

**E. VIOLA, V. VALERIO, G. BRACCIO**

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde  
Laboratorio Tecnologie e Processi per  
le Bioraffinerie e la Chimica Verde  
Centro Ricerche Trisaia, Matera

**U. DE CORATO**

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde  
Laboratorio Tecnologie e Processi per  
le Bioraffinerie e la Chimica Verde  
Ufficio Territoriale di Bari

**G.L. BRUNO**

Università degli studi di Bari  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti  
Sezione di Patologia Vegetale  
Campus Universitario "E. Quagliariello" (Bari)

**E. BATTISTEL**

VERSALIS S.P.A. - BIOTEC  
Business Unit R&D and Renewable Research Center  
Via Fauser 4, 28100 Novara

**BIODEGRADAZIONE DELLA BAGASSA DI GUAYULE  
CON "WHITE-ROT FUNGI" FINALIZZATA ALLA  
PRODUZIONE DI ZUCCHERI DI 2° GENERAZIONE  
PER IL PROGETTO "ALBE"**

RT/2021/3/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,  
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

E. VIOLA, V. VALERIO, G. BRACCIO

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde  
Laboratorio Tecnologie e Processi per  
le Bioraffinerie e la Chimica Verde  
Centro Ricerche Trisaia, Matera

U. DE CORATO

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde  
Laboratorio Tecnologie e Processi per  
le Bioraffinerie e la Chimica Verde  
Ufficio Territoriale di Bari

G.L. BRUNO

Università degli studi di Bari  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti  
Sezione di Patologia Vegetale  
Campus Universitario "E. Quagliariello" (Bari)

E. BATTISTEL

VERSALIS S.P.A. - BIOTEC  
Business Unit R&D and Renewable Research Center  
Via Fauser 4, 28100 Novara

# BIODEGRADAZIONE DELLA BAGASSA DI GUAYULE CON "WHITE-ROT FUNGI" FINALIZZATA ALLA PRODUZIONE DI ZUCCHERI DI 2° GENERAZIONE PER IL PROGETTO "ALBE"

RT/2021/3/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,  
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina [www.enea.it](http://www.enea.it)

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

# BIODEGRADAZIONE DELLA BAGASSA DI GUAYULE CON "WHITE-ROT FUNGI" FINALIZZATA ALLA PRODUZIONE DI ZUCCHERI DI 2° GENERAZIONE PER IL PROGETTO "ALBE"

E. Viola, U. De Corato, V. Valerio, G.L. Bruno, E. Battistel, G. Braccio

## Riassunto

In questo lavoro, svolto nell'ambito del Progetto di Ricerca ENEA-VERSALIS "ALBE", sono descritti la metodologia sperimentale e i risultati ottenuti su un processo di pretrattamento microbiologico della bagassa di guayule. Il guayule è una coltura alternativa al caucciù (albero della gomma) e può essere utilizzata per la produzione industriale di gomma naturale. Il residuo derivato (bagassa) è un materiale lignocellulosico che può essere valorizzato per la produzione di zuccheri di 2° generazione. In particolare il glucosio può essere utilizzato per la produzione di butandiolo, un building block, per ottenere elastomeri, obiettivo finale del progetto in esame. Nel merito di questo rapporto, il residuo lignocellulosico del guayule è stato caratterizzato e sottoposto ad un pretrattamento microbiologico con l'impiego di due ceppi di funghi Basidiomiceti ligninolitici, agenti della "carie bianca del legno" del tipo "WRF" e appartenenti alle specie *Pleurotus ostreatus* e *Fomitiporia mediterranea*. Essi sono stati selezionati in laboratorio per le loro prestazioni di crescita e utilizzati per pretrattare la bagassa di guayule. Dopo il pretrattamento è stata eseguita l'idrolisi enzimatica della cellulosa per l'ottenimento di un brodo zuccherino e di un residuo insolubile a base ligninica. Lo studio ha previsto sia una fase preliminare di ottimizzazione, consistita nel variare la durata del pretrattamento biologico (4-12 giorni) ed il dosaggio enzimatico, sia l'esecuzione di prove rappresentative su idonei quantitativi di bagassa con lo scopo di valutare i rendimenti in zuccheri fermentabili e i relativi flussi di massa. I risultati ottenuti, anche se richiedono un ulteriore approfondimento, hanno permesso di ottenere una preliminare valutazione dell'efficacia di questo tipo di pretrattamento, che ha riguardato una biomassa residuale particolarmente recalcitrante, come la bagassa del guayule, per la produzione di zuccheri di 2° generazione. Le attività sono state svolte in collaborazione con l'Università di Bari.

**Parole chiave:** Bioraffineria; *Fomitiporia mediterranea*; Funghi del marciume bianco; Guayule; *Pleurotus ostreatus*.

## Abstract

*The biodegradation pretreatment of guayule bagasse by White Rot Fungi (WRF) using two lignin-lytic strains belonging to the *Pleurotus ostreatus* and *Fomitiporia mediterranea* species (Basidiomycotina) was studied under in vitro conditions for assessing the released 2<sup>nd</sup>-generation fermentable sugars suitable for producing bio-elastomers into "ALBE" Project (partnership among ENEA and VERSALIS). Guayule bagasse is an important and recalcitrant lignin-cellulosic co-product obtained from guayule crop, an alternative plant to caucciù tree for the industrial production of rubber, after industrial extraction of rubber and resin. In this research work were: 1) selected two strains of *Pleurotus ostreatus* and *Fomitiporia mediterranea* provided by the collection of University of Bari under laboratory condition on the basis of their growth performances; 2) analyzed guayule bagasse samples after resin extraction; 3) optimized the parameters of the biodegradation process by using liquid cultures under rotary shaking; 4) performed the releasing of fermentable sugars from guayule bagasse. The determination of glucose and other minor secondary metabolites were carried out by analytical standard methods after hydrolysis enzymatic of the crude cultural filtrates of each fungus. The results showed that the released sugars from guayule bagasse by biodegradation with WRF was significantly increased if compared to control, nevertheless more researches of this topic are needed.*

**Keywords:** Biorefinery; *Fomitiporia mediterranea*; Guayule; *Pleurotus ostreatus*; White-rot fungi.



<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>7</b>
1.1 IL PROGETTO “ALBE” .....	7
1.2 BIODEGRADAZIONE DELLE BIOMASSE CON I “WHITE ROT FUNGI (WRF)” .....	8
<b>2. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....</b>	<b>12</b>
<b>3. METODOLOGIA SPERIMENTALE.....</b>	<b>12</b>
3.1 SELEZIONE DI DUE CEPPI DI WRF .....	12
3.1.1 <i>Selezione di F. mediterranea</i> .....	12
3.1.2 <i>Selezione di P. ostreatus</i> .....	14
3.2 PRETRATTAMENTO DELLA BAGASSA IN COLTURE LIQUIDE AGITATE INOCULATE CON I CEPPI DI WRF .....	17
3.2.1 <i>Caratterizzazione della bagassa di guayule</i> .....	17
3.2.2 <i>Preparazione dell'inoculo</i> .....	19
3.2.3 <i>Crescita in colture liquide agitate</i> .....	20
3.2.4 <i>Idrolisi enzimatica</i> .....	23
3.2.5 <i>Determinazione degli zuccheri e di metaboliti minori</i> .....	23
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>24</b>
4.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO .....	24
4.2 PROVE A PROCESSO OTTIMIZZATO E BILANCIO DI MASSA .....	29
4.2.1 <i>Analisi del bilancio di massa</i> .....	30
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>35</b>
<b>APPENDICE: ATTIVITÀ SUPPLEMENTARE.....</b>	<b>38</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>38</b>
<b>METODOLOGIA SPERIMENTALE.....</b>	<b>38</b>
PREPARAZIONE DELL'INOCULO .....	38
BIODEGRADAZIONE DELLA BAGASSA DI GUAYULE.....	40
IDROLISI ENZIMATICA .....	42
DETERMINAZIONE DEL GLUCOSIO .....	43
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>46</b>



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL PROGETTO “ALBE”

Negli ultimi anni la Comunità Europea sta puntando fortemente allo sviluppo della bioraffineria, cioè a processi chimici e biologici che, partendo dalle biomasse, possono produrre sia vettori energetici (biocombustibili), sia un’ampia gamma di materie prime utili per la chimica industriale che siano totalmente svincolate dall’uso del petrolio. Cercando di puntare sullo sviluppo della cosiddetta “chimica verde”, nasce l’idea di sfruttare la bagassa della pianta di guayule, alternativa a quella del caucciù per la produzione della gomma.

In questo quadro si contestualizza il Progetto ALBE acronimo di ALternative Biomass for Elastomers, coordinato da Versalis (ENI), il cui obiettivo è la produzione di elastomeri sintetici (SE) e gomma naturale (NR) per pneumatici e altri beni, a partire per l’appunto dalla pianta di guayule. Il progetto di ricerca, appartenente al Cluster Tecnologico Nazionale Chimica Verde, si allinea con gli obiettivi di Horizon 2020, e propone lo sviluppo d’impianti pilota dimostrativi grazie ad un forte Partenariato Pubblico Privato (PPP). Il consorzio realizzato per l’esecuzione delle attività progettuali vede coinvolti i seguenti partner:

- Versalis - Compagnia petrolchimica controllata da ENI spa (5800 impiegati), Mantova;
- Novamont - Compagnia di Novara, con radici Montedison, che combina chimica, agricoltura e ambiente;
- Marangoni - Produttori di gomme e di tecnologie annesse (Trentino);
- Comet – Azienda esperta nella formulazione di gomme (Adrara SM – Bergamo);
- UNIBO-3 Università di Bologna coinvolgente i seguenti gruppi: biotecnologie ambientali, processi catalitici, scienze agroambientali;
- UNISS – Dipartimento di Chimica (sintesi e caratterizzazione dei polimeri);
- POLIMI – Dipartimento di Chimica, materiali e ingegneria chimica (Produzione di nuovi elastomeri);
- ENEA- Dipartimento Tecnologie Energetiche, Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde.

Il progetto è suddiviso in 3 macro obiettivi realizzativi (OR), ognuno avente una specifica finalità:

- OR1: Mettere a punto una nuova tecnologia per la produzione di butadiene a partire da fonti rinnovabili;
- OR2: Eseguire la coltivazione sperimentale del guayule (sud Italia) con realizzazione di un protocollo e sviluppare nuove tecnologie di estrazione della gomma;
- OR3: Sviluppare formule speciali per la produzione di pneumatici con ES e NR (legato all'impianto Porto Torres).

All'interno dei macro obiettivi, il progetto prevede lo sfruttamento del residuo lignocellulosico della pianta di guayule, ottenuto a valle dell'estrazione della gomma naturale. In questa specifica attività entrano in gioco le competenze e la decennale esperienza ENEA, il cui ruolo riguarda lo studio di pretrattamenti e la produzione di zuccheri dalla Bagassa. Infatti, il glucosio ottenibile dalla cellulosa presente nella bagassa costituisce la materia prima fondamentale che, nei processi di fermentazione, permette di ottenere l'1,3-butandiolo, precursore dei mattoni di base per la costruzione di elastomeri. Tra i pretrattamenti sperimentati da ENEA, specificatamente sulla bagassa di guayule, oltre alla steam explosion e al trattamento acido, è stato studiato anche il pretrattamento biologico, che riportiamo nel presente rapporto, e che è stato realizzato grazie all'impiego di funghi ligninolitici come *Fomitiporia* e *Pleurotus*.

In particolare il *Pleurotus* sta riscontrando un crescente interesse biotecnologico legato sia alla sua elevata capacità naturale di degradare residui lignocellulosici ricalcitranti come la bagassa di guayule, sia per la produzione di metaboliti secondari, enzimi e proteine che risultino interessanti per applicazioni farmaceutiche e di nutraceutica funzionale. Il fungo deve questo suo straordinario successo alla sua capacità di produrre un'ampia gamma di enzimi esocellulari capaci di degradare un complesso di substrati lignocellulosici in sostanze solubili che possono essere usate come nutrienti sia dallo stesso *Pleurotus*, sia da altri funghi che agiscono sinergicamente con esso costituendo dei veri e propri "consorzi fungini".

## 1.2 BIODEGRADAZIONE DELLE BIOMASSE CON I "WHITE ROT FUNGI (WRF)"

Negli ecosistemi forestali la degradazione del materiale lignocellulosico è realizzata principalmente da funghi lignino-cellulolitici generalmente appartenenti al gruppo dei basidiomiceti, denominati "White-Rot Fungi" (WRF), cioè agenti di carie bianca, che utilizzano la lignina come fonte di carbonio e di energia. Noti, appunto, in letteratura come

agenti della "carie bianca del legno" i WRF sono responsabili di alterazioni del legno morto o deperiente poiché lo colonizzano decomponendo preferenzialmente la lignina rispetto alla cellulosa. La degradazione avviene grazie alla produzione di un corredo di enzimi extracellulari con una bassa affinità di substrato (laccasi, cellulasi, xylanasi, manganese-perossidasi e lignina-perossidasi). L'attacco fungino operato da due di essi, come *Pleurotus ostreatus* e *Fomitiporia mediterranea* (Fig. 1), è una fase indispensabile della degradazione lignocellulosica che contribuisce al riciclo naturale della sostanza organica indecomposta nel suolo.



