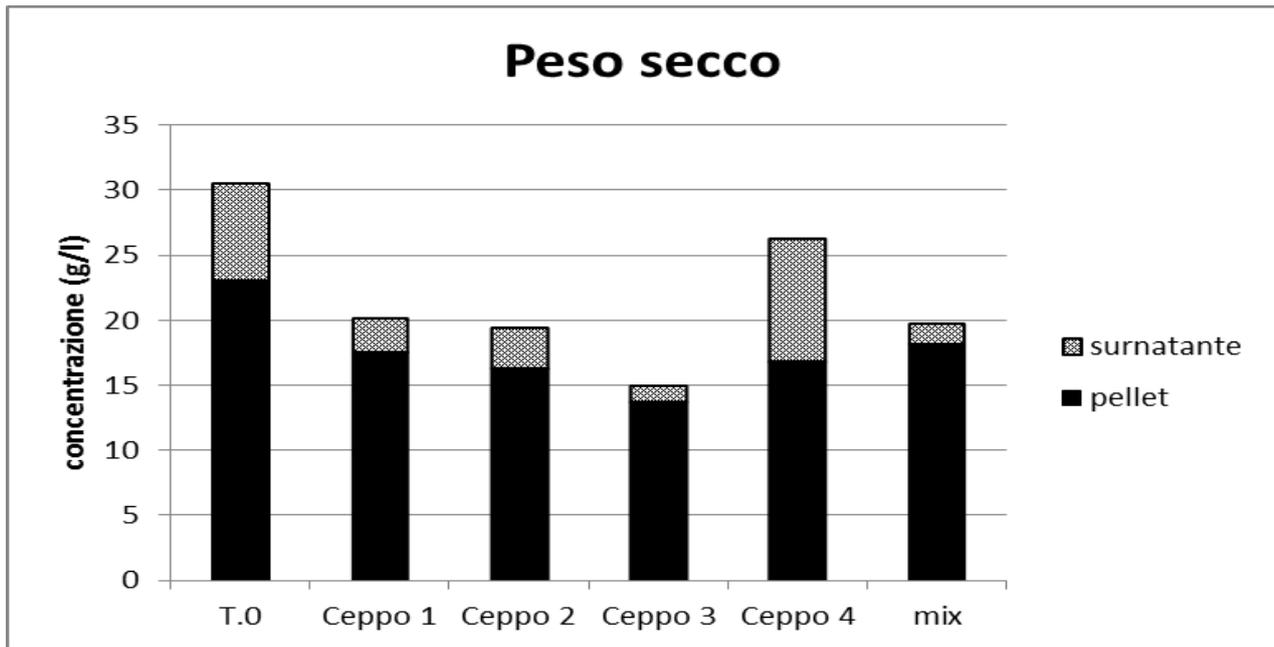


Fig.9 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante dopo 4 mesi. T.0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo

#### 18-07-2012

Dalla quantità di biogas prodotto con il materiale idrolizzato, ottenuto dalle prove precedenti, sono stati selezionati i ceppi più idonei tra quelli studiati. Sulla base dei risultati ottenuti sono stati scelti i seguenti ceppi: *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus*.

Si è deciso inoltre, durante una riunione presso i laboratori ENEA diretti dal Dr. Giulio Izzo, di utilizzare acqua di lavaggio delle olive tra i substrati di crescita in quanto, utilizzata in attività precedenti del gruppo di ricerca, si è dimostrato essere un buon induttore per gli enzimi coinvolti nella degradazione della lignina [11]. In aggiunta, è stato stabilito di allestire una prova utilizzando il fungo *Lecanicillium muscarium*, conservato anch'esso nelle collezioni di funghi dell'Università della Tuscia e noto in letteratura per la sua capacità chitinolitica [12,13].

Sono stati preparati tre diversi terreni di coltura in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti (fig. 10):

- 80 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (7,5 g/l) e 1 g di segatura di abete (MEL). Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 30 min.
- 40 ml di acqua deionizzata, 40 ml di acqua di lavaggio delle olive e 1 g di segatura di abete (ALL). Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 30 min.
- 80 ml di acqua deionizzata, 1 g di chitina e Yeast Nitrogen Base (5 g/l) (YNBC). Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 30 min.

Negli esperimenti precedenti si era osservata una certa difficoltà di colonizzazione sulle scaglie di materiale LC utilizzato, probabilmente a causa dell'elevata pezzatura della segatura utilizzata (dimensioni medie 1,5 cm). Pertanto, nonostante la frammentazione fine del materiale possa incidere negativamente sui costi di processo, la segatura di abete utilizzata in questa prova è stata ulteriormente frammentata per ridurre la granulometria (dimensioni medie 2 mm).

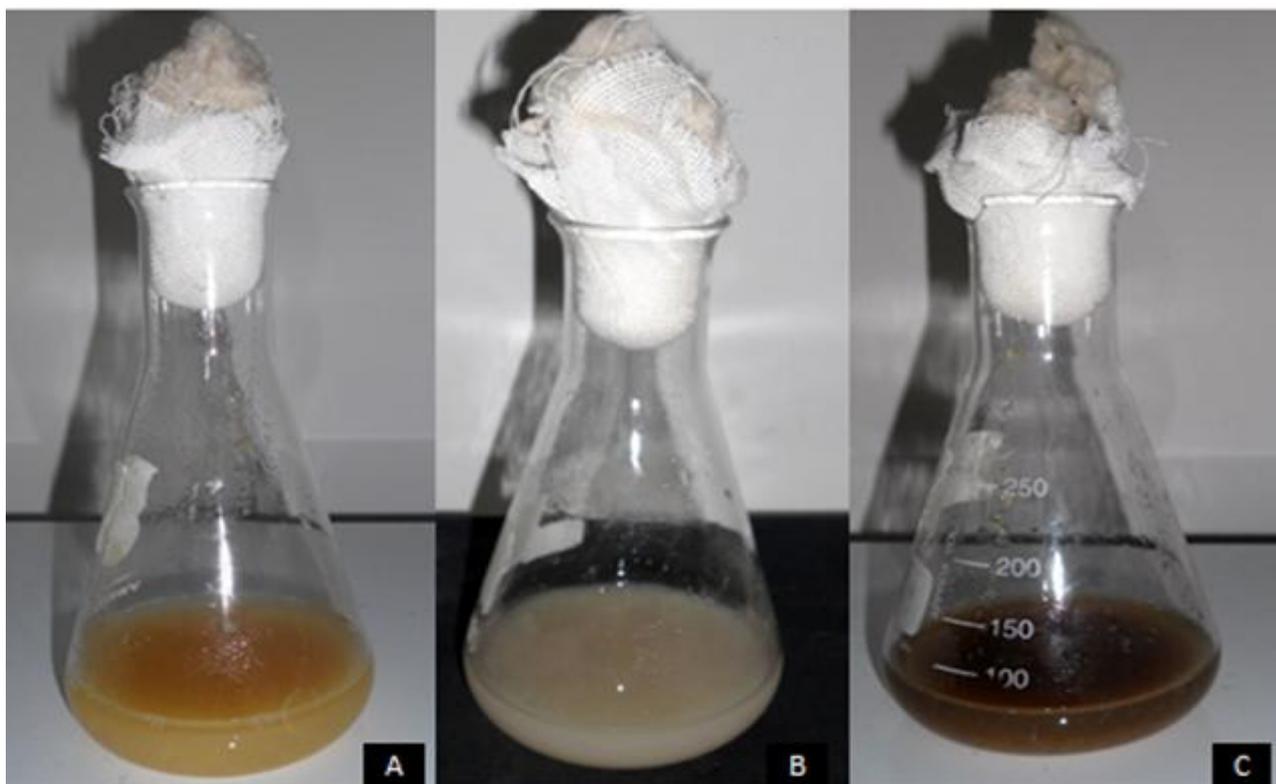


Fig.10 Terreni di coltura in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti:

- A. 80 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (7,5 g/l) e 1 g di segatura di abete;
- B. 80 ml di acqua deionizzata, 1 g di chitina e Yeast Nitrogen Base (5 g/l).
- C. 40 ml di acqua deionizzata, 40 ml di acqua di lavaggio delle olive e 1 g di segatura di abete.

