

## Task 3.1: Recupero di sottoprodotti agroindustriali per processi di valorizzazione energetica

### 3.1.1 Breve stato dell'arte e riferimenti alla valenza di innovazione scientifica, economica e sociale dell'azione (max 1 pagina)

Il tipo di impianto di biogas più diffuso in Europa è quello a digestione anaerobica (DA), utilizzando vari batteri che trasformano biomasse in un biogas. Il biogas è una miscela di metano ( $\text{CH}_4$  50-70%), anidride carbonica ( $\text{CO}_2$  30-50%), azoto (N 1-5%) e solfuro di idrogeno ( $\text{H}_2\text{S}$  0,1-0,5). Il processo di DA può essere suddiviso in quattro stadi fermentativi all'interno del reattore: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi (Fig.3.1.1.1). Nei processi di idrolisi/acidificazione i polimeri organici sono suddivisi in molecole più semplici ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) e producono diverse quantità di acidi grassi volatili (AGV) e alcoli, che sono metabolizzati nella successiva fase di acetogenesi/metanogenesi. La digestione è diversa in base alla capacità dei microrganismi di degradare materie prime complesse a semplici.

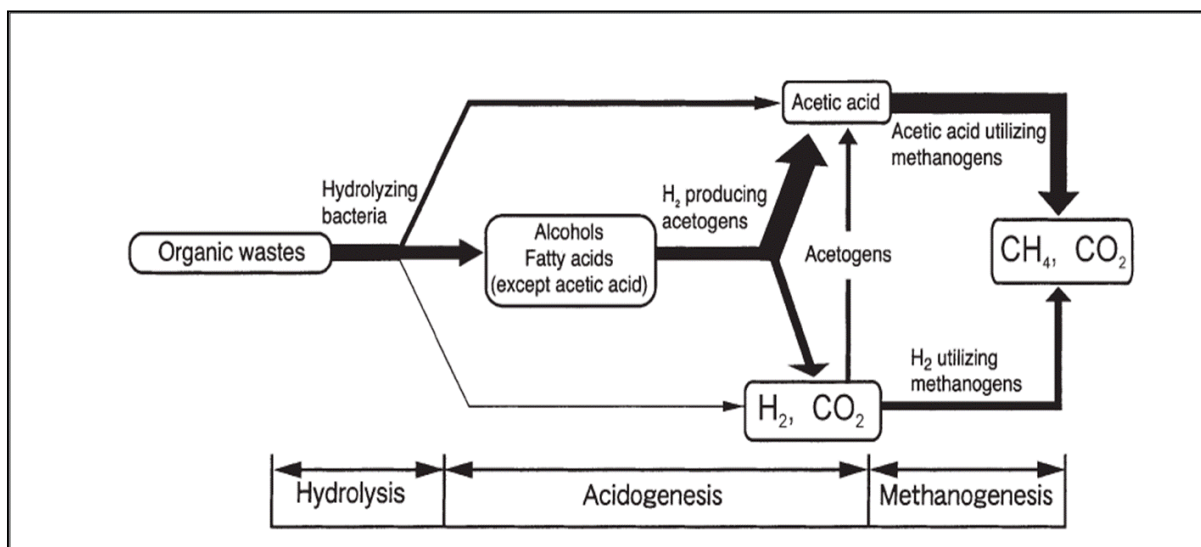


Figura 3.1.1.1: Concetto di Digestione Anaerobica.

Diversi fattori quali substrato (composizione e qualità), fattori ambientali (temperatura, pH, carico organico), dinamiche microbiche e design di bioreattore contribuiscono all'efficienza del processo di DA e devono essere ottimizzati per ottenere il massimo beneficio da questa tecnologia, sia in termini di produzione energetica che di stabilità biologica del digestato (residuo finale liquido del processo di DA).

La produzione di idrogeno dipende dall'attività idrogenasica di batteri sia strettamente anaerobi (clostridi, batteri del rumine, Methylotrops), sia anaerobi facoltativi (Escherichia coli, Enterobacter spp, Citrobacter spp) che aerobi (Alcaligenes, Bacilli). Tra questi batteri, diversi ceppi di Clostridium spp sono stati identificati e ben accettati come i microrganismi predominanti responsabili della produzione di idrogeno per via fermentativa utilizzando diversi substrati organici (Demuez et al, 2007; Fang e Zang, del 2002, Chen et al 2005, Chang et al., 2007).