**Figura 1:** *Pleurotus ostreatus* (a sinistra) e *Fomitiporia mediterranea* (a destra) come si presentano nelle loro forme native grazie alle quali operano la naturale biodegradazione della biomassa lignocellulosica negli ecosistemi forestali nell'ambito del riciclo naturale della sostanza organica del suolo.

La lignina è un polimero aromatico recalcitrante che può essere ossidato e idrolizzato da un corredo enzimatico extracellulare ossidativo ed idrolitico costituito principalmente da laccasi, cellulasi, xylanasi, manganese-perossidasi e lignina-perossidasi. Questi enzimi catalizzano l'ossidazione della lignina producendo radicali aromatici. I WRF, essendo produttori di tale corredo (Ntougias et al., 2012; Wariishi et al., 1991), sono stati studiati nelle bioraffinerie per il loro valore aggiunto in operazioni di "bio-pulping", sbiancamento ed altri processi di rimozione della lignina (Zabel e Morrell, 1992). I WFR possono essere facilmente coltivati in bioraffinerie su diversi materiali lignocellulosici grezzi (Kurt e Buyukalaca, 2010; Isikhuemhen et al., 2000). Alcuni WRF hanno proprietà destrutturanti selettive del legno, poiché degradano preferenzialmente la lignina rispetto alla cellulosa (Salmones et al., 2005). Molti lavori documentano delle diverse applicazioni dei WRF nella

biodegradazione di residui vegetali per migliorarne l'attitudine alla saccharificazione di biomasse lignocellulosiche recalcitranti (Akin et al., 1995; Chen et al., 1995; Karunanandaa et al., 1995; Koutrotsios et al., 2014; Isikhuemhen et al., 2012; Sun e Cheng, 2002; Ohgren et al., 2007).

Le rese in zuccheri fermentabili da emicellulosa e cellulosa sono parametri critici per un processo di produzione industriale economicamente fattibile dedicato alla produzione di etanolo e di altri prodotti "bio-based", per cui la parziale biodegradazione della biomassa pretrattata con WRF aumenta il rendimento complessivo in zuccheri. Anche i polisaccaridi extracellulari o esopolisaccaridi (EPS) dei WRF svolgono un ruolo importante nel processo di degradazione (Gutiérrez et al., 1995) perché possono immobilizzare gli enzimi extracellulari migliorandone l'azione ossidativa e/o idrolitica. Il gel formato da questi biopolimeri previene la disidratazione ifale, permette l'adesione cellulare ad altre cellule o superfici e potrebbe eventualmente selezionare molecole che hanno influenza positiva sul degrado ambientale (Catley, 1992).

I WRF sono tra i microrganismi maggiormente attivi nella degradazione della lignina. Questa classe di funghi presenta alcune proprietà di notevole interesse:

- sono estremamente efficienti nei confronti dei substrati da trasformare e sono in grado di crescere e riprodursi in loro presenza;
- sono relativamente resistenti alla competizione rappresentata da altri microrganismi;
- adattano il proprio metabolismo alla composizione del substrato da cui ricavano energia;
- non essendo patogeni per l'uomo ed essendosi evoluti in ecosistemi forestali, la loro manipolazione non costituisce fonte di pericolo né per la salute umana e né per l'ambiente.

Data la loro capacità di degradare la lignina e le strutture polisaccaridiche che formano la cellulosa ed emicellulosa, i *Pleurotus* spp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta* e *Bjerkandera adusta* possiedono il potenziale non solo di agire come un pretrattamento biologico ma anche di degradare tutti i maggiori componenti della lignocellulosa per ottenere un prodotto utile attraverso un complesso di enzimi idrolitici. Lo scopo della degradazione della lignina da parte dei WRF è di consentire un accesso migliore alle componenti di cellulosa ed emicellulosa che costituiscono la fonte di nutrienti per il microrganismo. Il sistema enzimatico usato dai microrganismi per decomporre composti organici è prevalentemente di tipo ossidativo. Gli enzimi esocellulari

caratteristici del *P. ostreatus* sono le polifenolossidasi, considerate soprattutto in riferimento alla degradazione della lignina. Questi enzimi sono responsabili dell'attacco primario a composti lignocellulosici, preparando migliori condizioni (monomeri fenolici e cellulosa resa disponibile) per la crescita del microrganismo stesso o di altri che successivamente colonizzano lo stesso substrato.

*P. ostreatus* è un attivo degradatore di lignina e saprofita, in altre parole capace di crescere e vivere a spese di materiale lignocellulosico proveniente da alcune porzioni vegetali oltre che di scarti agroalimentari. La difficile biodegradabilità della lignina rispetto alla maggior parte delle altre molecole biologiche dipende dalla sua fitta trama molecolare che ostacola l'ingresso delle grosse molecole enzimatiche, e dal fatto che tale polimero si forma per poliaddizione di alcuni componenti. I microrganismi dovendo solubilizzare, per poi assimilare, macromolecole essenzialmente insolubili, producono e secernono all'esterno dalle loro ife, alcune classi di enzimi esocellulari che gradualmente attaccano e demoliscono (per ossidazione nel caso della lignina, per idrolisi invece nel caso di cellulosa ed emicellulose) i costituenti macromolecolari del materiale lignocellulosico. Le piccole molecole solubili secrete attraverso i pori della parete cellulare, vengono poi assorbite dalle stesse ife e utilizzate come nutrienti. La demolizione della lignina è piuttosto complessa, e vari enzimi e meccanismi chimici devono cooperare per la completa degradazione e solubilizzazione di questa sostanza.

La produzione industriale di zuccheri di 2° generazione (glucosio, xilosio, arabinosio, lattosio, saccarosio, fruttosio, ecc.) derivati da fonti residuali di biomassa vegetale richiede spesso costosi pretrattamenti chimico-fisici del materiale di origine per degradare la lignina e rilasciare fibrille di cellulosa, oligomeri e monomeri. Per queste ragioni, la conversione di materia lignocellulosica in zuccheri fermentescibili senza il contributo biodegradativo operato dai WRF rappresenta un punto-chiave che spesso limita l'efficienza dei tradizionali processi di pretrattamento di steam explosion, idrolisi acida, ecc. (Wyman et al., 2005).

## 2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Nel progetto ALBE, gli zuccheri di 2° generazione C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub> rappresentano la materia prima per la produzione di 1,3-butandiolo (BDO) in un approccio integrato di bioraffineria. In questo progetto si è scelto di impiegare alcuni ceppi selezionati di WRF per il pretrattamento di bagassa di guayule al fine di ottenere substrati da cui estrarre con maggiore efficienza gli zuccheri. Allo scopo è stata scelta una bagassa parzialmente privata della resina da sottoporre a un pretrattamento microbiologico con WRF. Obiettivo dello studio è stata la messa a punto di un protocollo di pretrattamento semplice ed economico con lo scopo di ottenere dalla bagassa di guayule brodi zuccherini idonei alla produzione di BDO.

L'attività svolta in questa parte del Progetto ha previsto una fase preliminare riguardante la selezione dei ceppi fungini e l'ottimizzazione dei parametri sperimentali, come la durata del pretrattamento (da 4 a 12 giorni) e il dosaggio enzimatico a valle del pretrattamento fungino (da 4 a 20%); è seguita quindi una fase di prove rappresentative a parametri ottimizzati per una valutazione del rendimento complessivo attraverso un bilancio di massa.

## 3. METODOLOGIA SPERIMENTALE

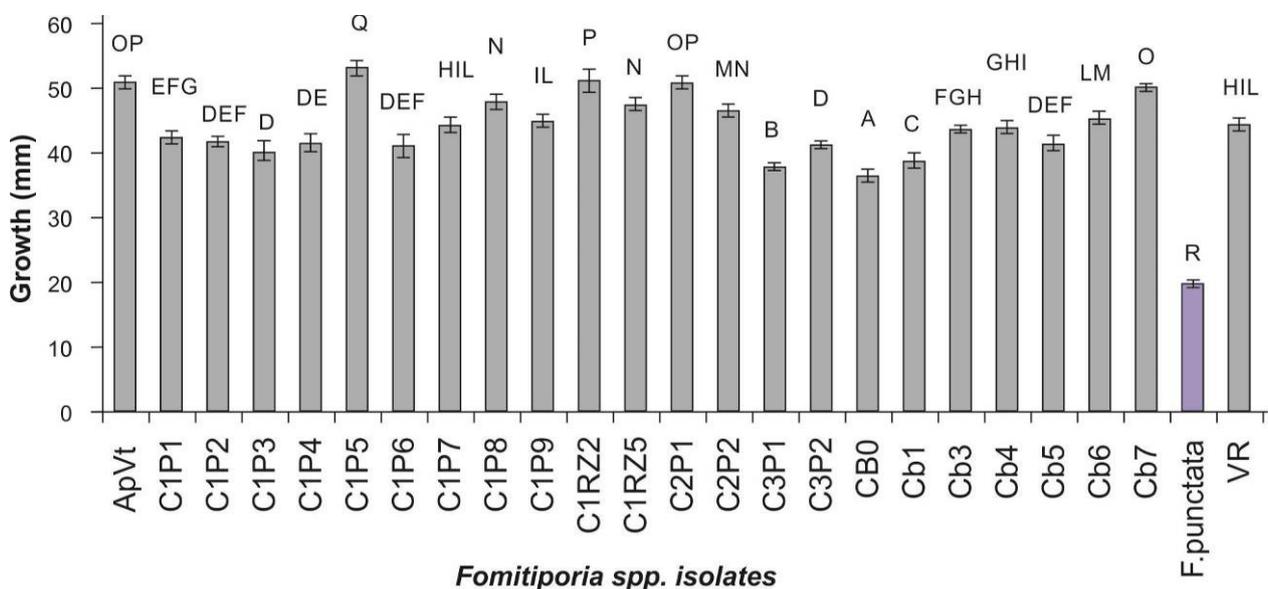
### 3.1 SELEZIONE DI DUE CEPPI DI WRF

Sono stati utilizzati un isolato di *Pleurotus ostreatus* (Gr1035) ed uno di *Fomitiporia mediterranea* (C1P5) selezionati all'interno di una collezione di isolati messi a disposizione dal Dipartimento DISSPA dell'Università degli Studi "A. Moro" di Bari.

#### 3.1.1 Selezione di *F. mediterranea*

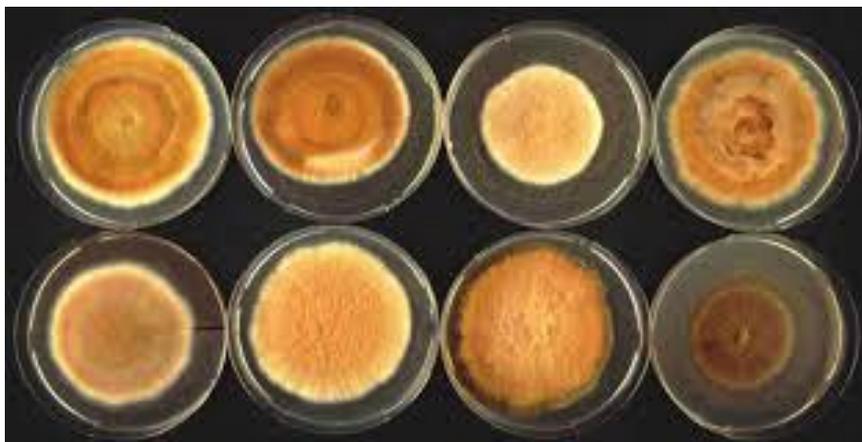
Ventiquattro isolati di *F. mediterranea* e uno di *F. punctata* sono stati valutati per la loro crescita in vitro in piastre "Petri" da 10 cm (Fig. 2). L'inoculo è stato coltivato su un terreno solido di crescita MYE (Oxoid) composto da agar 2%, estratto di malto 2% ed estratto di lievito 0,05%. La coltivazione del micelio fungino è stata eseguita in 25 ml di

terreno sterilizzato a 121 °C per 20 minuti. Cinque piastre replicate per ogni isolato sono state inoculate con 2 dischi di agar di 3 mm contenenti micelio attivo cresciuto per 5 giorni a 30 °C al buio (Pilotti et al., 2005). Le piastre inoculate con *F. mediterranea* sono state mantenute per 8 giorni a queste condizioni e, dopo l'incubazione, il diametro di ogni colonia è stato misurato nelle due direzioni ortogonali. Le dimensioni medie dei diametri (in mm) sono state poi confrontate con l'analisi della varianza ad una via usando lo schema sperimentale a blocchi completamente randomizzati (one-way ANOVA analysis) mediante il "multiple range test di Student-Newman-Keuls" con una probabilità  $p=0.01$  (Fig. 2).



**Figura 2:** Piastre contenenti 2 colonie di *F. mediterranea* per piastra appartenenti a 4 isolati cresciuti per 8 giorni a 30 °C al buio su MYE (in alto). Confronto statistico della crescita in piastra di 24 isolati di *F. mediterranea* ed 1 di *F. punctata* (controllo) usando il "multiple range test di Student-Newman-Keuls" adottando una probabilità  $p=0.01$ : isolati contrassegnati con la stessa lettera non sono significativamente diversi fra loro (in basso).