Per i terreni MEL e ALL stati utilizzati i ceppi: *T. versicolor*, *T. trogii*, *P. pulmonarius* e *P.tigrinus*. La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata in beuta, utilizzando per la pre-coltura estratto di malto (30 g/l) . La precoltura è stata condotta in beute Erlenmeyer da 250 ml (contenenti 50 ml di terreno), incubate a 28 °C in shaker orbitale sotto agitazione costante di 150 rpm, per 12 giorni. Dopo omogeneizzazione con Ultra Turrax Mixer, 2 ml di sospensione miceliare sono state utilizzate come inoculo per i terreni MEL e ALL. Il ceppo *L. muscarium* è stato inoculato su terreno YNBC e la biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo è stata prodotta in coltura agitata utilizzando glucosio (20 g/l) e Yeast Nitrogen Base (5g/l). La precoltura è stata condotta in beute Erlenmeyer da 250 ml (contenenti 50 ml di terreno), incubate per 7 giorni e, dopo omogeneizzazione con Ultra Turrax Mixer, 2 ml di sospensione miceliare sono state utilizzate come inoculo.

Per ciascun fungo e per ogni terreno sono state allestite tre repliche. Le prime due sono state utilizzate per monitorare il processo fermentativo a cadenza settimanale, mediante il prelievo di aliquote di 20 ml, dopo omogeneizzazione con Ultra Turrax, per le prime tre settimane. Per la quinta settimana si è deciso di utilizzare esclusivamente la terza replica in quanto rappresentativa del tempo finale delle fermentazioni. Per le aliquote e la terza replica si è proceduto alla determinazione delle proteine totali e degli zuccheri riducenti sia prima dell'inoculo batterico in anaerobiosi presso i laboratori ENEA, sia dopo l'inoculo (figg. 11-20). Settimanalmente inoltre, in seguito all'inoculo batterico, si è proceduto alla determinazione del peso secco. (figg. 21-29).

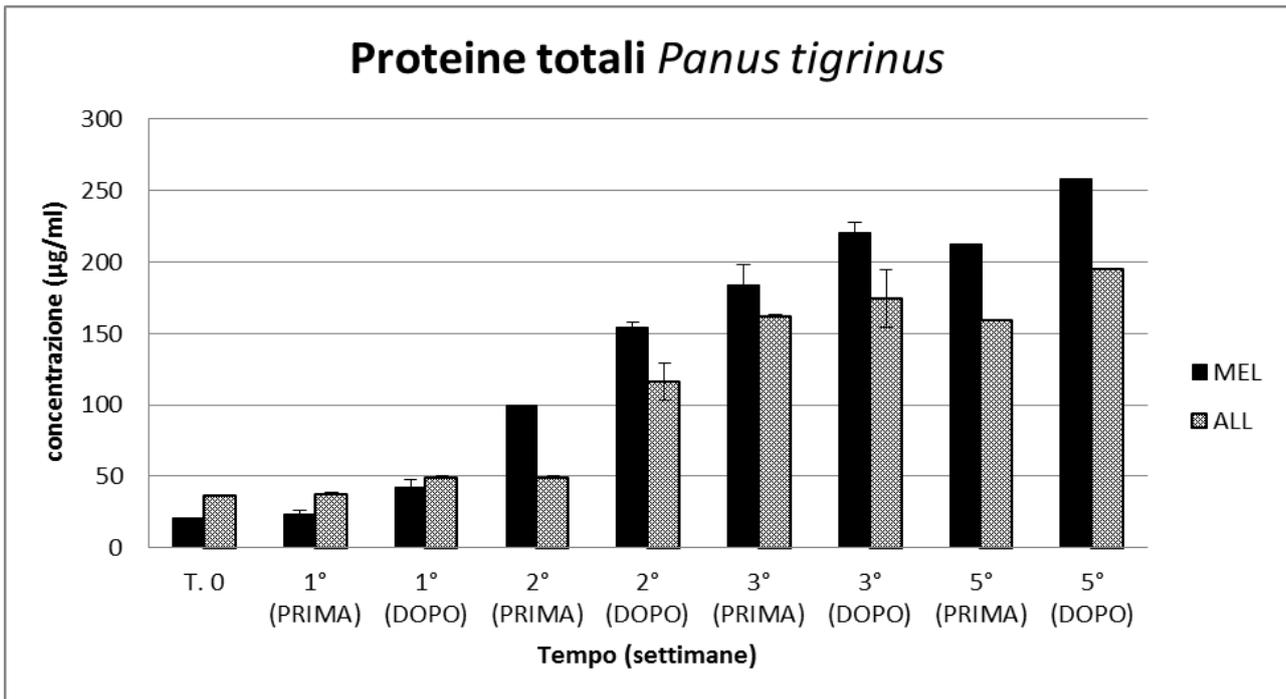


Fig.11 Valori relativi alle proteine totali ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'incolo

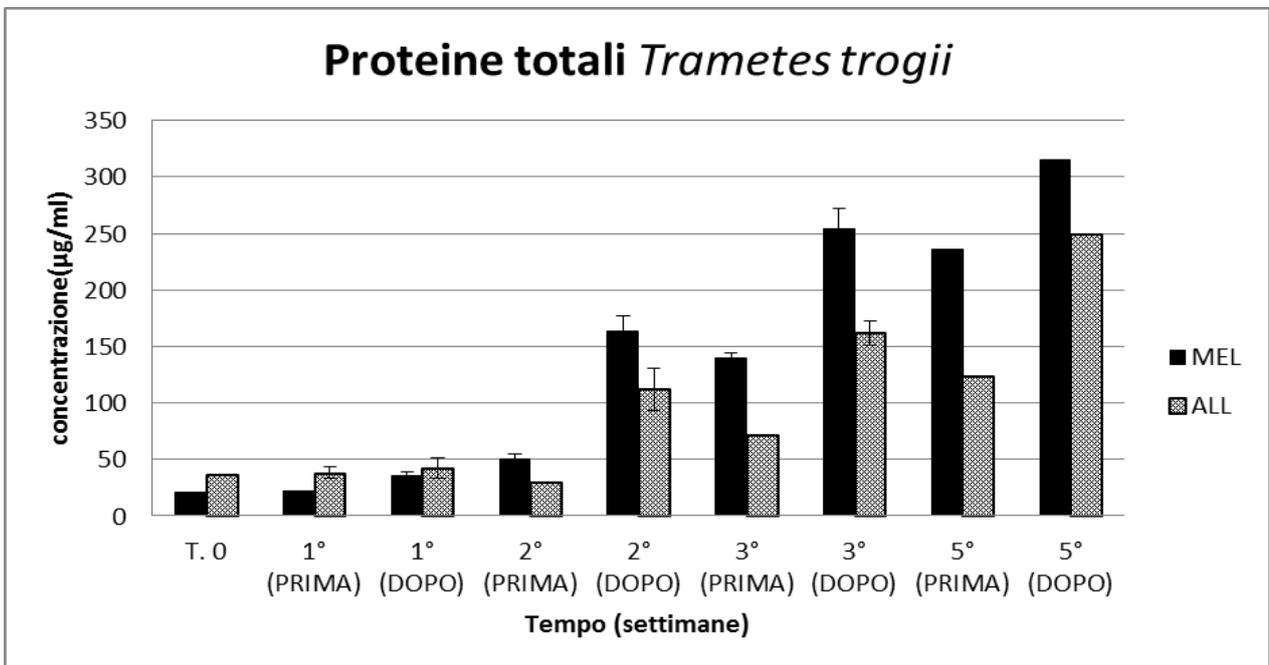


Fig.12 Valori relativi alle proteine totali ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'incolo