Un discorso particolare va fatto per le popolazioni microbiche che si trovano all'interno dell'apparato gastrointestinale dei ruminanti (bovini, bufali, ovini) dove naturalmente avvengono una varietà di processi che trasformano composti insolubili (lignine ed emicellulose) in monomeri solubili producendo idrogeno, metano e biossido di carbonio. Entro un tempo relativamente breve (fino a 48 h), il consorzio microbico all'interno del rumine bovino sarebbe in grado di idrolizzare fino al 60-65% della cellulosa fornita con la dieta (Bayer et al., 2001). Il CREA-PCM ha una lunga esperienza nello studio di queste popolazioni e l'idea è quella di sfruttare la funzione naturale della

microflora ruminale, cioè fornire acidi organici a catena corta (principalmente acetico, propionico e butirrico) necessari al metabolismo animale (Hobson e Stewart, 1997), per la produzione di biogas. I sistemi di DA maggiormente diffusi in Europa sono mesofili, con concentrazione di solidi totali inferiore al 10-12% ed a due stadi (idrolisi e metanogenesi) (Weiland, 2010; Poschl et al., 2010). I vantaggi del sistema a doppia fase, rispetto alla produzione di biogas (metano) con tecnologie ormai consolidate, sono attesi nella riduzione complessiva dei tempi di ritenzione idraulica (30%) e, conseguentemente, dei volumi di stoccaggio necessari. Si ipotizza che questi sistemi possano essere ottenuti nella realtà operativa mediante adeguamento di quelli già diffusi sul territorio nazionale per la produzione di biogas a singolo stadio. L'idrogeno prodotto offre interessanti prospettive sul piano energetico, per uso diretto nei trasporti e per la sua potenziale conversione in energia elettrica mediante celle a combustibile.

Un ulteriore elemento di novità è rappresentato dall'uso per la produzione di idrogeno di effluenti d'allevamento (Zhu et al., 2008), finora utilizzati esclusivamente per la produzione di metano. Con questo procedimento è possibile ottenere CH<sub>4</sub> da codigestione di effluenti di allevamento con percentuali elevate di scarti agroindustriali, ricchi di molecole fermentescibili ad elevato contenuto energetico laddove, nella DA tradizionale, la codigestione è possibile solo se la percentuale di questi scarti è mantenuta bassa, pena l'aumento di concentrazione degli acidi grassi volatili, con blocco della metanogenesi. Ulteriore vantaggio di questo procedimento è il mantenimento di condizioni mesofile, cioè di temperature di 35-38 °C, ben diverse dai 50-60 °C occorrenti ai processi termofili, che hanno bisogno di consumi energetici non trascurabili per il mantenimento della temperatura. L'uso di consorzi microbici selezionati permette inoltre, di ottenere rese di biogas più elevate.

### ***3.1.2 Profilo ed esperienza dei proponenti e partecipanti in relazione all'attività (riportare anche max 5 pubblicazioni in totale) (max 1 pagina)***

Know-how scientifico dell'unità di ricerca coinvolta

Il gruppo di ricerca del CREA-PCM coinvolto in questa proposta, ha pluriennale esperienza nella ecologia microbica, in particolare quella dell'ambiente ruminale, sia attraverso metodiche classiche che molecolari, per la caratterizzazione e la selezione dei consorzi microbici. Negli ultimi anni è stato coinvolto nella produzione di biogas da scarti zootecnici nell'ambito del: progetto finanziato dal MiPAAF "SOS-ZOOT Sviluppo di modelli zootecnici ecocompatibili ai fini della sostenibilità. Sottoprogetto MAREA "Idrogeno e metano da effluenti zootecnici"; del Cluster AGRIFOOD (MIUR) Progetto 4 Sostenibilità della catena alimentare (SO.FI.A) OR 4 – Recupero di sottoprodotti e biomolecole dell'industria lattiero-casearia (2013-2016) e del progetto regionale CO-RESEARCH "sviluppo di un sistema a doppio stadio per la produzione di idrogeno e metano da scarti agricoli" SVOLTA (idoneo ma non ancora finanziato).