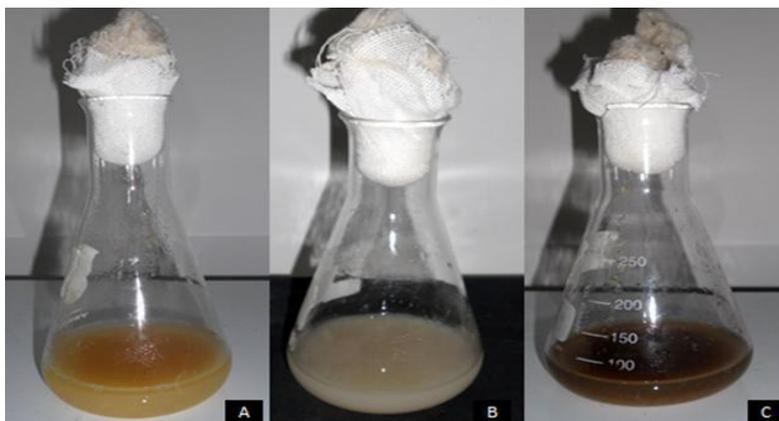
Questo dato è servito a stabilire il ceppo più performante per i nostri scopi di progetto, poiché la crescita in piastra e la capacità lignino-cellulolitica degli isolati sono fra loro significativamente e positivamente correlati (Pilotti et al., 2010). L'analisi statistica ha quindi permesso di valutare le differenze di crescita in piastra dei 24 isolati saggiati e di scegliere il ceppo C1P5 come il più performante per gli obiettivi di questo studio (Fig. 3).



**Figura 3:** Colonie morfologicamente diverse dello stesso isolato C1P5 di *F. mediterranea* come si presentano in coltura pura.

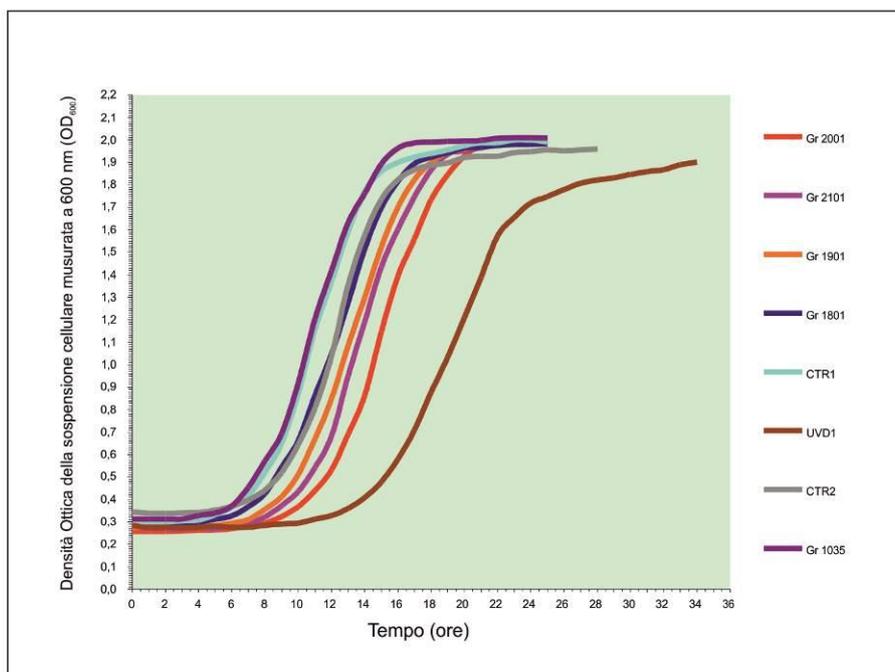
### 3.1.2 Selezione di *P. ostreatus*

Otto isolati di *P. ostreatus* sono stati confrontati per le loro “performance” di crescita *in vitro* in beute “Erlenmeyer” da 250 ml. L'inoculo è stato coltivato in un terreno liquido di crescita composto da glucosio ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,8 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $0,4 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ), ed estratto di lievito ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) tamponato a pH 6.0. I microelementi seguenti sono stati aggiunti:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ). La coltivazione dei miceli fungini è stata eseguita in 50 ml di terreno sterilizzato a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  per 15 minuti. Cinque beute replicate per ogni isolato sono state ognuna inoculate con 3 g di micelio attivo cresciuto per 7 giorni su cubetti di agar di 5 cm di lato. Le beute inoculate con *P. ostreatus* sono state mantenute sotto agitazione (150 rpm) a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  per 12 giorni (Fig. 4).



**Figura 4:** Beute contenenti sospensioni miceliche di *P. ostreatus* appartenenti a 3 isolati diversi cresciuti su terreno liquido a 28 °C per 12 giorni sotto agitazione a 150 rpm.

Aliquote di 10 µl di ogni sospensione fungina sono state trasferite sterilmente in micropiastre, e la densità ottica (OD) della sospensione è stata misurata per 36 ore (ad intervalli di 2 ore) con un lettore spettrofotometrico (Mod. Multiscan-Plus MK II, Lab. Systems OY, Helsinki, Finlandia), a una lunghezza d'onda di 600 nm. Questa prova è stata eseguita per stabilire la dinamica di accrescimento di ciascun isolato nelle prime 36 ore di incubazione partendo dall'ipotesi che il ceppo che si accresce più velocemente di tutti gli altri è anche il più idoneo per gli obiettivi di questo progetto (Fig. 5).



**Figura 5:** Curve di crescita di 8 isolati di *P. ostreatus* cresciuti a 28 °C per 36 ore sotto agitazione a 150 rpm.



Questo dato, insieme con quello riguardante la cinetica di accrescimento degli isolati dopo 36 ore, è servito a stabilire il ceppo più performante per i nostri scopi di progetto, essendo entrambi questi parametri significativamente e positivamente correlati con la loro attitudine lignino-cellulolitica (Salmones et al., 2005). L'analisi statistica ha quindi permesso di valutare le differenze di crescita in beuta degli 8 isolati saggiati e di scegliere il ceppo Gr1035 come il più performante per gli obiettivi di questo lavoro (Fig. 7).



**Figura 7:** Colonie dell'isolato Gr1035 di *P. ostreatus* come si presentano in coltura pura.

## **3.2 PRETRATTAMENTO DELLA BAGASSA IN COLTURE LIQUIDE AGITATE INOCULATE CON I CEPPI DI WRF**

### **3.2.1 Caratterizzazione della bagassa di guayule**

La bagassa di guayule da sottoporre a pretrattamento microbiologico è stata fornita da Versalis e proviene dai campi sperimentali "Pantanelli" (Università di Bari). Essa deriva dai rami macinati (impiegando uno *straw chopper* con griglia da  $\frac{3}{4}$  di pollice) e sottoposti a estrazione della resina con alcool etilico. L'estrazione della resina è stata eseguita a più riprese sottoponendo 50 g di biomassa secca con 500 ml di etanolo (96 %) a 40 °C per 3

ore e sotto agitazione a 100 rpm. Il solvente è stato rimosso mediante filtrazione sotto vuoto su filtro di carta (Watman n° 4), mentre il residuo solido (bagassa) è stato seccato in stufa. Prima del trattamento biologico, il materiale è stato macinato con un mulino di laboratorio a coltelli (dotato di setaccio con maglie da 2 mm) e conservato a temperatura ambiente in attesa di essere sottoposto al suddetto pretrattamento (Fig. 8).



**Figura 8:** Campione di bagassa di guayule nativa, privata dalla resina e utilizzata per il pretrattamento microbiologico con i due ceppi di WRF.

La determinazione degli estrattivi è stata eseguita sottoponendo una quantità nota di campione a estrazione in soxhlet per 8 ore. Al termine delle operazioni, è stato recuperato il materiale estratto disciolto nel solvente che è allontanato per evaporazione. Dopo un ulteriore essiccamento a bagnomaria ( $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), il residuo è stato pesato, determinando la percentuale degli estrattivi rispetto al materiale di partenza.

La procedura analitica di caratterizzazione di carboidrati e lignina è stata eseguita mediante il metodo NREL (Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures NREL). Esso consiste nel sottoporre la biomassa (0.3 g) a idrolisi acida in due step: il primo usando acido solforico concentrato (3 cc di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72 %,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2h), il secondo portando per diluizione la concentrazione acida al 4 % e riscaldando la sospensione in autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1 bar) per 1 h. Alla fine del trattamento si ottiene una soluzione contenente i carboidrati solubili (derivati dall'idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa) ed

un residuo insolubile rappresentato praticamente da lignina. La lignina è stata essiccata e pesata, per essere rapportata al campione di partenza, mentre gli zuccheri in soluzione sono stati determinati mediante cromatografia ionica (HPIC, DIONEX modello DX300), utilizzando come colonna una Carbo-pack pA1, come eluente una soluzione di NaOH a gradiente di concentrazione (2-200 mM), e come rilevatore un PED (di tipo elettrochimico ad amperometria pulsata).

Le ceneri, espresse come percentuale rispetto al campione secco di partenza, sono determinate in seguito a lenta combustione della biomassa a 600 °C (Mod. AOAC 7.009, Ash; ASTM D1102).

La composizione della bagassa di guayule è riportata nella tabella 2.

**Tabella 2:** Composizione percentuale della bagassa di guayule da sottoporre a pretrattamento microbiologico con i due ceppi di WRF.

<b>Costituente</b>	<b>% w/w</b>
Estrattivi (resine, gomme, cere)	7,2
Ceneri	4,92
Residuo acido insolubile (lignina)	31,7
$\beta$ -glucani (cellulosa)	18,0
Xilano	11,6
Arabinano	5,5
Galattano	1,5
Nd*	19,6

\*materiale non identificato

### 3.2.2 Preparazione dell'inoculo

#### Ceppo Gr1035 di *P. ostreatus*

L'inoculo del ceppo Gr1035 di *P. ostreatus* è stato preparato in beute "Erlenmeyer" da 250 ml in un terreno liquido di crescita composto da glucosio (10 g l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8 g l<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (2 g l<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,4 g l<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g l<sup>-1</sup>), ed estratto di lievito (2 g l<sup>-1</sup>) tamponato a pH 6.0. I microelementi seguenti sono stati aggiunti: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 mg l<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5 mg l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (60 mg l<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5 mg l<sup>-1</sup>) e MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (5 mg l<sup>-1</sup>). La coltivazione dei miceli è stata effettuata in 50 ml di terreno sterilizzato a 121 °C

per 15 minuti. Cinque beute replicate sono state ognuna inoculate con 3 g di micelio attivo cresciuto per 7 giorni su cubetti di agar di 5 mm. Le beute inoculate con *P. ostreatus* sono state mantenute sotto agitazione (150 rpm) a 28 °C al buio per 12 giorni.

#### Ceppo C1P5 di *F. mediterranea*

L'inoculo del ceppo C1P5 di *F. mediterranea* è stato preparato in piastre "Petri" da 10 cm su un terreno solido di crescita MYE (Oxoid, UK) composto da agar 2%, estratto di malto 2% ed estratto di lievito 0,05%. La coltivazione dei miceli è stata eseguita in 25 ml di MYE sterilizzato a 121 °C per 20 minuti. Cinque piastre replicate sono state ognuna inoculate con 2 dischi di agar di 3 mm contenenti micelio attivo cresciuto per 5 giorni. Le piastre inoculate con *F. mediterranea* sono state mantenute a 30 °C al buio per 7 giorni.

### **3.2.3 Crescita in colture liquide agitate**

La biodegradazione della bagassa è stata eseguita tramite allestimento di colture liquide agitate in beute Erlenmeyer da 50 ml contenenti ciascuna 1 g di bagassa essiccata miscelata con 20 ml di acqua distillata (nel rapporto 1:20 peso/volume) e poi sterilizzate a 121 °C per 20 min. Ogni beuta contenente la sospensione sterilizzata di bagassa è stata inoculata con 2 ml di coltura madre del ceppo Gr1035 di *P. ostreatus* (contenente da 20 a 40 mg di peso secco di micelio) o con 2 tasselli di agar del diametro di 0,5 cm completamente colonizzati dal ceppo C1P5 di *F. mediterranea*.

Il set di prove ha incluso beute di controllo contenenti 1 g di bagassa miscelata con 20 ml di acqua distillata (rapporto 1:20) e poi sterilizzate a 121 °C per 20 min., a cui sono stati aggiunti 2 ml di terreno liquido di crescita sterile o 2 tasselli di agar sterile, rispettivamente per i due controlli Gr1035 e C1P5. Ogni beuta è stata replicata 3 volte. Le beute sono state poste in un incubatore orbitale rotante (150 rpm) e mantenute a 28 °C al buio per 4, 8 e 12 giorni (Fig. 9).



**Figura 9:** Allestimento delle colture liquide agitate in beuta dei ceppi Gr1035 di *P. ostreatus* e C1P5 di *F. mediterranea*.