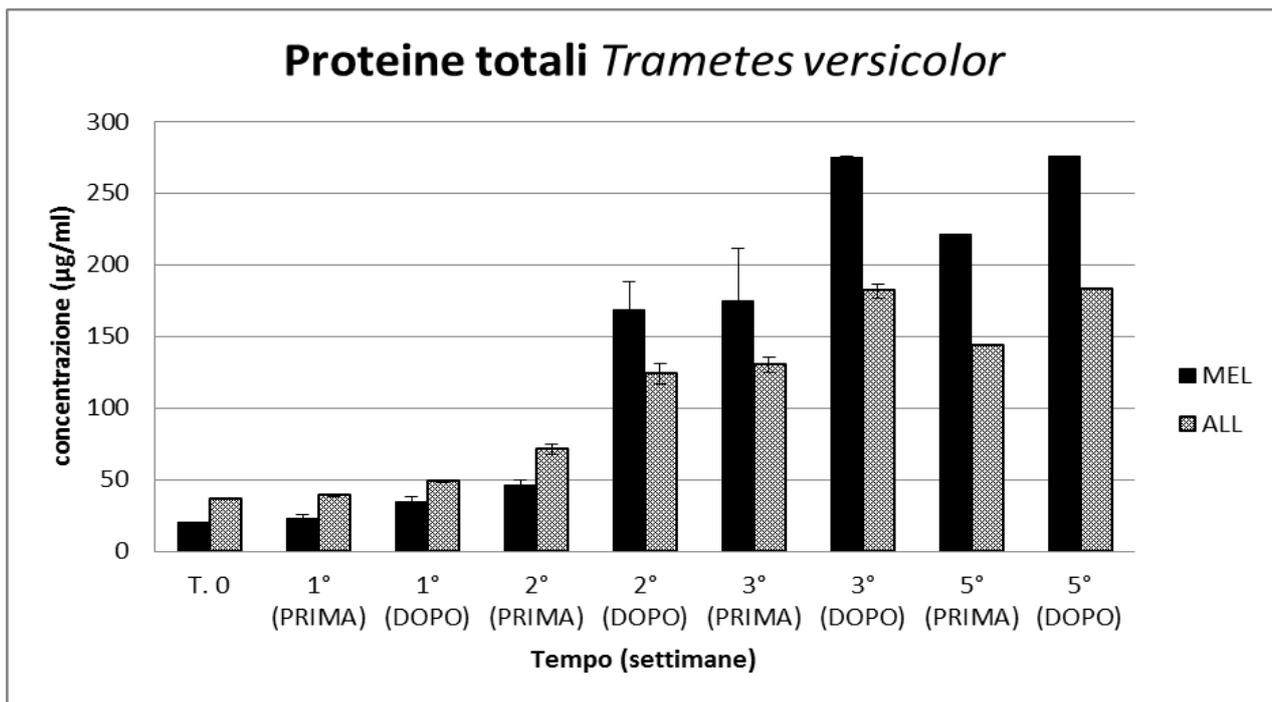


Fig.13 Valori relativi alle proteine totali ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

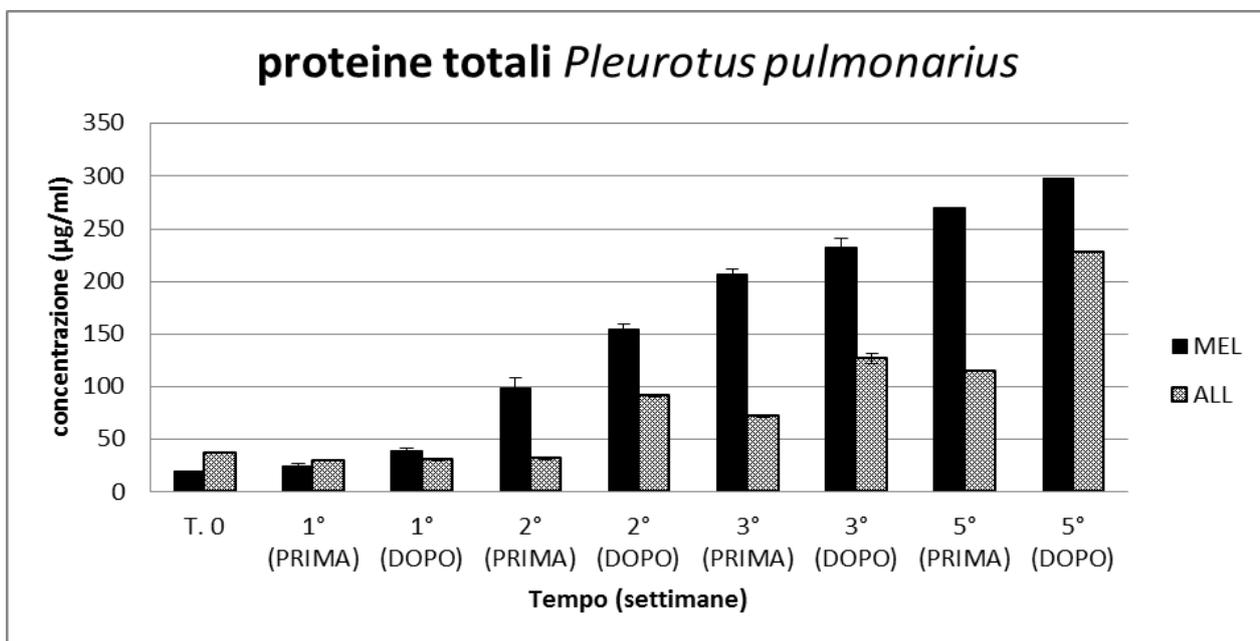


Fig.14 Valori relativi alle proteine totali ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

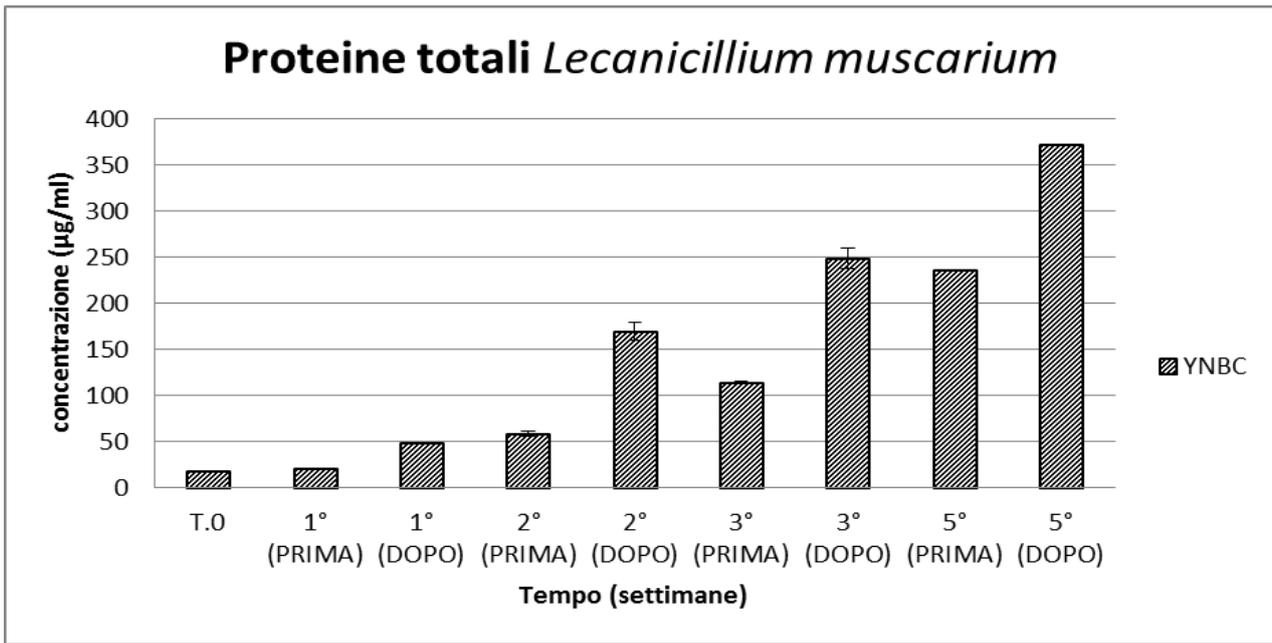


Fig.15 Valori relativi alle proteine totali ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