#### **Task leader:**

**Antonella Chiariotti** - UO CREA-PCM, Ricercatrice, Laureata in Scienze. Agrarie. Esperienza professionale: microbiologia ruminale, ecologia microbica. Tecniche molecolari applicate alla microbiologia.

#### Partecipanti:

**Alessandra Crisà** – UO CREA-PCM, Ricercatrice, Laureata in Scienze Biologiche (con lode), Ph.D. in biochimica e chimica applicata, Master in Bioinformatica. Esperienza professionale: Biologia molecolare, genetica, genomica and trascrittomica applicata agli animali di interesse zootecnico.

#### Pubblicazioni

- Chiariotti A, Lembo G, Contò G, Cali M, Liberatore R, Signorini A, 2014. Biogas production: hydrolytic and methanogenic activity of rumen inocula. Poster presentato all'International Conference on Anaerobic Digestion (26-30 October) Vienna, Austria.
- Concetti S, Chiariotti A, Patriarca C, Marone A, Varrone C, Contò G, Cali M, Signorini A, 2013. Biohydrogen production from buffalo wastewater codigested with agroindustrial by-products in an anaerobic reactor. *Buffalo Bull. Jour.*, 32 (special issue).
- Crisà A, Marchitelli C, Pariset L, Contarini G, Signorelli F, Napolitano F, Catillo G, Valentini A, Moioli B, 2010. Exploring polymorphisms and effects of candidate genes on milk fat quality in dairy sheep. *J. Dairy Sci.*, 93(4), 3834-3845.
- Crisà A, De Matteis G, Scatà MC, Moioli B, 2013. Analysis of SLC11A1 gene expression in healthy water buffalo (*Bubalus bubalis*) blood cells by using qPCR. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6957-6967.
- Huws SA, Chiariotti A, 2010. Effect of diets on bacterial population diversity in buffalo rumen as revealed by DGGE and T-RFLP analysis. *Proceedings of the RRI-INRA Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems 7<sup>th</sup> Biennial Meeting, 23<sup>rd</sup> -25<sup>th</sup> June, Aberdeen*, p 84.
- Murgiano L, Alessandro AD, Egidi MG, Crisà A, Prosperini G, Timperio AM, Valentini A, Zolla L, 2010. A proteomics and transcriptomics investigation on longissimus muscles in Large White and Casertana pig breeds. *J. Proteome Res.*, 9(12), 6450-6466.

### **3.1.3 Obiettivi della task**

Il progetto sarà focalizzato sulla cinetica del processo di Digestione Anaerobica di rifiuti organici agrozootecnici al fine di aumentare l'efficienza della produzione di biogas. Gli obiettivi da perseguire sono di seguito specificati:

Linea 1: Identificazione delle condizioni ottimali di processo per la produzione di idrogeno e metano con substrati diversi singoli o in codigestione.

I punti critici del processo in due fasi sono la struttura microbica della comunità (punto 2), la sua interazione con i diversi substrati e l'ottimizzazione dei parametri chimico fisici di processo.

Linea 2: Caratterizzazione e selezione di consorzi microbici per la produzione di biogas nelle diverse condizioni di coltura

Obiettivo è la comprensione della struttura, della diversità e delle dinamiche delle comunità microbiche presenti nelle due fasi del processo, ossia, idrogenogenesi acidogena e metanogenesi. Le diverse fasi sono catalizzate da gruppi microbici eterogenei che cooperano strettamente per arrivare alla produzione finale di metano. In particolare i batteri acidogeni sono i responsabili dell'idrolisi dei polimeri presenti nel materiale organico, oltre che dell'iniziale acidificazione a carico dei monomeri generati dal processo idrolitico. Al fine di caratterizzare e monitorare le comunità microbiche coinvolte nei processi su menzionati di digestione anaerobica è possibile scegliere marcatori microbici molecolari, quali i geni ribosomiali batterici (16S rRNA), in grado di fornire indicazioni sulla presenza di determinate popolazioni di microrganismi