Il contenuto di ogni beuta replicata (inclusi i due controlli) è stato riunito in un'unica boccetta da 100 ml a fine incubazione (dopo 4, 8 e 12 giorni). Al brodo colturale di ogni boccetta (contenente circa 60 ml di brodo in totale) sono stati aggiunti 40 ml di sodio tampone acetato (100 mM, pH 5.0) nel rapporto 3:2 (volume/volume) e 500 mg di un flocculante enologico commerciale a base di caseina in polvere. La coltura è stata agitata energicamente e poi mantenuta a 4 °C "overnight" sia per far sedimentare i solidi insolubili e sia per far flocculare i miceli nel surnatante (cespituli miceliari) considerato il differente peso specifico. Il surnatante di ogni boccetta è stato tutto recuperato, filtrato su carta Whatman per separarne i cespituli dal brodo colturale, e poi riunito con il materiale solido insolubile per ricostituire il brodo colturale privato dai miceli. Le boccette di controllo sono state invece mantenute solo per 12 giorni sotto incubazione agitata e non sono state sottoposte al trattamento di separazione del micelio.

I filtrati colturali grezzi (Tabella 3 e Fig. 10) e quelli di controllo sono stati successivamente sottoposti a idrolisi enzimatica per la produzione di glucosio.

**Tabella 3:** Schema riassuntivo degli esperimenti condotti e dei campioni ottenuti.

<i>Set di esperimenti</i>	<i>Campioni analizzati</i>		
Trattamento con <i>Pleurotus ostreatus</i> (ceppo selezionato Gr1035)	Prelievo dopo 4 giorni (4-Gr1035)	Prelievo dopo 8 giorni (8-Gr1035)	Prelievo dopo 12 giorni (12-Gr1035)
Trattamento con <i>Fomitiporia mediterranea</i> (ceppo selezionato C1P5)	Prelievo dopo 4 giorni (4-C1P5)	Prelievo dopo 8 giorni (8-C1P5)	Prelievo dopo 12 giorni (12-C1P5)
Controllo per il ceppo Gr1035	//////	//////	Prelievo dopo 12 giorni (Gr1035-Co)
Controllo per il ceppo C1P5	//////	//////	Prelievo dopo 12 giorni (C1P5-Co)



**Figura 10:** Campioni di bagassa di guayule pretrattata con i due ceppi di WRF.

### 3.2.4 Idrolisi enzimatica

Le condizioni operative per l'idrolisi enzimatica sono quelle già adottate nelle operazioni in precedenza studiate dal Laboratorio DTE-BBC-BIC, ed esattamente: pH 5, temperatura di 50 °C, 3 giorni sotto agitazione su piastra orbitante a 150 rpm. Gli enzimi utilizzati sono un mix di cellulasi ed endoglucanasi commerciali denominati Ctec2 (©Novozymes, Sigma-Aldrich). Il contenuto proteico del Ctec2 è stato determinato mediante il saggio "Bradford", ottenendo una quantità di proteina pari a 73 mg/ml (densità del preparato commerciale 1,21 g/l).

Nel caso specifico, avendo già utilizzato una soluzione tampone a pH 5 per flocculare i miceli, è bastato aggiungere il dosaggio desiderato di enzima e sottoporre le bottiglie in incubatore alle condizioni già definite. Il dosaggio enzimatico è stato variato dal 4 al 30 % in peso rispetto alla biomassa solida sospesa. Alla fine del periodo di idrolisi sono stati prelevati dei campioni di soluzione e determinata la concentrazione di glucosio ottenuto.

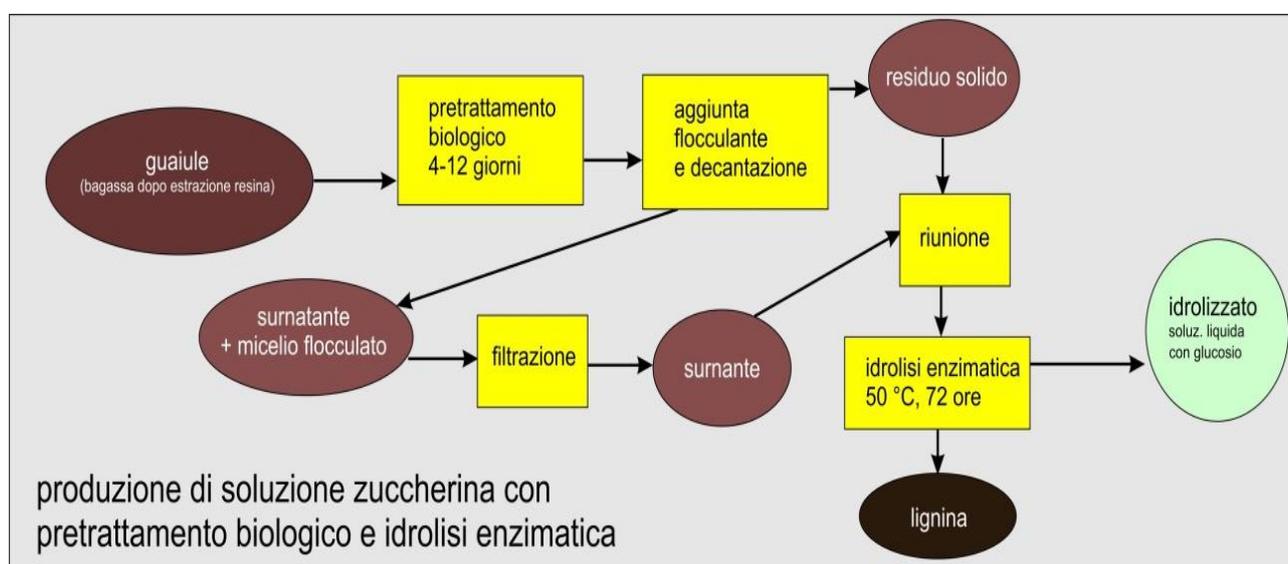
### 3.2.5 Determinazione degli zuccheri e di metaboliti minori

Il glucosio, lo xilosio e alcuni metaboliti minori prodotti (acido lattico ed etanolo) sono stati determinati prelevando dei campioni liquidi dal brodo di coltura (1 ml circa). La soluzione è stata filtrata su microfiltri a membrana (45 µm) e opportunamente diluita per far rientrare gli analiti nel *range* di calibrazione realizzato con standard a concentrazione nota. Il campione è stato quindi analizzato mediante cromatografo HPIC DIONEX, equipaggiato con colonna Nucleogel OA40, eluente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, e con rivelatore a indice di rifrazione. Il campo di validità delle determinazioni risiede all'interno di un intervallo di concentrazione 50-900 ppm, in cui è stata accertata la linearità di risposta del rivelatore.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO

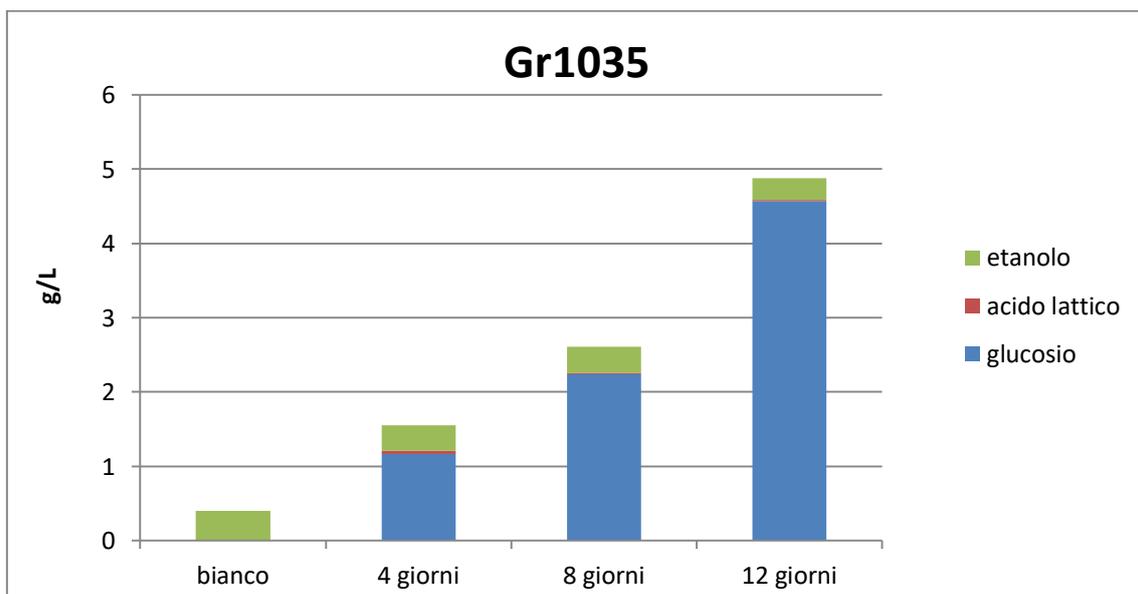
In figura 11 è riportato lo schema della procedura operativa adottata. Si è partiti dal pretrattamento biologico con i funghi ligninolitici della bagassa di guayule, quindi sono state eseguite operazioni di separazione del fungo attraverso l'aggiunta di flocculanti e filtrazione, infine è stata eseguita l'idrolisi enzimatica del materiale pretrattato per arrivare alla produzione di una soluzione contenente glucosio e di un residuo insolubile a base di lignina.



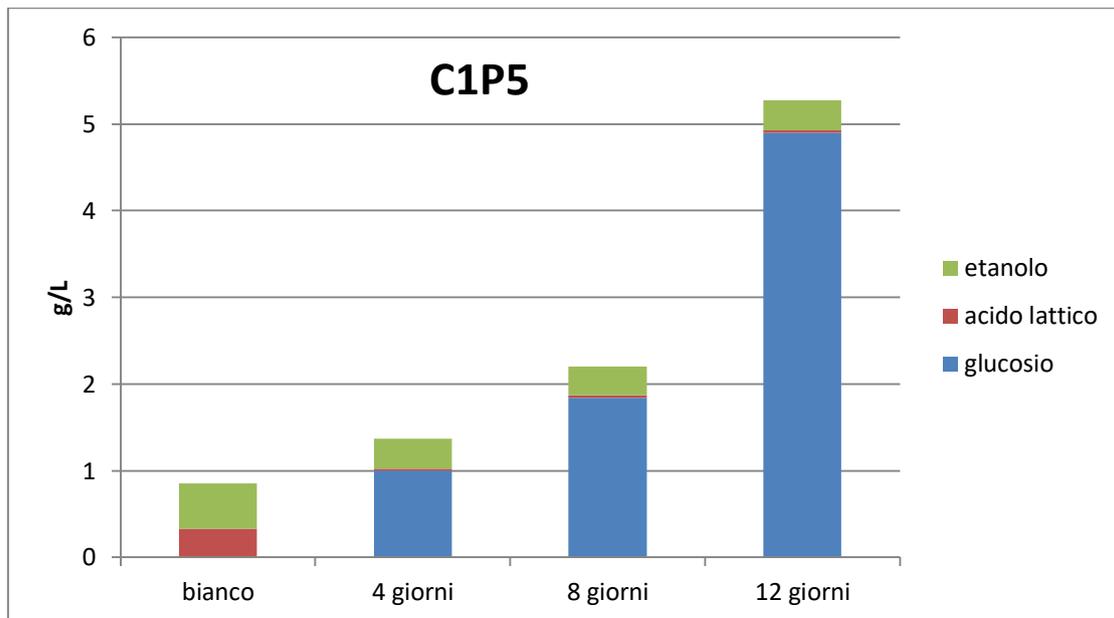
**Figura 11:** Produzione di zuccheri monomerici e lignina da bagassa di guayule con pretrattamento biologico ad opera di funghi ligninolitici e idrolisi enzimatica.

In una prima fase, considerata di ottimizzazione, si è cercato di capire l'efficacia o meno del pretrattamento biologico; in altre parole è stato valutato se il pretrattamento ad opera dei funghi selezionati faciliti la successiva fase di idrolisi enzimatica mirante alla depolimerizzazione della cellulosa in glucosio. I parametri esaminati in questa fase di ottimizzazione sono stati la durata del pretrattamento ad opera dei funghi (variata da 4 a 12 giorni) e il dosaggio enzimatico usato nella successiva fase di idrolisi enzimatica (variato dal 4 al 20 %).

Prima dell'idrolisi enzimatica, eseguita mediante l'aggiunta di enzimi commerciali (Ctec2), sono state analizzate le soluzioni ottenute dopo il trattamento fungino a differente durata, cioè a 4, 8 e 12 giorni. Le analisi sono consistite nel determinare la concentrazione di glucosio e altri metaboliti come ad esempio etanolo e acido lattico. I risultati sono riportati in figura 12 per il ceppo Gr1035 e in figura 13 per il ceppo C1P5. È interessante osservare come il solo pretrattamento biologico, ad opera dei funghi, porti alla produzione di glucosio libero in soluzione. La presenza di etanolo ed acido lattico è imputabile a lieve contaminazione da parte di microrganismi che hanno, in piccola parte, fermentato gli zuccheri presenti. In entrambi i casi è possibile affermare che la durata del pretrattamento biologico risulti estremamente importante nel portare in soluzione glucosio libero e la condizione migliore è stata quella di prolungare il trattamento fino a 12 giorni, dove la produttività è risultata all'incirca raddoppiata rispetto al trattamento effettuato a 8 giorni. Sebbene nel bianco non siano stati aggiunti i funghi, la piccola quantità di etanolo osservato è da imputare alla fermentazione degli zuccheri presenti nel brodo di coltura o nei cubetti di agar aggiunti alla biomassa sospesa in acqua.