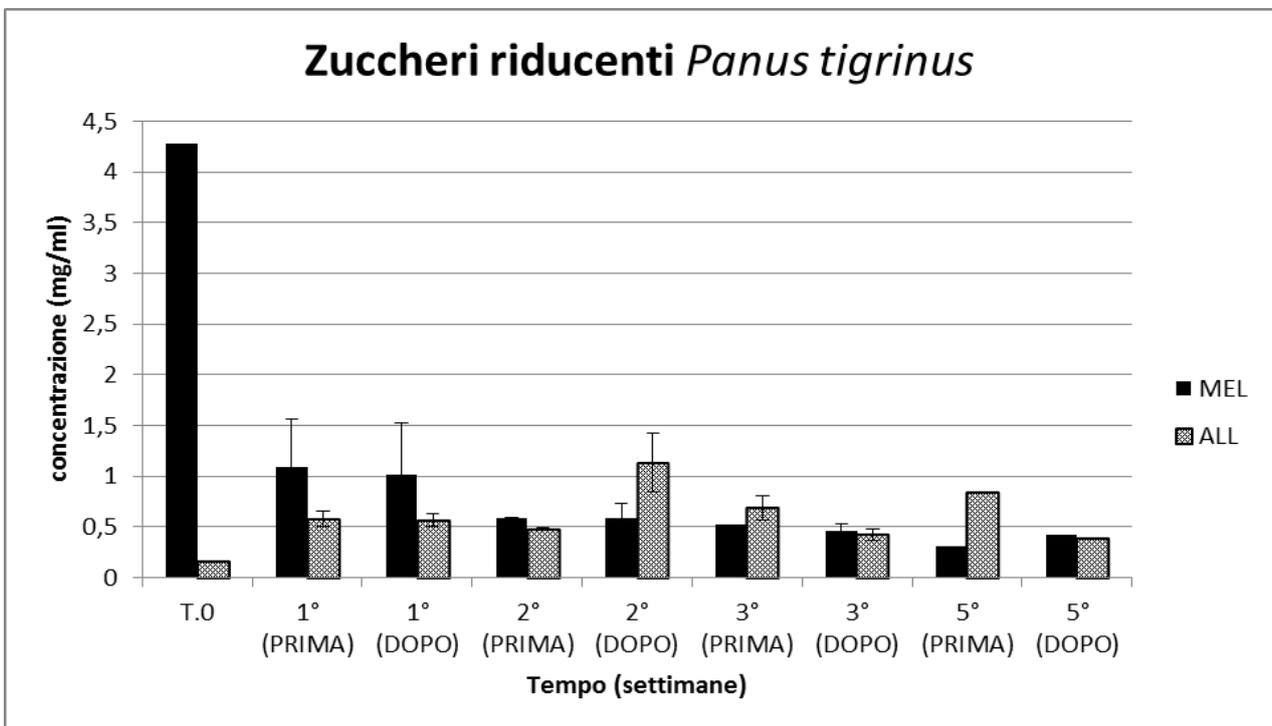


Fig. 16 Valori relativi agli zuccheri riducenti ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

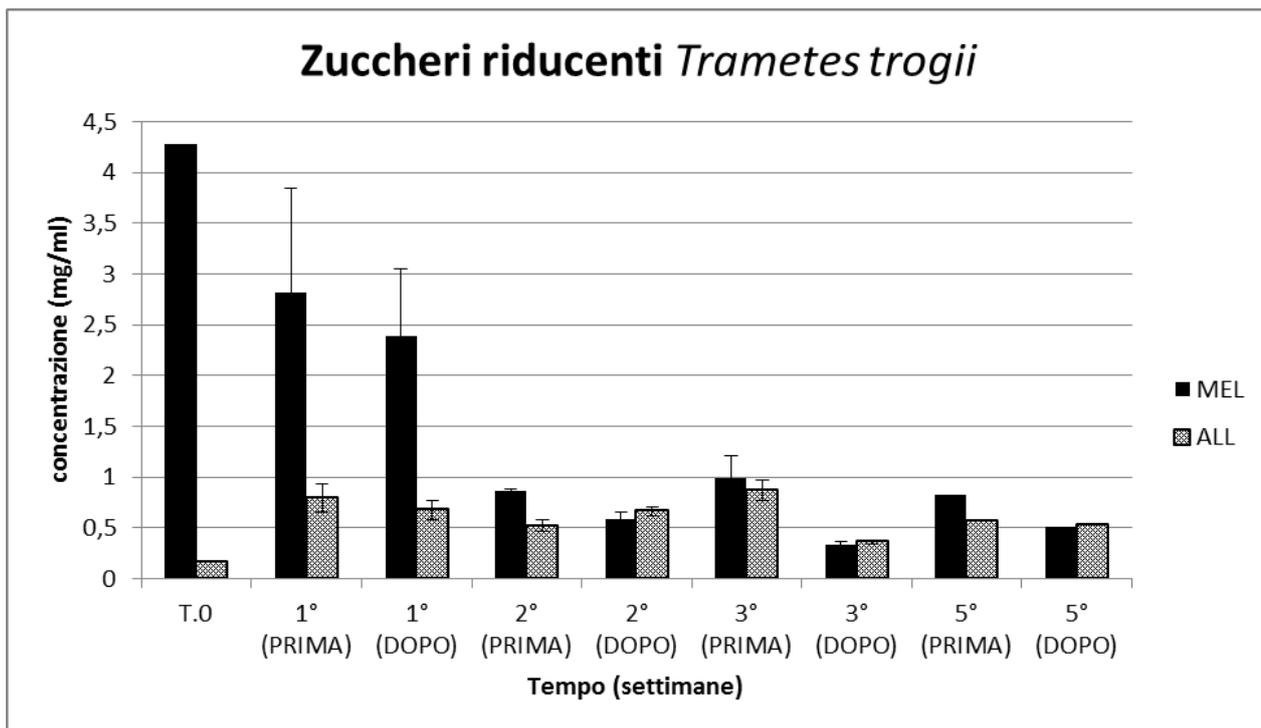


Fig. 17 Valori relativi agli zuccheri riducenti ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

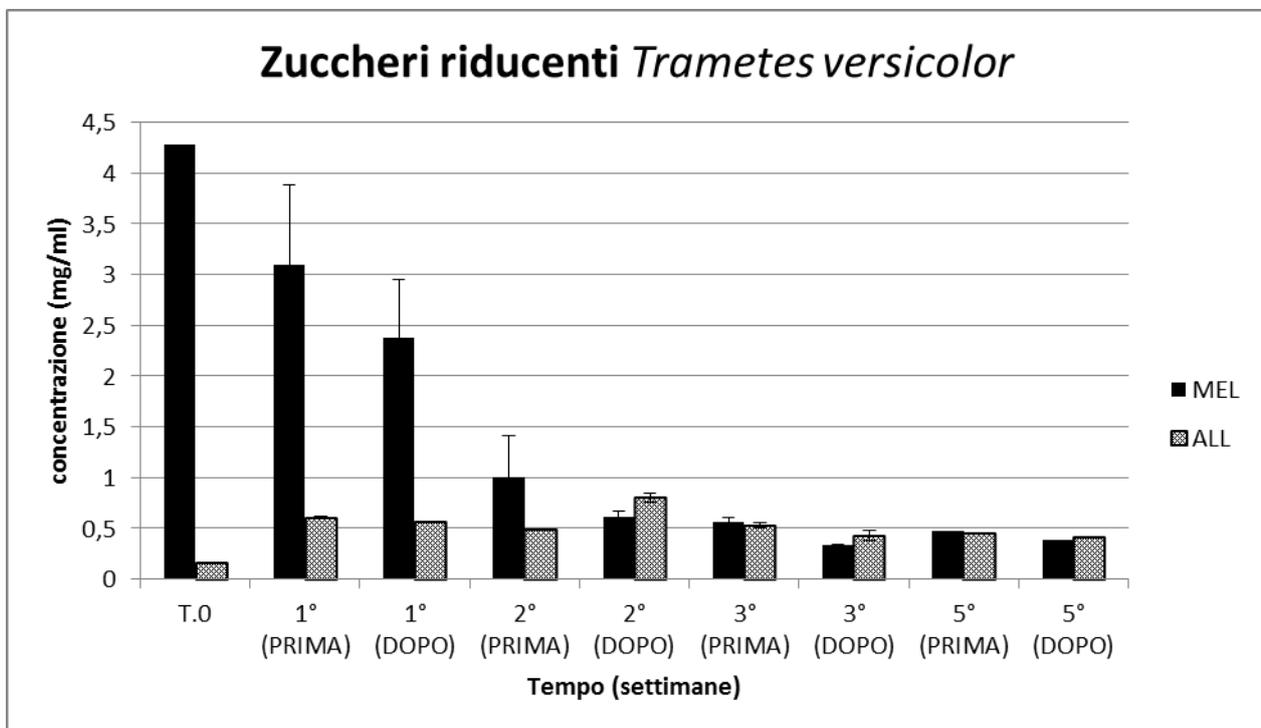


Fig. 18 Valori relativi agli zuccheri riducenti ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'inoculo