Linea 3: Individuazione di marcatori molecolari funzionali di processo (idrogenasi, metil coenzima-M reductasi)

Sebbene esista una letteratura copiosa attinente alla produzione di bioidrogeno per via fermentativa in pochi lavori sono stati analizzati gli aspetti di genetica molecolare. Al fine di monitorare le attività metaboliche relative al processo di digestione anaerobica sarebbe auspicabile scegliere ed utilizzare opportuni marcatori funzionali da associare all'andamento della produzione di idrogeno o metano. Questi marcatori sono geni funzionali codificanti per enzimi caratteristici di una specifica via metabolica, in grado di fornire informazioni sull'andamento dei processi fermentativi.

Considerando le produzioni target della presente task sarà studiata l'espressione genica delle idrogenasi e delle metil coenzima-M reductasi enzimi coinvolti nelle due fasi della digestione anaerobia solo nelle condizioni risultate ottimali al punto 3.1

Linea 4: Verifica delle caratteristiche del biogas ottenuti dai processi fermentativi ottimizzati  
La determinazione della variazione della composizione del biogas prodotto nel tempo fornisce dati essenziali per una analisi dell'efficienza della reazione di fermentazione anaerobica. La misurazione della percentuale relativa degli analiti che compongono il biogas (metano, anidride carbonica, idrogeno ed altri gas presenti in tracce come ammoniaca e acido solfidrico) fornirà dati essenziali per la determinazione della "qualità" del biogas prodotto, ovvero del suo potere calorifico.

Linea 5: Verifica dei risultati di laboratorio a scala di impianto pilota  
L'upgrading dei risultati di laboratorio a scala di impianto pilota è condizione indispensabile per verificare in condizioni operative reali la ripetibilità dei risultati e per poter trasferire le conoscenze ottenute su scala industriale.

### ***3.1.4 Descrizione delle attività che saranno sviluppate nella task***

In particolare, il progetto mira a verificare e migliorare le performances ottenibili in laboratorio mediante le seguenti attività:

Linea 1: Caratterizzazione chimico-fisica dei substrati e di alcuni parametri di processo  
Oltre alle analisi sulle caratteristiche dei vari substrati impiegati (chimico-fisico standard) e su alcuni parametri fisico-chimici di processo (T°, pH, HRT, OLR ecc.) sarà determinata la produzione di acidi grassi volatili (AGV). La quantità misurata mediante HPLC consente di determinare sia la stabilità del processo che stimare il percorso metabolico intrapreso.

Linea 2: Studio delle combinazioni diverse di substrati (i.e. liquame, sottoprodotti caseari, lignocelulosici) per ottimizzare l'efficienza energetica dell'intero processo e massimizzare le produzioni di gas. L'attività sarà concentrata nello studio di 3 singoli processi (idrolisi, idrogenogenesi e metanogenesi). In particolare per la degradazione dei composti lignocelulosici è indispensabile l'acquisto del sistema ANKOM, che consentirà di ottenere risultati più affidabili e robusti della tecnica di Van Soest (1974) e maggiore versatilità d'uso. Nell'ultimo anno del progetto, saranno testate sul prototipo le migliori combinazioni di inoculo-substrato ottenute in laboratorio (collaborazione con la task 3.C)

Linea 3: Analisi della struttura e variazione delle popolazioni microbiche durante la fermentazione attraverso tecniche molecolari (DGGE-qPCR).  
Una volta identificate le condizioni di coltura ottimali per la produzione di biogas, saranno prelevati campioni ai tempi opportuni e sarà valutata la metodica migliore per l'estrazione del DNA delle specie presenti nel mezzo (batteri, protozoi). Saranno successivamente analizzati i geni che codificano per l'rRNA ribosomale 16S (rRNA 16S) mediante la messa a punti di protocolli per l'analisi real time PCR (Polymerase Chain Reaction) e PCR-DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis). La real time PCR permetterà di ottenere una quantificazione assoluta sia dei batteri/archea totali che delle principali specie batteriche ruminali e archea (ad esempio batteri idrogeno-produttori, batteri omoacetogeni, batteri solfato-riduttori, metanobacteriales, metanomicrobiales, metanosarcinales). La PCR-DGGE consentirà di analizzare la variabilità delle popolazioni nelle varie condizioni colturali presenti nel reattore mediante l'identificazione delle bande differenzialmente presenti (batteri, protozoi) con successivo clonaggio, sequenziamento ed assegnazione alle corrispondenti unità tassonomiche (OTUs). Inoltre per il trattamento sia dei campioni biologici che delle colture microbiologiche è necessario l'acquisto di un liofilizzatore.