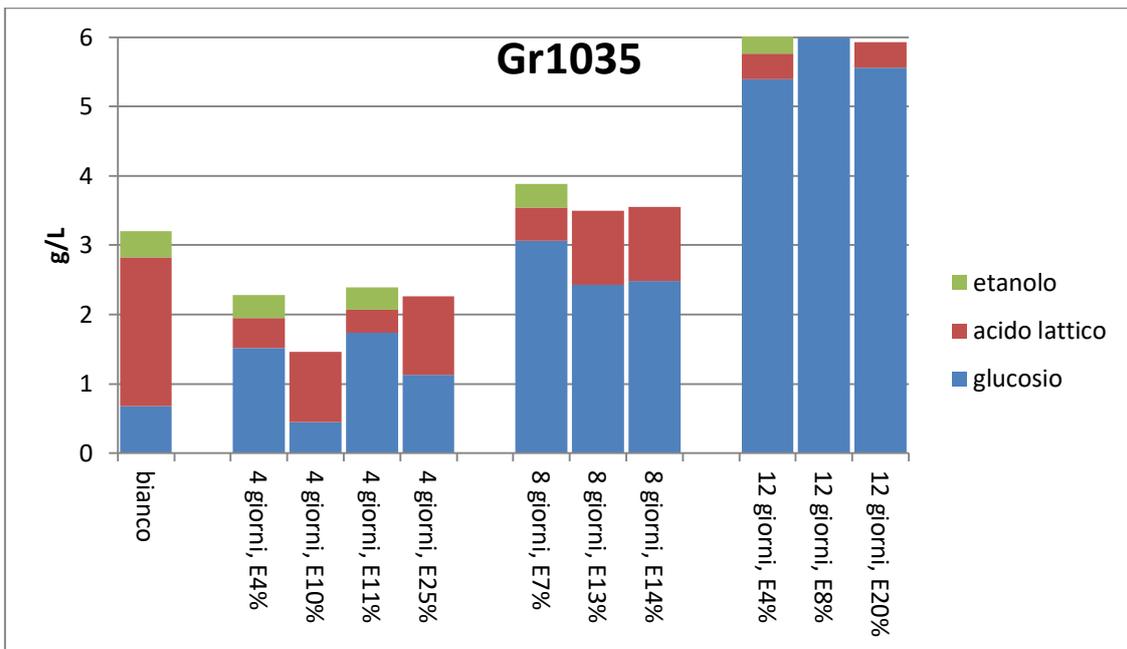


**Figura 12:** Analisi della fase liquida dopo il pretrattamento con il ceppo Gr1035 (*Pleurotus*) a differente durata di incubazione. Nel bianco non è presente il fungo ma solo il terreno di coltura.

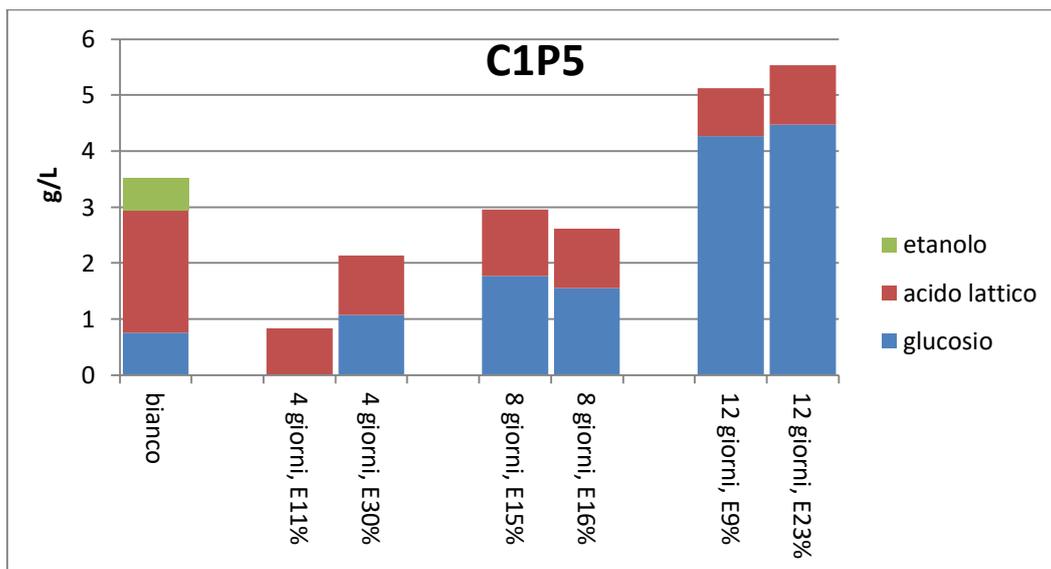


**Figura 13:** Analisi della fase liquida dopo il pretrattamento con il ceppo C1P5 (*Fomitiporia*) a differente durata di incubazione. Nel bianco non è presente il fungo ma solo il terreno di coltura.

L'idrolisi enzimatica è stata eseguita per 72 ore, variando le quantità di enzima per ogni pretrattamento fungino. A valle della saccarificazione, sono state prelevate aliquote di campione liquido ed eseguita l'analisi per la determinazione della concentrazione zuccherina prodotta. I risultati sono mostrati in figura 14 per il ceppo Gr1035 e in figura 15 per il ceppo C1P5. Osservando i dati riguardanti la concentrazione delle sostanze identificate, si osserva che la quantità di glucosio rilevato segue un andamento crescente al crescere della durata del pretrattamento fungino. Nella maggior parte dei casi, si osserva un contenuto significativo di acido lattico, segno della presenza di contaminazioni microbiche che hanno avviato la fermentazione lattica. Lo stesso dicasi per le minori quantità di etanolo osservato. Gli andamenti sono stati molto simili per entrambi i ceppi. La variazione del dosaggio enzimatico non sembra influire molto sulla produzione di glucosio: l'andamento è irregolare, dovuto probabilmente a fluttuazioni casuali, che si annullano nell'ambito dell'errore sperimentale (5-10%).



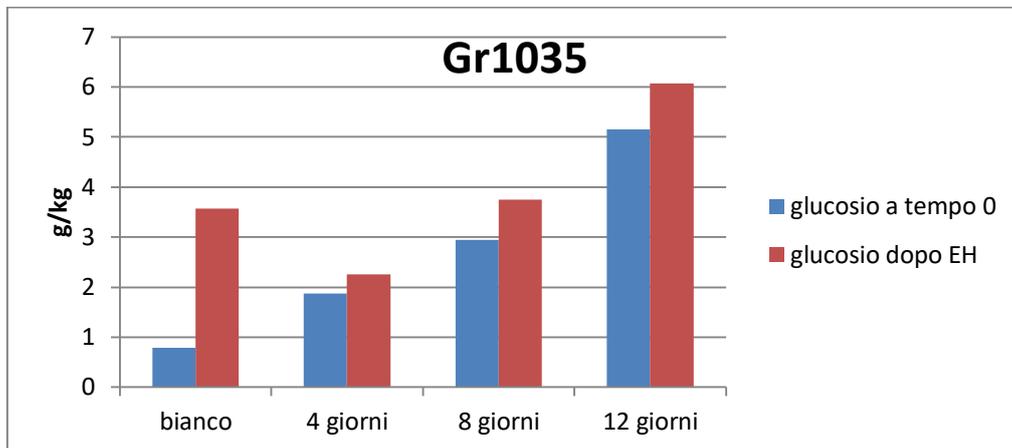
**Figura 14:** Concentrazione degli zuccheri e metaboliti dopo idrolisi enzimatica preceduta da pretrattamento di differente durata con il ceppo Gr1035 (*Pleurotus*).



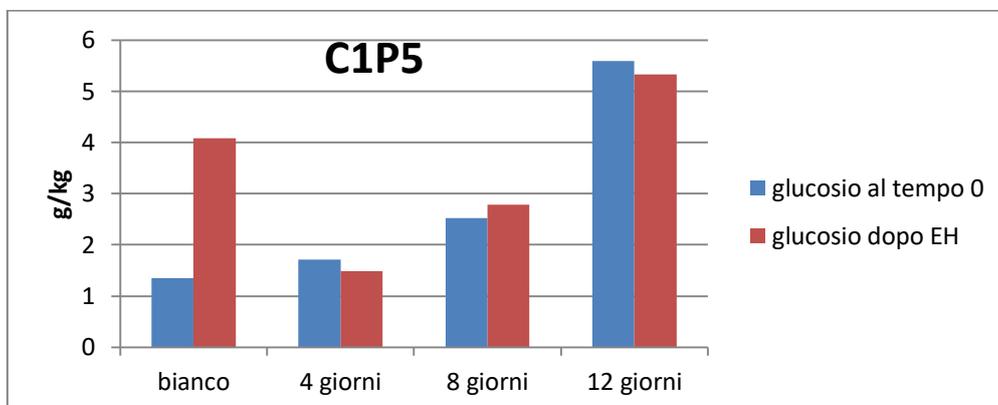
**Figura 15:** Concentrazione degli zuccheri e metaboliti dopo idrolisi enzimatica preceduta da pretrattamento di differente durata con il ceppo C1P5 (*Fomitiporia*).

Di maggiore interesse è sicuramente il confronto tra il glucosio teorico rilevato prima e dopo l'idrolisi enzimatica. Per glucosio teorico intendiamo quello che sarebbe stato rilevato in assenza di contaminazioni microbiche; in pratica acido lattico ed etanolo sono stati convertiti a glucosio equivalente, e sommati al glucosio realmente determinato. Questo valore (concentrazione di glucosio teorico) ci consente di valutare l'efficacia dell'idrolisi

enzimatica a valle del pretrattamento fungino. Quello che si osserva dai grafici a barre di figura 16 e figura 17 è che, nel caso del ceppo Gr1035, si osserva un lieve incremento della produzione zuccherina ad opera delle cellulasi rispetto al solo pretrattamento fungino, mentre nel caso del ceppo C1P5 non sembra esserci un significativo aumento di produzione di glucosio al termine dell'idrolisi enzimatica.



**Figura 16:** Confronto del glucosio teorico prodotto appena dopo il pretrattamento con il ceppo Gr1035 e dopo la successiva idrolisi enzimatica.



**Figura 17:** Confronto del glucosio teorico prodotto appena dopo il pretrattamento con il ceppo C1P5 e dopo la successiva idrolisi enzimatica.

Al termine dell'idrolisi enzimatica, il residuo insolubile (denominato lignina in figura 11) è stato separato dalle fasi liquide, e sottoposto a trattamento acido per la verifica del contenuto residuo di cellulosa. Per entrambi i ceppi, il residuo solido rimanente dopo un pretrattamento di 12 giorni risultava contenere ancora un 20% circa di cellulosa. Da una prima stima è stato calcolato che il glucosio ottenuto in soluzione rappresenta il 25-30%

della cellulosa contenuta nella bagassa di guayule. Il glucosio prodotto, quindi, è in parte di natura esogena, cioè un prodotto metabolico dell'attività fungina.

In ogni caso le prove preliminari svolte fino a questo momento hanno permesso di definire che occorre un tempo minimo di 12 giorni per avere in soluzione un quantitativo di glucosio apprezzabile rispetto ad una prova in bianco, e che nonostante questi lunghi tempi di pretrattamento, la biomassa non risulta significativamente destrutturata da favorire l'idrolisi enzimatica con resa elevata. Sotto quest'aspetto però il ceppo Gr1035 sembra avere avuto maggior efficacia rispetto al ceppo C1P5.

#### **4.2 PROVE A PROCESSO OTTIMIZZATO E BILANCIO DI MASSA**

Come si evince dalle prove di ottimizzazione, le migliori prestazioni da parte dei funghi, in entrambi i casi, sono state ottenute dopo 12 giorni di incubazione. Nell'obiettivo di migliorare il processo, sfruttando al meglio le attività fungine, le prove sono state ripetute allungando ulteriormente i tempi di pretrattamento fino a 17 giorni (scelta arbitraria). In questo caso tutte le precauzioni sono state adottate affinché si potesse ponderare il flusso dei maggiori costituenti, principalmente i carboidrati; il tutto al fine di costruire un bilancio di massa del processo globale, utilizzando sia il *Pleurotus* sia la *Fomitiporia*.