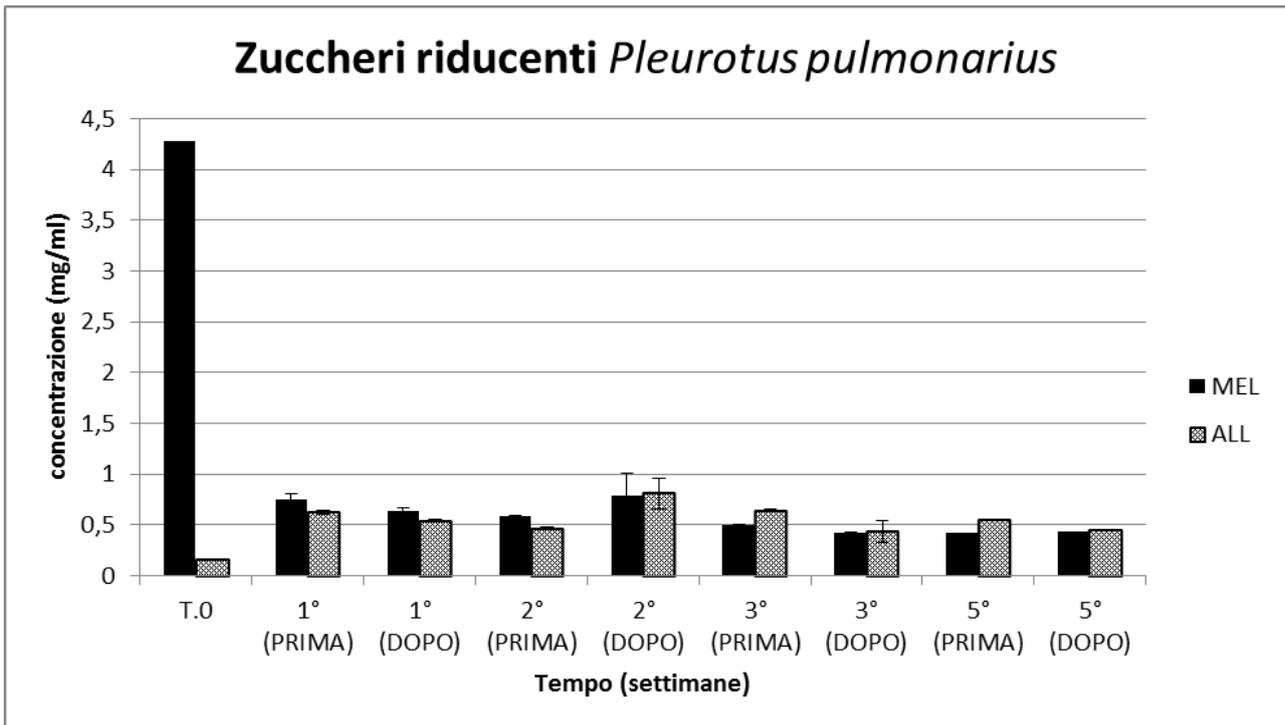


Fig.19 Valori relativi agli zuccheri riducenti ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'incolo

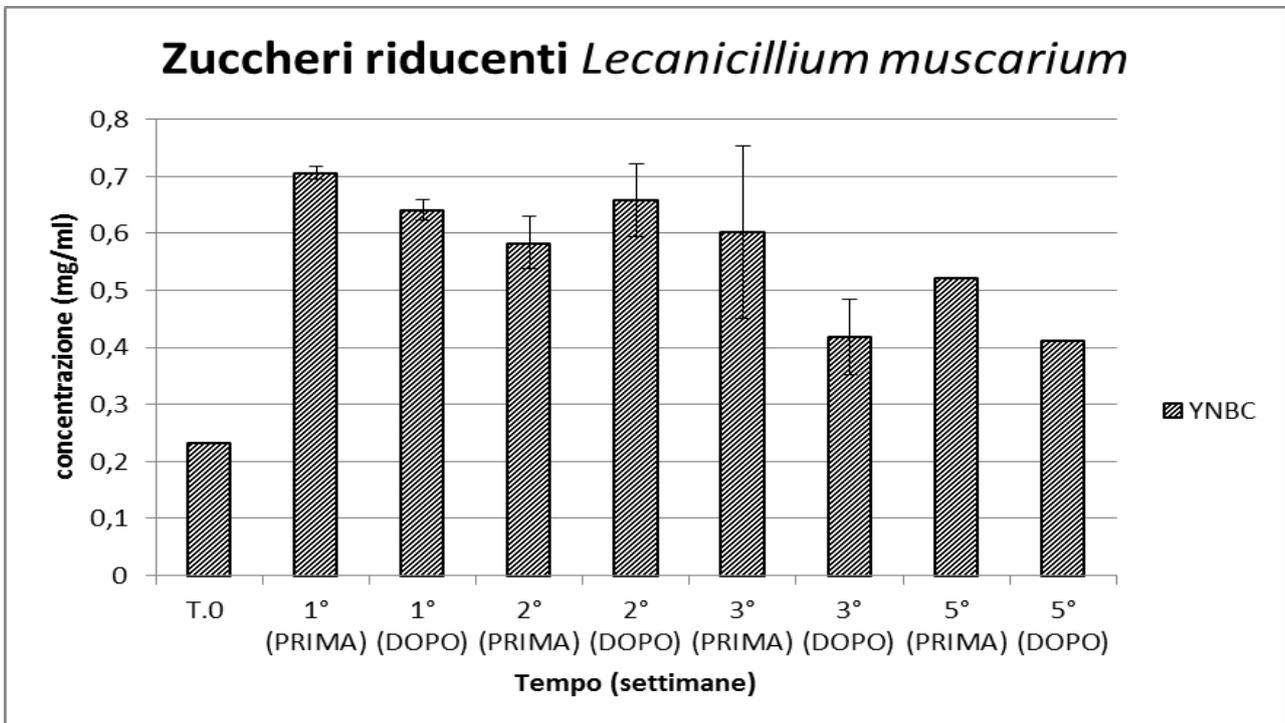


Fig. 20 Valori relativi agli zuccheri riducenti ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il terreno di coltura al momento dell'incolo