Linea 4: Studio dell'espressione genica di enzimi attivi nelle varie fasi del processo fermentativo mediante qPCR (idrogenasi, metil coenzima-M reduttasi)

Una volta identificate le condizioni di coltura ottimali per la produzione di biogas, questa attività sarà sviluppata mediante analisi dei campioni a livello dell'RNA ossia dei trascritti codificanti enzimi attivi nelle due fasi della digestione anaerobica. I principali geni o marcatori funzionali che saranno studiati sono le idrogenasi e le coenzima-M reduttasi, enzimi chiave implicati nel rilascio di idrogeno e nella sintesi di metano rispettivamente. Sarà messo a punto il protocollo di estrazione dell'RNA dalle matrici di coltura ed il metodo di analisi dell'espressione genica dei geni *hydA* (subunità catalitica dell'enzima [FeFe]-idrogenasi) e *mcrA* (subunità  $\alpha$  dell'enzima metil coenzima-M riduttasi) mediante reverse transcription real time PCR (RT-qPCR). Saranno verificate le possibili correlazioni dell'mRNA e DNA dei geni considerati con le produzioni di biogas per un eventuale impiego come biomarkers fermentativi.

Linea 5: Caratterizzazione quali-quantitativa del biogas prodotto.

La misura della qualità del biogas prodotto sarà effettuata tramite gascromatografia. L'applicazione di opportuni modelli matematici ai dati della cinetica di produzione del biogas permetteranno di determinare importanti parametri del processo come: la massima produzione di biogas ottenibile, la massima velocità di produzione di biogas e la "lag phase", ovvero il tempo che intercorre tra l'inizio dell'incubazione e l'inizio della produzione di biogas.

Per la determinazione quantitativa del biogas prodotto viene attualmente utilizzato un sistema di "water displacement". Tale sistema si basa sullo spostamento di un volume misurabile di acqua corrispondente al volume di biogas prodotto. Tuttavia attraverso l'uso del sistema AMPTS sarà possibile avere contestualmente sia la misura del singolo gas predominante (metano o idrogeno) che la produzione giornaliera, in campioni multipli (batch).

Linea 6: L'ultimo anno del progetto prevede la verifica dei risultati sull'impianto pilota attraverso gli stessi test chimici, microbiologici e molecolari previsti sui campioni di laboratorio

### 3.1.5 Descrizione degli output della task (deliverable)

D.3.1.1: Individuazione delle condizioni di coltura ottimali nelle fasi idrogeno e metano.

D.3.1.2: Identificazione di ceppi/consorzi microbici migliori produttori di idrogeno e metano.

D.3.1.3: Individuazione e caratterizzazione di marcatori molecolari funzionali di processo.

Ottenimento di indicatori molecolari che in combinazione con altri parametri fisici e chimici nei reattori di fermentazione permetteranno di ottimizzare velocemente i processi biotecnologici.

D.3.1.4: Caratterizzazione del biogas sui processi fermentativi ottimizzati.

D.3.1.5: Upgrading dei risultati di laboratorio a scala di impianto pilota.

D.3.1.6: rapporto sull'esito della ricerca.

D.3.1.7: attività di divulgazione, report finale e pubblicazioni.