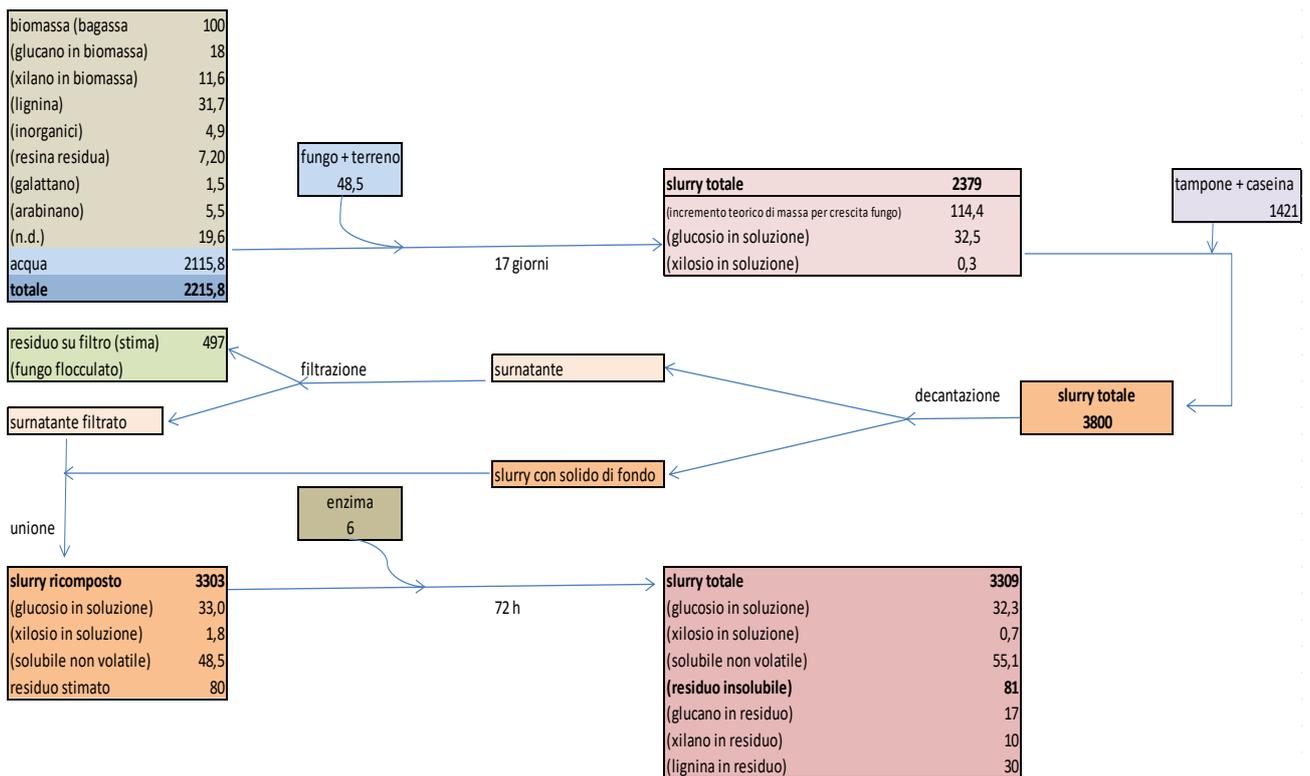
Le prove sono state condotte in maniera analoga a quelle di ottimizzazione lavorando però su quantità maggiore di biomassa. La biomassa secca (DM 95 %) è stata sospesa in acqua realizzando una sospensione del 5% solido/liquido; le quantità usate sono state 5 g di biomassa sospese in circa 100 g di acqua demineralizzata e sono state usate bottiglie con tappo a vite da 250 ml. Alle sospensioni sono state aggiunte le rispettive quantità di inoculi (funghi e relativo terreno di coltura) come riportato nella parte sperimentale della fase di ottimizzazione. Dopo 17 giorni di incubazione è stato eseguito un prelievo della fase liquida, usato per determinare il titolo di glucosio e xilosio prodotto. Alla sospensione è stata aggiunta una soluzione tampone (pH 5) contenente caseina allo scopo di flocculare il fungo per poi separarlo dal brodo. Il fungo flocculato è stato separato per filtrazione del surnatante, per poi ricostituire la fase liquida (filtrata) e la parte solida (biomassa residua) per la successiva fase d'idrolisi enzimatica. Per l'idrolisi enzimatica è stato usato il Ctec2 (Novozymes Bioenergy) utilizzato nelle seguenti condizioni: 6 % wt rispetto alla biomassa secca caricata, 45 °C, 72h, pH 5. Alla fine dell'idrolisi enzimatica, sono state caratterizzate la fase liquida ed il solido residuo di fine processo. Le prove sono state eseguite in doppia

replica e parallelamente sono state eseguite delle prove in bianco per confronto. Le prove in bianco sono state eseguite sia con biomassa senza fungo, sia con fungo senza biomassa. La prima per verificare la produzione di zuccheri per opera dell'idrolisi enzimatica senza pretrattamento fungino, la seconda per verificare un eventuale presenza o produzione di zuccheri ad opera dei funghi senza la presenza della biomassa.

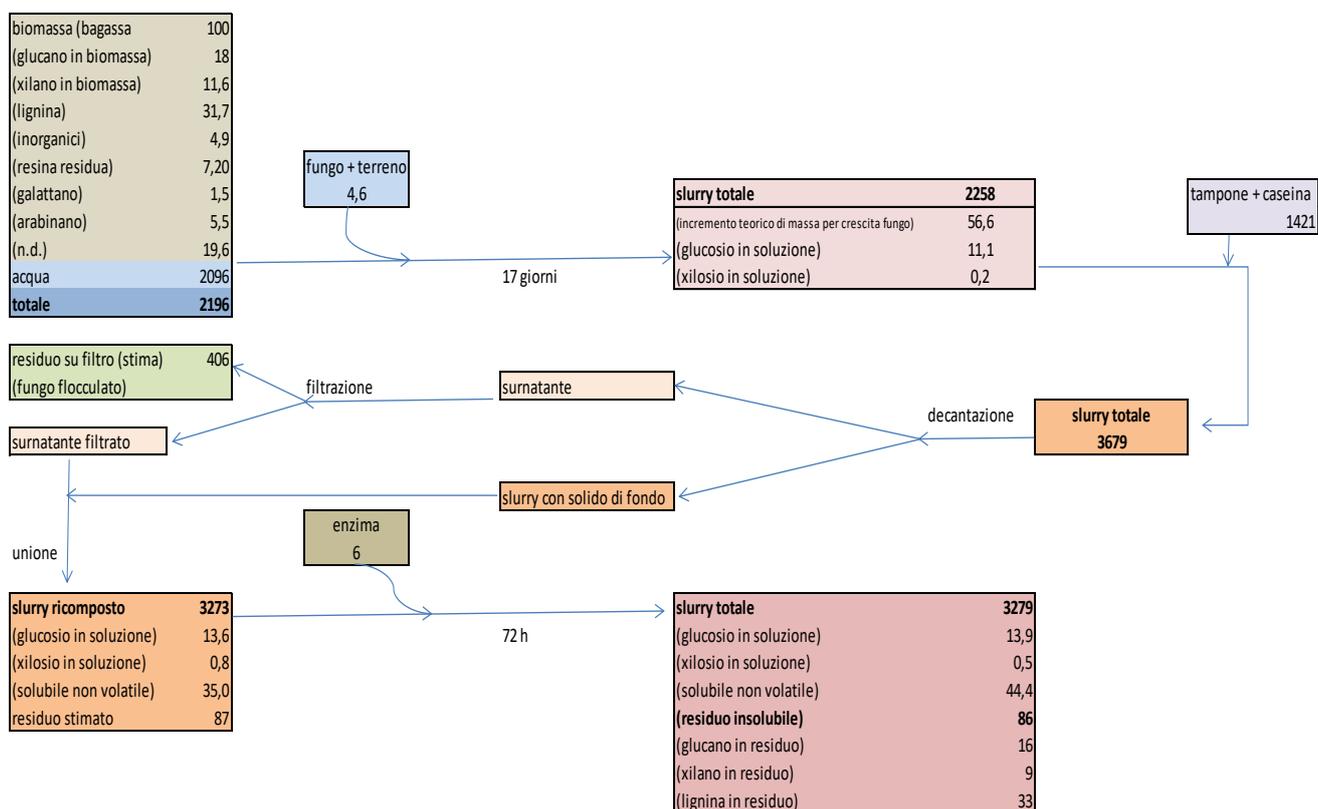
#### 4.2.1 Analisi del bilancio di massa

L'analisi dei flussi ponderali della biomassa durante il processo, già schematizzato in figura 11, ha permesso di costruire i bilanci di massa delle prove eseguite sui due diversi funghi. Nelle prove in bianco la presenza di zuccheri è stata trascurabile in ogni caso, per cui non è stato necessario eseguire correzioni sul bilancio di massa.

I dati del bilancio di massa sono riportati nelle figure 18 e 19; per comodità di lettura i valori sono stati normalizzati a 100 g di bagassa di guayule secca usata in partenza.



**Figura 18:** Schema del processo del pretrattamento biologico ad opera del ceppo Gr1035; ogni numero è riferito a 100 g di biomassa di partenza (rami di guayule parzialmente deresinati).



**Figura 19:** Schema del processo del pretrattamento biologico ad opera del ceppo C1P5; ogni numero è riferito a 100 g di biomassa di partenza (rami di guayule parzialmente deresinati).

Dall'analisi dei bilanci di massa è possibile osservare che in entrambi i casi (per *Fomitiporia*, ma in modo più spiccato per *Pleurotus*) le quantità di glucosio + glucano (il glucano è fonte di glucosio) a fine processo sono nettamente superiori rispetto al glucano determinato nella biomassa di partenza (32+17 rispetto a 18 nel caso del *Pleurotus* e 14+16 rispetto a 18 nel caso della *Fomitiporia*). Le ragioni di questo notevole contenuto aggiuntivo a fine processo possono essere imputabili al fatto che non tutto il glucosio sia stato determinato nella biomassa di partenza utilizzando il metodo NREL, e che buona parte del glucano occulto sia nascosta nel 20 % circa indicato come materiale non determinato (nd). Sebbene ciò possa spiegare il caso di *Fomitiporia*, non spiega, però, quello di *Pleurotus* dove si riscontra una produzione di glucosio nettamente superiore a quella producibile teoricamente da 18 di glucano determinato + 20 di ipotetico glucano non determinato.

La ragione più plausibile è che il glucosio prodotto sia di natura esogena alla biomassa, prodotto cioè direttamente dal fungo solo però in presenza della biomassa stessa, la quale potrebbe aver elicitato questo tipo di metabolismo che ha portato a

produrre glucosio. A supporto di ciò c'è l'evidenza che il pretrattamento fungino non ha prodotto una trasformazione evidente della biomassa che a fine processo mantiene quasi immutate sia le caratteristiche fisiche (Fig. 20) che chimiche (un'analisi della composizione ha rilevato che il rapporto relativo dei macrocostituenti lignina, xilano e glucano è variato di poco rispetto alla bagassa iniziale).



**Figura 20:** Biomassa prima e dopo il processo che prevede pretrattamento biologico e idrolisi enzimatica. In alto è stato usato il *Pleurotus* (Gr1035), in basso la *Fomitiporia* (C1P5). In entrambi i casi non sono osservabili sostanziali modifiche strutturali.

A supporto dell'ipotesi sulla produzione di glucosio esogeno, dobbiamo considerare che i ceppi sono stati selezionati per utilizzare la lignina, le cere, le cutine, le resine, le gomme (cosiddette "incrostazioni di parete cellulare vegetale") come fonte di energia e di carbonio per produrre "glucosio esogeno" alla biomassa. Questo glucosio è prodotto in una forma prontamente utilizzabile, o dal fungo stesso (in assenza di substrato) o escreto da esso nel mezzo circostante (alla presenza di substrato) attraverso dei pori della parete cellulare, per essere poi utilizzato da altre specie di WRF che invece degradano la cellulosa e i glucani, e che richiedono trovare del glucosio libero prontamente metabolizzabile. Tali funghi formano con *Pleurotus* e *Fomitiporia* dei veri e propri "Consorti fungini naturali" poiché *Pleurotus* e *Fomitiporia* (che degradano poco i glucani e le cellulose rispetto alla lignina e altri componenti di parete) preparano le condizioni per

l'insediamento e la crescita di successivi funghi che invece agiscono sulla cellulosa della biomassa con produzione questa volta di "glucosio endogeno". Questo avviene per ottimizzare il ciclo naturale del carbonio negli ecosistemi forestali ove questi consorzi si rinvergono utilizzando le biomasse vegetali in decomposizione (Hatakka and Hammel, 2010; Singh et al., 2010). Questo aspetto ecologico spiegherebbe come la cellulosa ed i glucani non si siano modificati nel tempo. Certamente i due ceppi saggiati hanno agito all'origine su un "pool chimico occulto" non perfettamente identificato senza però destrutturare la biomassa, data la complessità e la ricalcitranza della biomassa di partenza e i limiti di sensibilità delle tecniche analitiche usate. In conformità a queste ipotesi, il fungo è cresciuto ed ha prodotto glucosio esogeno in modo rilevante, che è stato escreto attraverso i pori della parete cellulare finendo nel brodo colturale prima della flocculazione a spese di una parte di materiale organico "occulto" della materia prima (lignina, resina residua o materia) e di una serie di altre fonti non ben quantificate. Il fungo potrebbe aver adottato in vitro questo tipico comportamento che assume in vivo per rendere prontamente disponibile del glucosio per la crescita di altri funghi WRF che degraderebbero poi la cellulosa e i glucani in una logica di "consorzio fungino" (Hatakka and Hammel, 2010; Singh et al., 2010).

L'idrolisi enzimatica non avrebbe funzionato su questa tipologia di biomassa poiché il Ctec2 è prodotto dal fungo ascomicete *Trichoderma reesei* che solitamente non fa parte dei consorzi di cui sopra e degrada specificatamente la cellulosa e non la lignina

In ogni caso, sebbene occorrono nuove prove a conferma di questa ipotesi, il lavoro svolto consente di prendere in seria considerazione la possibilità di impiegare questo tipo di pretrattamento nella produzione di zuccheri di seconda generazione da biomasse lignocellulosiche residuali.