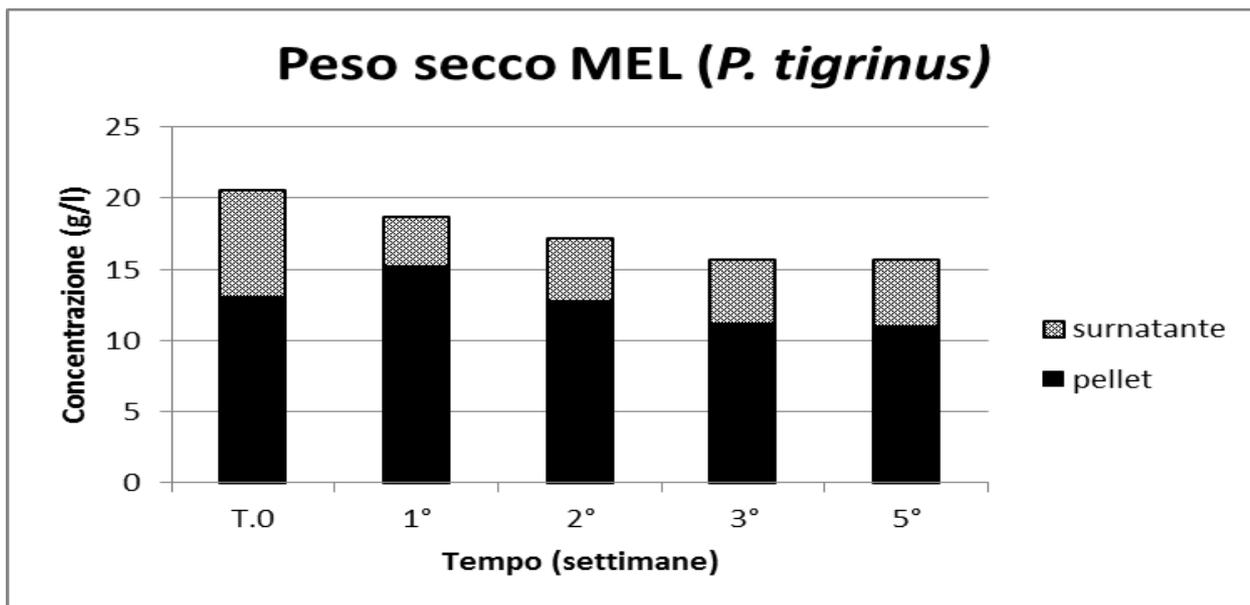


Fig.21 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

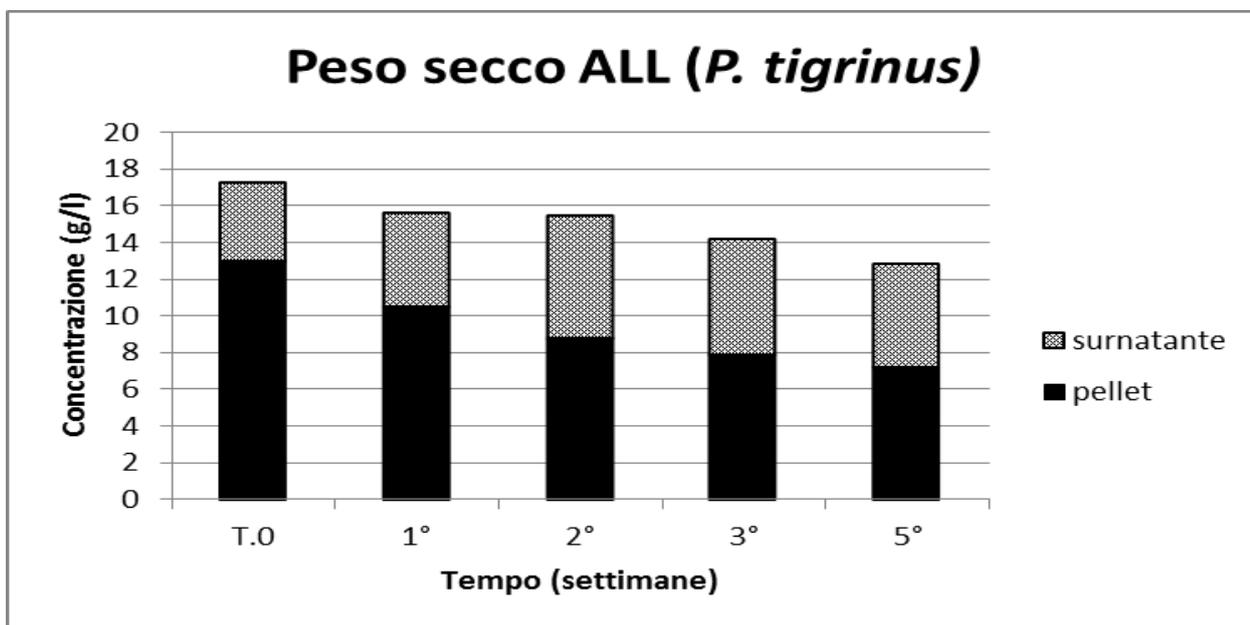


Fig.22 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

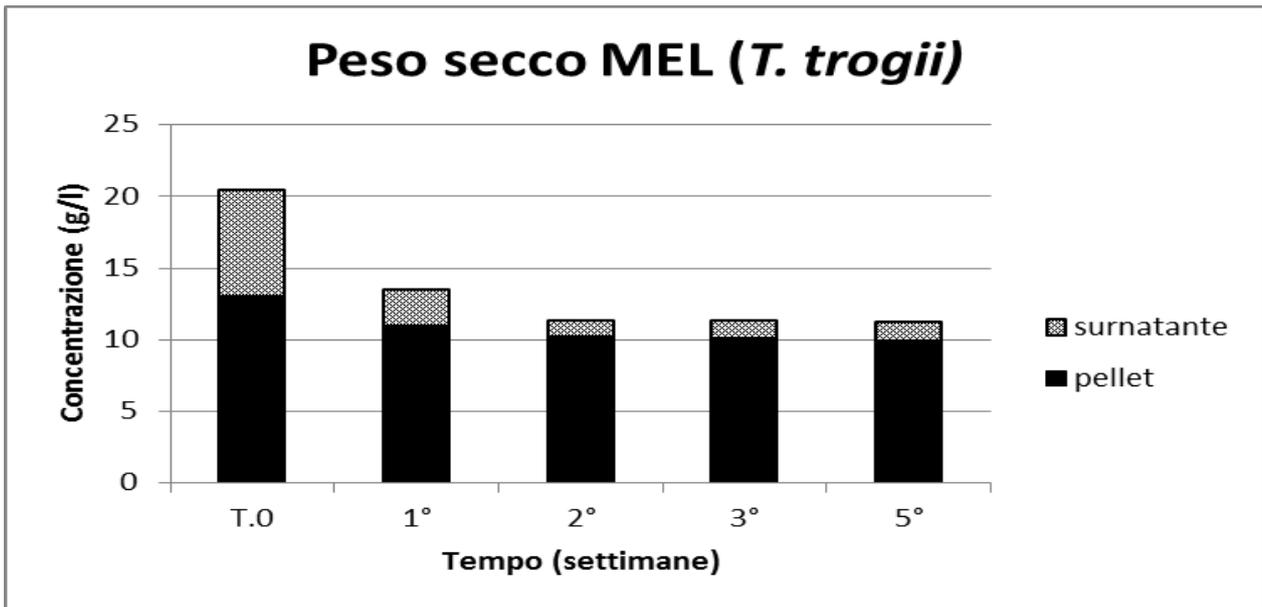


Fig.23 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'incolo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

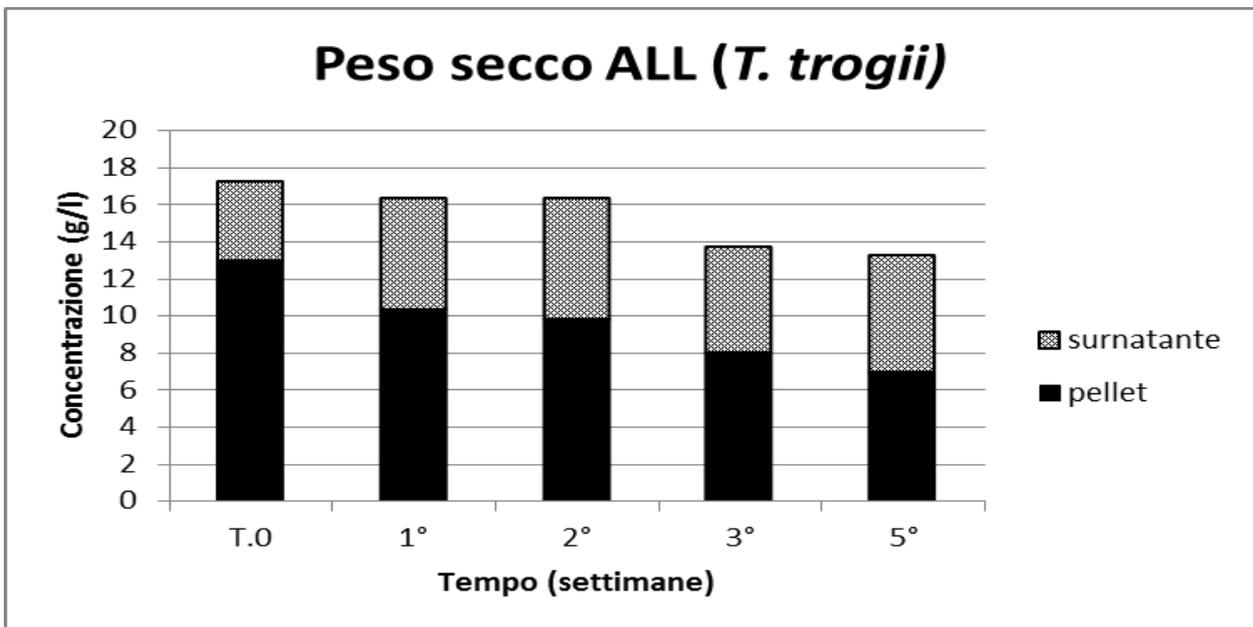


Fig.24 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'incolo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