### 3.1.6. Articolazione temporale delle attività e dei deliverable previsti nella task (Gantt)

		Attività	Deliverable
Quadrimestri	1	Linea 1, Linea 2, Linea 3 Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.4
	2	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.4, D.3.1.6
	3	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.4, D.3.1.5, D.3.1.6

4	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.4, D.3.1.6
5	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.4, D.3.1.6
6	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.4, D.3.1.6
7	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 4, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.6
8	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 4, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.6, D.3.1.7
9	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 4, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.6
10	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 4, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.6
11	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 4, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.6
12	Linea 1, Linea 2, Linea 3, Linea 4, Linea 5	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, , D.3.1.6
13	Linea 1, Linea 2, Linea 4, Linea 5, Linea 6	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.5, D.3.1.6, D.3.1.7
14	Linea 1, Linea 2, Linea 4, Linea 5, Linea 6	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.6, D.3.1.7
15	Linea 1, Linea 2, Linea 4, Linea 5, Linea 6	D.3.1.1, D.3.1.2, D.3.1.3, D.3.1.4, D.3.1.5, D.3.1.6, D.3.1.7

### **3.1.7 Risultati attesi, ricadute e benefici, ostacoli prevedibili ed azioni correttive**

In generale la produzione di biogas in due fasi distinte idrogenogenica e metanogenica, rispetto allo stato dell'arte, consentirà di ottenere diversi risultati positivi: aumentare, a parità di volume di reattore, la produzione di metano nel biogas di circa il 25 % e riducendo, così, il costo dell'investimento; produrre una discreta quantità di idrogeno, che potrebbe anche essere unita con quella di metano (bio-idrometano) per produrre un biogas ancor più ricco; avviare la cosiddetta "economia dell'idrogeno". Inoltre nel progetto si prevede di utilizzare esclusivamente residui e/o scarti agrozootecnici invece che culture energetiche per la produzione di biogas.

Tutto ciò consentirebbe di venire incontro alle direttive della Commissione Europea e della legislazione Italiana. La strategia della Commissione, come testimonia il suo Action Plant "Innovating for Sustainable Growth: a Bioeconomy for Europe", sottolinea la necessità di una economia più innovativa ed a "bassa emissione", che sappia unire la domanda per un'agricoltura sostenibile e per l'uso di risorse biologiche rinnovabili, per scopi industriali, assicurando al contempo protezione della biodiversità e dell'ambiente in generale.

In particolare dal presente progetto sarà possibile individuare le migliori condizioni di processo (T°, pH, HRT, OLR ecc.) per i vari "residui" utilizzati, le migliori percentuali di codigestione ed identificare consorzi microbici da potere impiegare in futuro come culture starter nei reattori. Tutti elementi che ad oggi non sono stati studiati a sufficienza, soprattutto per quello che riguarda gli scarti agrozootecnici quali liquame e scotta.

Tra gli ostacoli prevedibili durante lo svolgimento delle attività sperimentali è possibile che si incontrino difficoltà per la crescita dei consorzi microbici alle condizioni di processo date, ai substrati e alla codigestione previsti. Per ovviare a questo si potrebbero utilizzare microrganismi

provenienti da fonti alternative (quali i bentonici). Nelle analisi molecolari si potrebbero avere difficoltà di adattamento dei protocolli previsti, sviluppati per matrici di partenza diverse, per esempio nell' estrazione di RNA e DNA per le analisi in q-PCR e RT-qPCR per l'analisi di gene expression. Si dovrà provvedere in questo caso, allo sviluppo di protocolli specifici.

Infine, si potrebbero incontrare difficoltà nell'upgrading a scala di impianto pilota, sia per il mantenimento delle condizioni previste (T, agitazione, pH) per i volumi utilizzati, sia perché le condizioni reali non sono controllate e uniformi come quelle di laboratorio (variazione nei solidi volatili- SV). In questo caso bisognerà lavorare a stretto contatto con la task 3.B per adattare le condizioni di processo alle situazioni reali.

### ***3.1.8 piano di sfruttamento e divulgazione dei risultati***

Modalità di diffusione dei risultati;

I risultati saranno divulgati mediante:

- pubblicazioni sulle principali riviste nazionali ed internazionali;
- presentazione dei risultati a congressi nazionali ed internazionali;
- organizzazione di almeno 2 workshops per operatori del settore.

### ***3.1.9 Tabelle delle richieste finanziarie per singola azione***

**Tabella 3.1.9.1:** Attrezzature tecnico-scientifiche di cui si richiede il finanziamento.

**Tabella 3.1.9.2:** Richiesta complessiva di finanziamento per la task.