## 5. CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato esaminato il processo di ottenimento di zuccheri da bagassa di guayule utilizzando un pretrattamento biologico ad opera di funghi selezionati, seguito da idrolisi enzimatica. Da 100 g di bagassa sono stati ottenuti 32 g di glucosio utilizzando il ceppo fungino di *Pleurotus* e 14 g utilizzando il ceppo di *Fomitiporia*. Le evidenze sperimentali hanno consentito di rilevare che la maggior parte del glucosio prodotto sia stato di natura esogena, in quanto, a fine trattamento, il residuo insolubile conteneva ancora una quantità di cellulosa simile a quella della bagassa di partenza.

Inoltre è stato possibile constatare che l'idrolisi enzimatica, realizzata in condizioni standard con l'impiego di enzimi commerciali (Ctec2), non è stata efficace nell'incrementare significativamente la produzione di glucosio; il pretrattamento ad opera dei funghi testati non produce quindi una modifica strutturale tale da favorire l'attacco enzimatico alla struttura lignocellulosica.

Tuttavia il rilevante quantitativo di glucosio prodotto per via esogena offre interessanti spunti per l'applicazione di questo trattamento nella produzione di zuccheri di seconda generazione.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Akin, D.E., Rigsby, L.L., Sethuraman, A., Morrison, W.H., Gamble, G.R. and Eriksson, K.E.L. (1995). Alterations in Structure, Chemistry, and Biodegradability of Grass Lignocellulose Treated with the White Rot Fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1591-1598.

Catley, B.J. (1992). The Biochemistry of Some Fungal Polysaccharides with Industrial Potential. In: Arora, D., Elander, R.P. and Mukerji, K.G., Eds., *Handbook of Applied Mycology: Fungal Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 259-279.

Chen, J., Fales, S.L., Varga, G.A. and Royse, D.J. (1995). Biodegradation of Cell Wall Components of Maize Stover Colonized by White-Rot Fungi and Resulting Impact on *in Vitro* Digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **68**, 91-98.

Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Almendros, G., González-Vila, F.J. and Martínez, A.T. (1995). Hyphal-Sheath Polysaccharides in Fungal Deterioration. *Science of the Total Environment*, **167**, 315-328.

Hatakka, A., Hammel, K.E. (2010). Fungal Biodegradation of Lignocelluloses: A Review. In: *Industrial Applications*, 2<sup>nd</sup> Edition The Mycota Vol. X, Hofrichter M. (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, pp. 319-340.

Karunanandaa, K., Varga, G.A., Akin, D.E., Rigsby, L.L. and Royse, D.J. (1995). Botanical Fractions of Rice Straw Colonized by White-Rot Fungi: Changes in Chemical Composition and Structure. *Animal Feed Science and Technology*, **55**, 179-199.

Koutrotsios, G., Mountzouris, K.C., Chatzipavlidis, I. and Zervakis, G.I. (2014). Bioconversion of Lignocellulosic Residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* Mushroom Fungi—Assessment of Their Effect on the Final Product and Spent Substrate Properties. *Food Chemistry*, **161**, 127-135.

Kurt, S. and Buyukalaca, S. (2010). Yield Performances and Changes in Enzyme Activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) Cultivated on Different Agricultural Wastes. *Bioresource Technology*, **101**, 3164-3169.

Isikhuemhen, O.S., Nerud, F. and Vilgalys, R. (2000). Cultivation Studies on Wild and Selected Hybrid Strains of *Pleurotus tuberregium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 431-435.

Isikhuemhen, O.S., Mikiashvili, N.A., Adenipekun, C.O., Ohimain, E.I. and Shahbazi, G. (2012). The Tropical White Rot Fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont: Lignocellulolytic Enzymes Activities and Sugar Release from Cornstalks under Solid State Fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**, 1961-1966.

Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautová, V. and Zervakis, G.I. (2012). Biodegradation and Detoxification of Olive Mill Wastewater by Selected Strains of the Mushroom Genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere*, **88**, 620-626.

Ohgren, K., Bura, R., Saddler, J. and Zacchi, G. (2007). Effect of Hemicelluloses and Lignin Removal on Enzymatic Hydrolysis of Steam Pretreated Corn Stover. *Bioresource Technology*, **98**, 2503-2510.

Pilotti, M., Gervasi, F., Brunetti, A. (2005). Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* and *Eutypa lata/Libertella blepharis* in *Platanus acerifolia*. *Journal of Phytopathology*, **153**, 193-202.

Pilotti, M., Tizzani, L., Brunetti, A., Gervasi, F., Di Lernia, G., Lumia, V. (2010). Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* on declining and decayed hazelnut. *Journal of Plant Pathology*, **92** (1), 115-129.

Salmones, D., Mata, G. and Waliszewski, K.N. (2005). Comparative Culturing of *Pleurotus* spp. on Coffee Pulp and Wheat Straw: Biomass Production and Substrate Biodegradation. *Bioresource Technology*, **96**, 537-544.

Singh, P., Sulaiman, O., Hashim, R., Rupani, P.F., Peng, L.C. (2010). Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. *Rev Environmental Science and Biotechnology* **9**, 141-151.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*, **83**, 1-11.

Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M.H. (1991). *In Vitro* Depolymerization of Lignin by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **176**, 269-275.

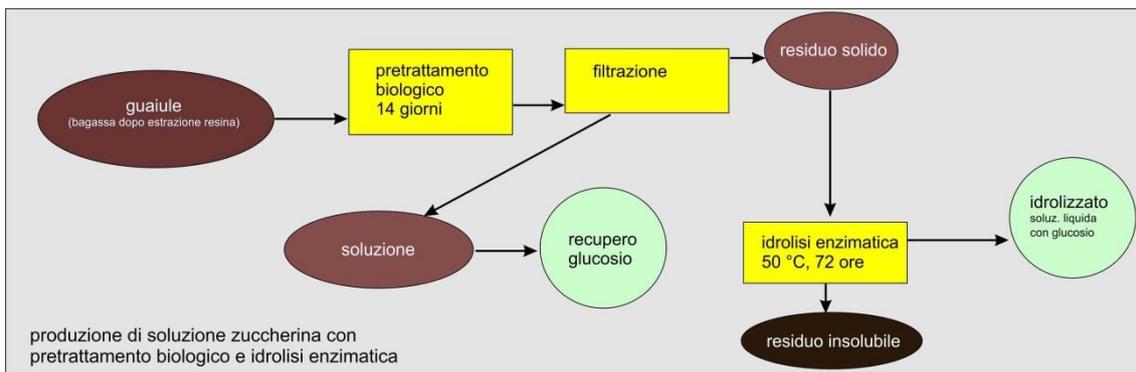
Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. and Lee, Y.Y. (2005). Comparative Sugar Recovery Data from Laboratory Scale Application of Leading Pretreatment Technologies to Corn Stover. *Bioresource Technology*, **96**, 2026-2032.

Zabel, R.A. and Morrell, J.J. (1992). Wood Microbiology: Decay and Its Prevention. Academic Press, London.

## APPENDICE: ATTIVITÀ SUPPLEMENTARE

### INTRODUZIONE

Il processo di sfruttamento della bagassa di guayule mediante pretrattamento biologico ha previsto l'esecuzione dello schema operativo mostrato in figura 1. Questa volta l'idrolisi enzimatica è stata eseguita sul residuo secco dopo filtrazione della sospensione ottenuta a fine trattamento biologico con il ceppo fungino di *P. ostreatus* selezionato dall'Università di Bari come essere particolarmente competitivo rispetto ad altri saggiati in precedenti relazioni per la biodegradazione di biomasse residuali lignocellulosiche con ottenimento di zuccheri fermentabili di 2° generazione.



**Figura 1:** Produzione di glucosio da bagassa di guayule con pretrattamento biologico ad opera di funghi ligninolitici combinato con un trattamento di idrolisi enzimatica.

### METODOLOGIA SPERIMENTALE

#### PREPARAZIONE DELL'INOCULO

Siamo partiti da colture pure del ceppo Gr1035 di *P. ostreatus* selezionato come il più performante per gli obiettivi di questo progetto (Fig. 2).



**Figura 2:** Colonie pure dell'isolato Gr1035 di *P. ostreatus*.

Il ceppo Gr1035 di *P. ostreatus* è stato fatto crescere in beute “Erlenmeyer” da 250 ml in un mezzo liquido di crescita composto da glucosio ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,8 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $0,4 \text{ g l}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) ed estratto di lievito ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) tamponato a pH 6.0. Sono stati aggiunti i seguenti microelementi:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ). La coltivazione del fungo è stata eseguita in 50 ml di terreno sterilizzato a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  per 15 minuti. Una beuta è stata inoculata con 3 g di micelio attivo cresciuto per 7 giorni su cubetti di agar di 5 mm. La beuta è stata mantenuta sotto agitazione (150 rpm) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  per 12 giorni.

Un'aliquota di 5 ml di coltura fungina è stata trasferita sterilmente in un'altra beuta da 500 ml contenente 100 g di cariossidi di grano tenero (20:1 w/v) preventivamente inumidite con acqua distillata e sterilizzate a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  per 30 min. La miscela grano/fungo è stata ulteriormente inumidita con pochi ml di acqua distillata sterile dopo sterilizzazione, energicamente agitata ed incubata a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  al buio per circa due settimane fino a che il micelio ricopriva tutta la massa.

L'inoculo è stato poi recuperato dalla beuta, asciugato per circa mezza giornata sotto cappa sterile a flusso laminare, ed infine sfarinato con un macinino da caffè (Figura 3). Aliquote di 1 g di sfarinato sono state sospese in acqua distillata sterile in tubi da microbiologia secondo il metodo delle diluizioni seriali ottenendo una densità dell'inoculo pari a circa  $10^6$  unità formanti colonie (UFC) per grammo di sfarinato secondo la metodologia del conteggio vitale in piastre Petri su un terreno di crescita solido composto da patata destrosio agar.



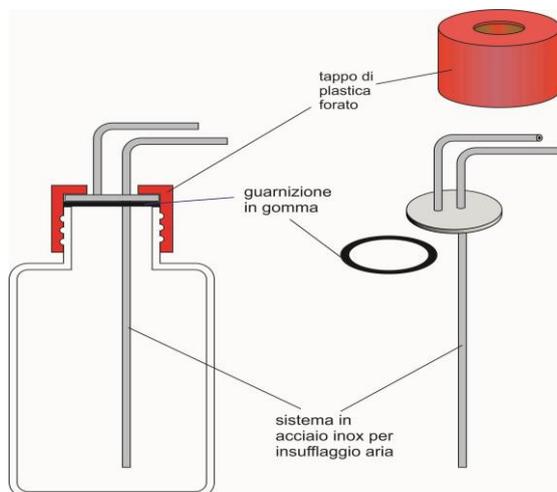
**Figura 3:** Farina di grano tenero infungata con il ceppo Gr1035 di *P. ostreatus* usata come inoculo.

### BIODEGRADAZIONE DELLA BAGASSA DI GUAYULE

Le prove sono state condotte utilizzando specifici bioreattori da banco realizzati in ENEA (Centro Ricerche Trisaia) per l'esecuzione di prove preliminari e di piccola taglia che consistono in bottiglie di vetro da 500 ml chiuse con tappo a vite. Sul tappo è stato realizzato un foro in modo da alloggiare un sistema in acciaio per consentire l'ossigenazione periodica della coltura semiliquida (Fig. 4).

In ogni bioreattore sono stati pesati i seguenti materiali come di seguito indicato:

- 20 g di bagassa di guayule essiccata come fonte di carbonio e di micronutrienti;
- 1 g di nitrato di ammonio come fonte di azoto;
- 1 g di estratto di lievito come fonte di fattori di crescita;
- 400 ml di soluzione acquosa con tampone fosfato 0.1 M (pH 5,5).



**Figura 4:** Bioreattore realizzato in ENEA per le prove di pretrattamento biologico.

La prova è stata realizzata in triplo, più un bianco (controllo) contenente tutti gli ingredienti, escluso la bagassa di guayule. Le bottiglie, riempite con il substrato e i nutrienti, sono state chiuse collegando i tubi in acciaio con un tubo di silicone e sterilizzate in autoclave a 121 °C per 10 minuti prima dell'inoculazione.

In ogni bottiglia è stato aggiunto 1 g di farina infungata come inoculo ( $10^6$  UFC/g), quindi sono state introdotte in un incubatore termostato provvisto di agitatore orbitale e di fori per il passaggio di tubicini per il flussaggio dell'ossigeno e l'espulsione dell'anidride carbonica entro ciascuna bottiglia. Le 4 bottiglie sono state mantenute sotto agitazione (250 rpm) a 25 °C per 18 giorni. Durante tale periodo è stato flussato dell'ossigeno puro entro ciascuna bottiglia (1 ml/min) per circa 1-1,5 h ogni 2-3 giorni, ed espulsa l'anidride carbonica prodottasi all'interno di ciascuna di esse. In questo modo si è cercato, con un metodo molto semplice ed economico, di garantire la necessaria aereazione del mezzo all'interno della bottiglia con il giusto equilibrio fra ossigeno immesso e anidride carbonica espulsa.