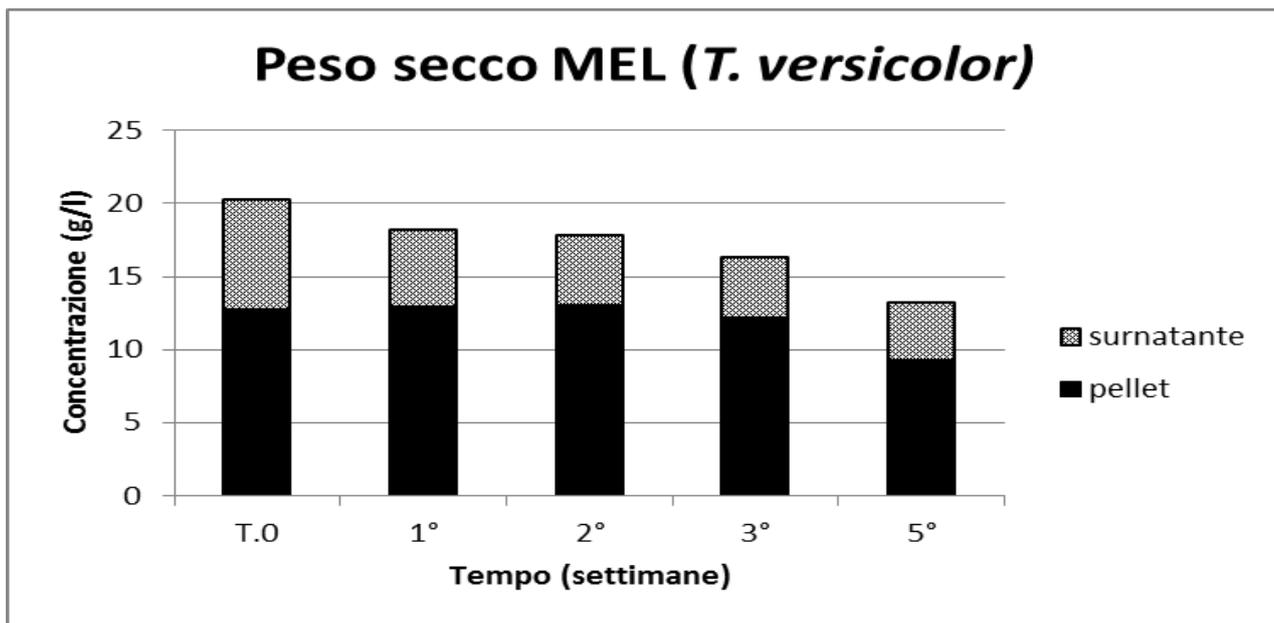


Fig.25 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

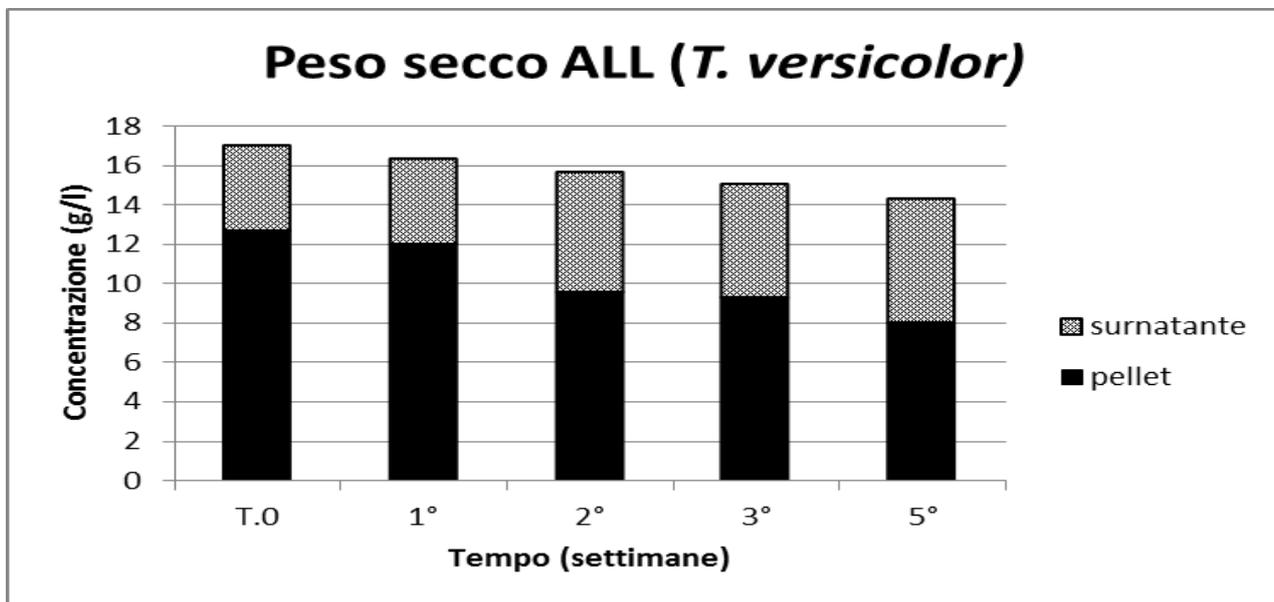


Fig.26 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

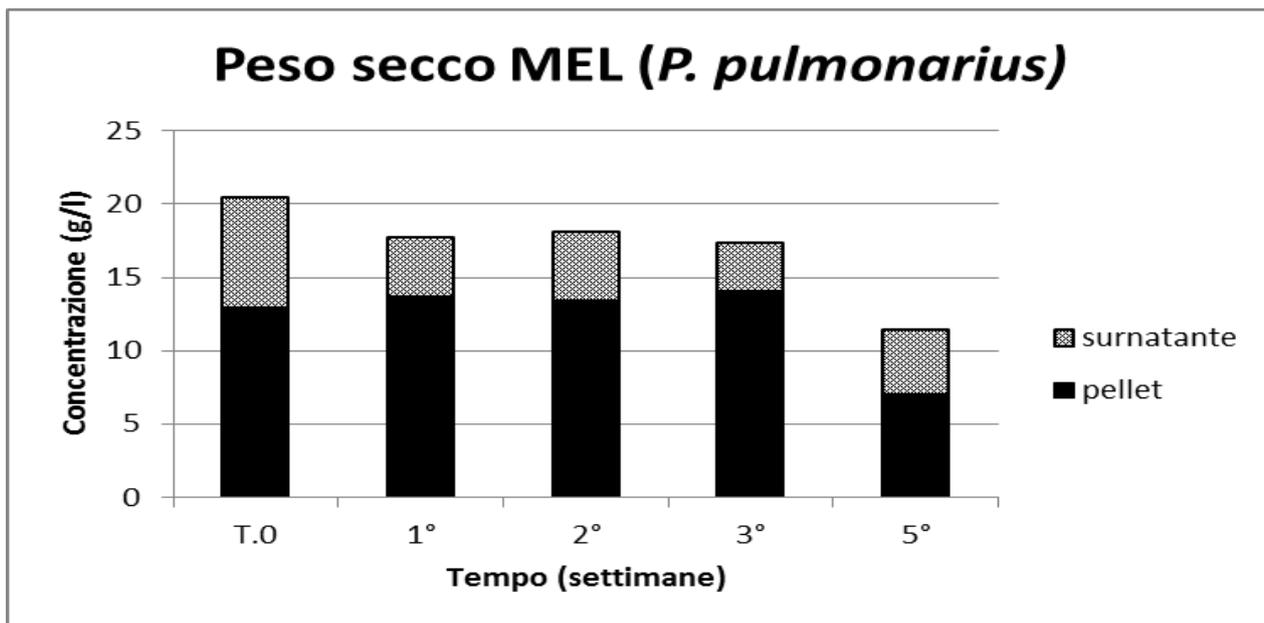


Fig.27 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

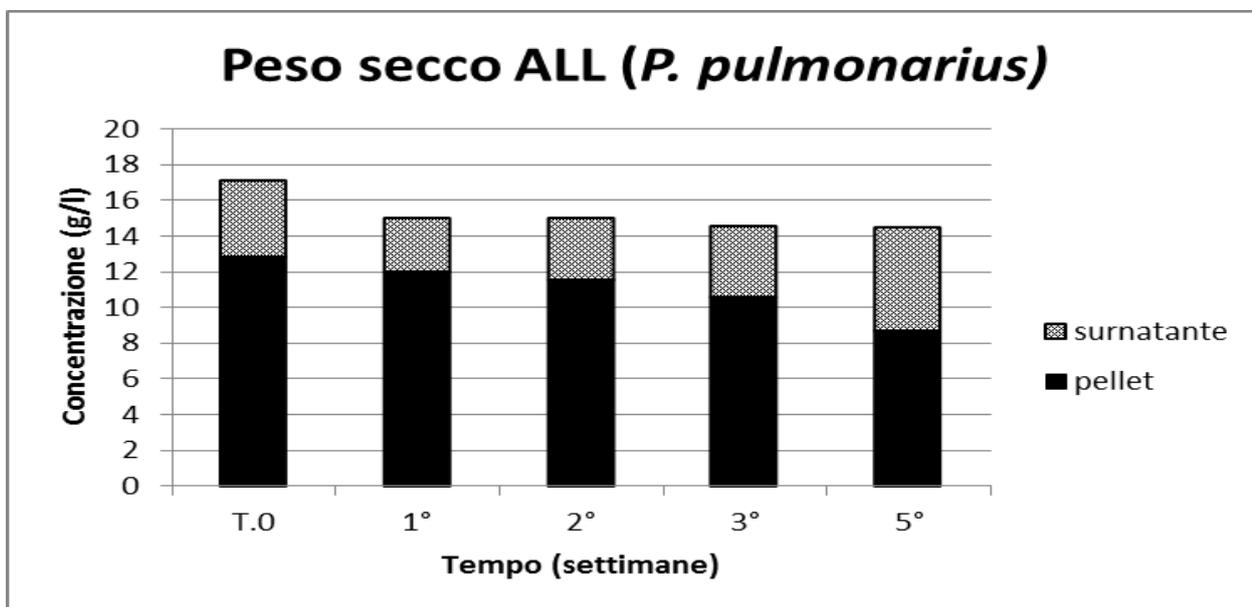


Fig.28 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

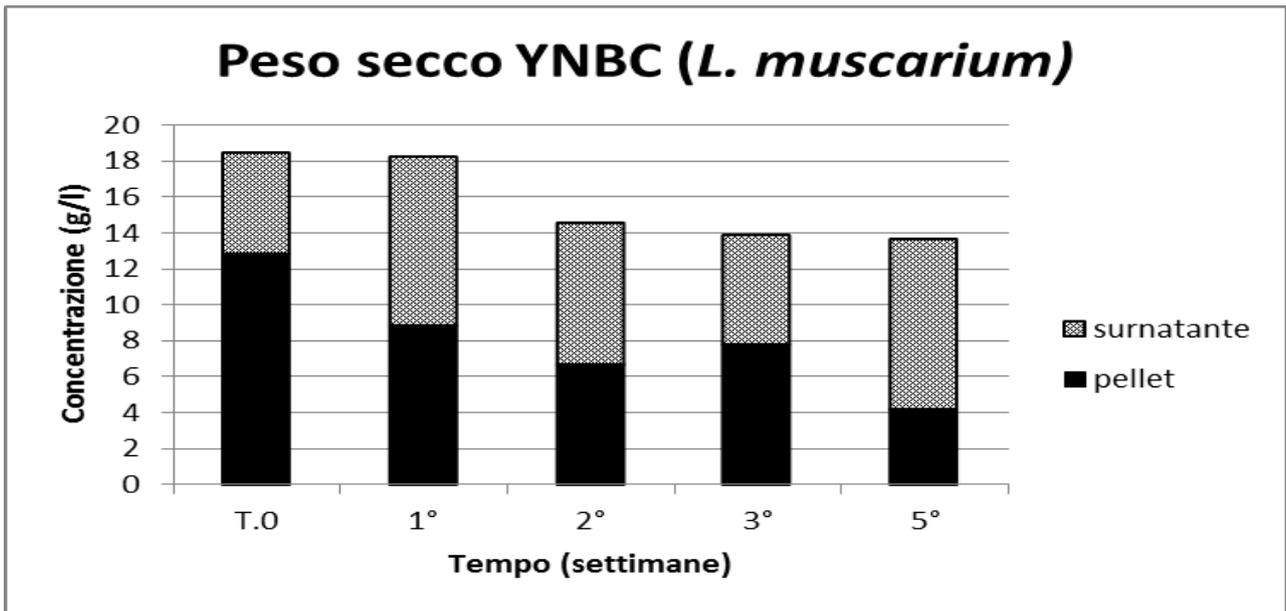


Fig.29 Valori relativi alla somma dei pesi secchi di pellet e surnatante ottenuti dalla media dei valori delle due repliche per la prima, la seconda e la terza settimana. Per la quinta settimana è stata utilizzata esclusivamente la terza replica. T. 0 rappresenta il peso secco del campione al momento dell'inoculo. Le barre di errore non sono state riportate. La deviazione standard è al di sotto del 20%

## 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, le proteine totali aumentano nel corso delle settimane in tutti gli esperimenti. L'andamento degli zuccheri riducenti è al contrario variabile. In MEL, è evidente una tendenza alla riduzione della concentrazione, mentre in ALL, dopo un iniziale aumento nel corso della prima settimana, mantengono valori pressoché costanti. È interessante notare come, in YNBC, l'aumento nel corso della prima settimana sia particolarmente elevato. Questo è probabilmente dovuto alle notevoli capacità idrolitiche del fungo *L. muscarium* nei confronti della chitina.

I funghi testati sono cresciuti sicuramente utilizzando sia il materiale in soluzione nel terreno di coltura, sia la biomassa LC (o la chitina nel caso di *L. muscarium*). Il loro metabolismo causa un aumento di biomassa fungina e una riduzione di quella LC, così come una variazione nella composizione del terreno liquido. Pur non essendo possibile separare il fungo dalla segatura, una riduzione del peso secco del pellet è comunque imputabile ad idrolisi perché il pellet è formato da fungo e materiale LC. È emblematico il caso di *P. pulmonarius* in MEL, per il quale si passa da un peso secco iniziale di biomassa LC di 12,5 g/l ad un peso secco del pellet pari a 6,9 g/l alla fine del processo. Questa riduzione di circa il 50% è il risultato di un notevole processo di idrolisi, dal momento che nel peso secco del pellet è compreso anche il consistente peso del micelio cresciuto nelle 5 settimane. In altre parole il materiale LC se escludessimo la biomassa fungina sarebbe stato idrolizzato molto più del 50%.

Misurando il decremento del peso secco totale (pellet e surnatante) si ha un'idea generale di ciò che il fungo ha consumato respirando, che è stato eliminato sotto forma di CO<sub>2</sub>.

L'aumento del peso secco del surnatante, causato da rilascio di sostanze solubili nel terreno (proteine, zuccheri, ecc...), può essere considerato comunque un indice dell'idrolisi. Teoricamente, un surnatante ricco dovrebbe essere buon substrato per la fermentazione a idrogeno successiva. Per i WR, l'aumento del peso secco del surnatante è dovuto principalmente a proteine, mentre per *L. muscarium* è dovuto sia a proteine, sia a zuccheri.

In futuro, al fine di ottimizzare il processo di idrolisi e la produzione degli enzimi coinvolti, si potrà procedere alla selezione di ulteriori materiali lignocellulosici utilizzabili come substrati. Inoltre, una volta individuati i parametri fermentativi ottimali, sarà possibile allestire nuove prove in bioreattore da laboratorio, al fine di simulare possibili processi a livello industriale (scale-up).

## 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. Lutzen N.W., Nielsen M.H.m Oxiboell K.M., Schiilein M. and Olessen B.S. Cellulase and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Philos. Trans. R. Soc. London* 300 (1983): 283.
3. Himmel M.E., Ruth M.F. and Wyman C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(4) (1999):358-64.
4. Nishiyama Y., Langan P. and Chanzy H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I<sub>β</sub> from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124(31) (2002): 9074-9082.
5. Ding S.Y. and Himmel M.E. (2006). The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *J. Agric. Food Chem.* 54(3) (2006): 597-606.
6. Himmel M. E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W. and Foust T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315 (5813) (2007): 804 – 807.
7. Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1994): 125–135.
8. 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.
9. Platt M.W., Hadar Y., Chet I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 20 (1984):150-154.
10. 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.
11. Cerrone F., Barghini P., Pesciaroli C., Fenice M., Efficient removal of pollutants from olive washing wastewater in bubble-column bioreactor by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 84 (2011): 254-259.
12. 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.
13. Fenice M. and Gooday G.W. Mycoparasitic actions against fungi and oomycetes by a strain (CCFEE 5003) of the fungus *Lecanicillium muscarium* isolated in Continental Antarctica. *Annals of Microbiology* 56 (2006): 1-6.

## Abbreviazioni ed acronimi

- WR: White Rot
- LC: lignocellulosica
- MEL: terreno di coltura in beuta Erlenmeyer da 250 ml contenente: 80 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (7,5 g/l) e 1 g di segatura di abete;
- ALL: terreno di coltura in beuta Erlenmeyer da 250 ml contenente: 40 ml di acqua deionizzata, 40 ml di acqua di lavaggio delle olive e 1 g di segatura di abete;
- YNBC: terreno di coltura in beuta Erlenmeyer da 250 ml contenente: 80 ml di acqua deionizzata, 1 g di chitina e Yeast Nitrogen Base (5 g/l).

## Appendice

### *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 Tuscia. 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 ed estremofili;
- La biodiversità di microrganismi estremofili;
- Le biotecnologie microbiche;
- La microbiologia ambientale;
- L'ecologia microbica.

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

- Lo studio di microrganismi marini e loro potenziali applicazioni.

Sono attivi studi su:

- o Mare Mediterraneo;
- o Mar Bianco (Circolo Polare Artico, Russia);
- o Mare di Ross (Antartide);
- o Lago "La Caldera" (Sierra Nevada, Spagna).
- Produzione di enzimi e metaboliti da parte di microrganismi.

Sono attivi studi su:

- o Produzione e caratterizzazione di enzimi da microrganismi marini;
- o Produzione e caratterizzazione di enzimi da microrganismi estremofili (in particolare psicrofili e psicrotolleranti);
- o 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:

- o Trattamento microbico di scarti dell'industria olearia;
- o 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.