Per seguire la cinetica di produzione del glucosio durante il trattamento, sono stati eseguiti dei prelievi periodici di campione (2 ml) da ogni bottiglia, al tempo 0 (giorno dell'inoculazione) e dopo 4, 9, 14 e 18 giorni di incubazione (Figura 5). I campioni prelevati sono stati congelati per essere in seguito analizzati.



**Figura 5:** Campioni di surnatante prelevati durante il corso del trattamento fungino per il monitoraggio del glucosio prodottosi durante il processo di 18 giorni.

Dopo 18 giorni di trattamento biologico con il fungo (Figura 6), le bottiglie sono state chiuse e conservate in frigorifero a 4 °C per altri 4 giorni prima di essere sottoposte a filtrazione e ai successivi trattamenti ed analisi.



**Figura 6:** Colture di *P. ostreatus* cresciute per 18 giorni sotto agitazione e flussaggio di ossigeno in un brodo nutritivo contenente bagassa di guayule e vari nutrienti.

## IDROLISI ENZIMATICA

La filtrazione della sospensione è stata eseguita mediante l'apparato di Büchner munito di pompa da vuoto con lo scopo di separare il surnatante dal residuo solido che è ben visibile sul fondo delle bottiglie nella figura 6.

Nella soluzione è stato determinato il contenuto di glucosio (al 22° giorno), mentre il residuo solido è stato lavato con acqua, seccato in stufa a 60 °C per una notte e infine sottoposto a saccarificazione mediante idrolisi enzimatica. Per quest'ultima è stato usato il noto enzima commerciale Ctec2 (Novozymes Bioenergy) alle seguenti condizioni sperimentali:

- miscela enzimatica aggiunta in quantità pari al 10 % (wt) rispetto alla biomassa secca caricata
- temperatura di idrolisi adottata fissata a 45 °C
- durata delle prove di idrolisi fissata a 72 h sotto agitazione su piastra orbitante a 150 rpm
- impostazione del pH della miscela al valore di 5,0 mediante l'aggiunta di tampone citrato.

## DETERMINAZIONE DEL GLUCOSIO

Alla fine dell'idrolisi enzimatica è stata caratterizzata la fase liquida per la determinazione del contenuto di glucosio prodotto. Il glucosio è stato determinato su campioni liquidi di brodo di coltura (1 ml circa). La soluzione è stata filtrata su microfiltri a membrana (45 µm) e diluita per far rientrare gli analiti nel range di calibrazione realizzato con standard a concentrazione nota. Il campione è stato quindi analizzato mediante cromatografo HPIC DIONEX, equipaggiato con colonna Nucleogel OA40, eluente 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e con rivelatore a indice di rifrazione. Il campo di validità delle determinazioni risiede all'interno di un intervallo di concentrazione 50-900 ppm, in cui è stata accertata la linearità di risposta del rivelatore.

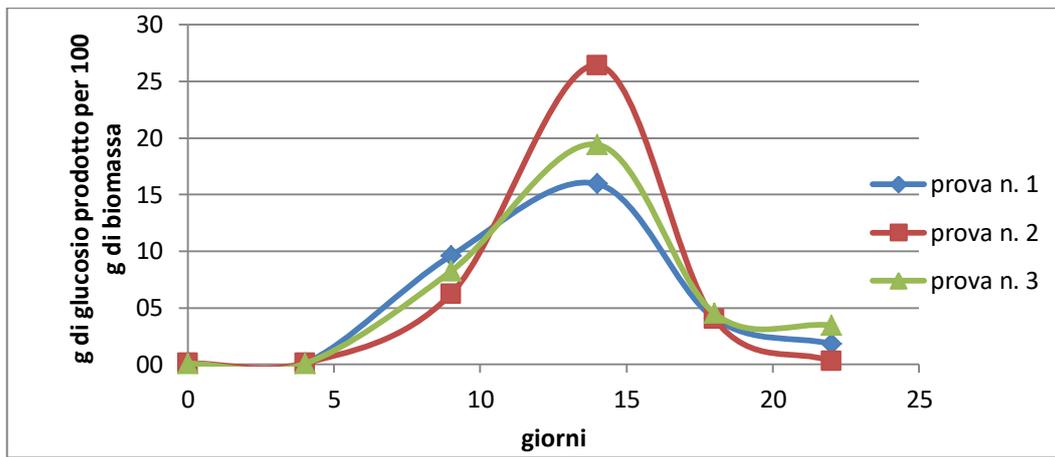
## RISULTATI E DISCUSSIONE

I campioni prelevati dalle bottiglie durante il trattamento fungino dopo 0, 4, 9, 14 e 18 giorni, insieme al prelievo finale eseguito prima dell'idrolisi enzimatica (al 22° giorno, ovvero dopo 4 giorni di permanenza delle bottiglie a 4°C), sono stati analizzati per determinare il quantitativo di glucosio prodotto. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1.

**Tabella 1:** Concentrazione di glucosio in soluzione determinato durante il corso del trattamento fungino di 18 giorni e dopo ulteriori 4 giorni di conservazione in frigo.

	<i>glucosio in soluzione (ppm)</i>					
	<b>0 giorni</b>	<b>4 giorni</b>	<b>9 giorni</b>	<b>14 giorni</b>	<b>18 giorni</b>	<b>22 giorni</b>
<b>Bianco</b>	17	17	20	21	16	
<b>Replica n. 1</b>	69	69	4687	7818	1615	362
<b>Replica n. 2</b>	74	68	3094	13173	2024	68
<b>Replica n. 3</b>	52	48	4101	9729	2289	673

I dati della tabella 1 sono stati poi trasformati in grammi di glucosio prodotto normalizzati a 100 g di bagassa di guayule trattata e quindi rappresentati graficamente in figura 7.



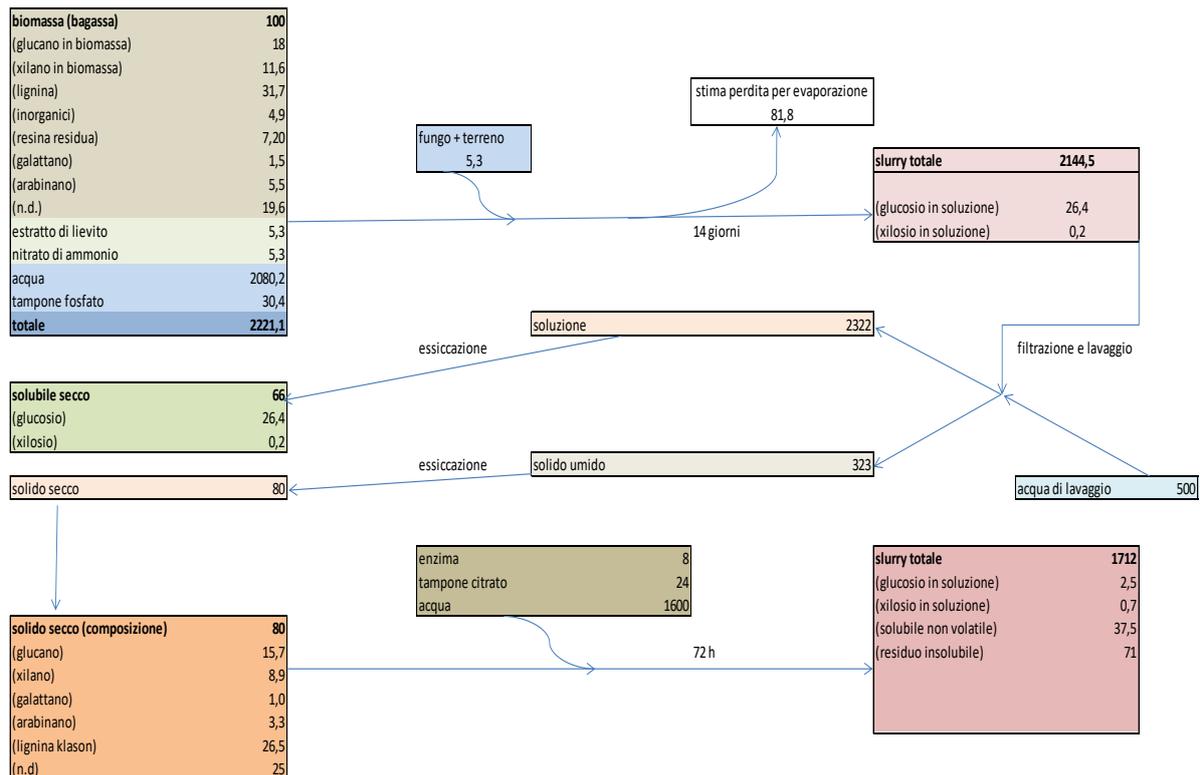
**Figura 7:** Cinetica di produzione del glucosio durante il trattamento fungino.

Dalla figura 7 è possibile osservare che la produzione di glucosio è sensibilmente iniziata dopo 5 giorni d'incubazione raggiungendo un picco massimo pari a 26 g/100 g di biomassa al 14° giorno per una delle 3 repliche. Nonostante le prove siano state allestite allo stesso modo, è stata notata una differenza di produzione che va da un minimo di 16 g/100 g ad un massimo di 26 g/100 g. Purtroppo non sappiamo se la produzione tra il 14° e il 18° giorno sia stata maggiore, e se si sia livellata, poiché ci mancano i prelievi per quel periodo. Quello che si osserva è che dopo il 14° giorno vi è un brusco calo di glucosio nel mezzo di coltura che continua ad esserci anche quando le bottiglie vengono rimosse dall'incubatore e conservate in frigo (al 22° giorno). È plausibile ipotizzare che il fungo abbia avuto la necessità di utilizzare il glucosio da lui stesso prodotto dalla degradazione di alcuni componenti recalcitranti della biomassa come lignine, cere, cutine, ecc., dopo il picco del 12-13° giorno di crescita sottraendolo dal mezzo colturale in cui era inizialmente cresciuto usando i nutrienti apportati.

Dopo il trattamento fungino, il residuo solido di bagassa è stato separato dalla soluzione per filtrazione, quindi seccato in stufa e sottoposto ad idrolisi enzimatica: la resa di produzione di glucosio non supera tuttavia il 14% nel migliore dei casi. Questo conferma che il fungo non opera sulla biomassa un trattamento tale da favorire la saccarificazione enzimatica, ma esso stesso è artefice della produzione di glucosio esogeno partendo dalla lignina e da altri costituenti della bagassa. Di conseguenza il trattamento di idrolisi enzimatica si conferma superfluo.

Ad ogni modo, la produzione di glucosio ottenuta dal solo trattamento fungino si conferma particolarmente elevata, tale da superare addirittura la quantità di cellulosa presente nella bagassa. I risultati ottenuti confermano quindi la rilevante produzione di glucosio esogeno ottenuta nelle precedenti prove, anche se, i parametri che favoriscono le

massime rese (durata, temperatura, ecc.) devono ancora essere ottimizzati sulla base di questa esperienza di lavoro. In conformità a questi risultati è stato stimato un bilancio di massa, costruito sull'ipotesi di aver interrotto il trattamento al 14° giorno (considerando il miglior risultato ottenuto, cioè 26 g di glucosio da 100 di bagassa). Lo schema del bilancio di processo è mostrato in figura 8: partendo da 100 g di bagassa secca è possibile quindi ottenere globalmente circa 28,9 g di glucosio, di cui 26,4 g provenienti dal trattamento fungino con *P. ostreatus* e i restanti 2,5 g da quello enzimatico con Ctec2.



**Figura 8:** Bilancio di massa del processo di produzione di glucosio mediante trattamento con *Pleurotus* e a seguire idrolisi enzimatica.

## CONCLUSIONI

Il pretrattamento biologico, eseguito sui rami di guayule, preventivamente deresinati con alcool etilico, è risultato particolarmente interessante per la produzione di glucosio in soluzione ad opera del fungo *Pleurotus ostreatus*. Differenti prove sono state eseguite a diverse condizioni di durata del pretrattamento e modalità di inoculo, arrivando ad ottenere nelle prove riportate nel presente rapporto da un minimo di 16 fino a 26 g di glucosio per 100 g di biomassa trattata. In prove eseguite e discusse nel rapporto semestrale precedente si è arrivati a ottenere fino a 32 g di glucosio da 100 g di bagassa, in pratica più della cellulosa presente nella biomassa. In tutte le prove eseguite, l'idrolisi enzimatica, realizzata a valle del pretrattamento biologico, non è risultata efficiente.

In pratica il fungo non ha operato una destrutturazione fisica della biomassa, ma ha usato alcuni suoi componenti (lignine, cere, cutine) per accrescersi e produrre glucosio esogeno che è stato riversato nel brodo colturale. Le quantità di glucosio prodottesi sono tali da rendere il processo sicuramente più concorrenziale rispetto a metodi più energivori ed impattanti per l'ambiente in termini di impiego di elevate temperature o di acidi. Tuttavia, i risultati sono ancora poco riproducibili (elevata variabilità di glucosio prodotto) e le condizioni ottimali devono essere ancora individuate in vista di un impiego su vasta scala.

## Ringraziamenti

Si ringrazia la Dottoressa Isabella De Bari, responsabile del Laboratorio TERIN-BBC-BIC.

ENEA  
Servizio Promozione e Comunicazione  
[www.enea.it](http://www.enea.it)

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati  
marzo 2021