

PRODUZIONE INTEGRATA DI BIOETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE DA UNA COLTURA AGRARIA A BASSO CONSUMO IDRICO, IL SORGO ZUCCHERINO

“Il progetto MULTISORGO”

ROBERTO BALDUCCHI

ENEA - Unità Tecnica Tecnologie Trisaia
Centro Ricerche Trisaia, Matera

I. PISCIONERI, R. ALBERGO, A. AMBRICO, G. DI NATALE, O. MACCIONI, S. PALAZZO, M. TRUPO

ENEA - Unità Tecnica Tecnologie Trisaia
Laboratorio di Sviluppo Sostenibile della Produzione Primaria
Centro Ricerche Trisaia, Matera



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

PRODUZIONE INTEGRATA DI BIOETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE DA UNA COLTURA AGRARIA A BASSO CONSUMO IDRICO, IL SORGO ZUCCHERINO

“Il progetto MULTISORGO”

ROBERTO BALDUCCHI

ENEA - Unità Tecnica Tecnologie Trisaia
Centro Ricerche Trisaia, Matera

I. PISCIONERI, R. ALBERGO, A. AMBRICO, G. DI NATALE, O. MACCIONI, S. PALAZZO, M. TRUPO

ENEA - Unità Tecnica Tecnologie Trisaia
Laboratorio di Sviluppo Sostenibile della Produzione Primaria
Centro Ricerche Trisaia, Matera

Progetto finanziato dal:

Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali
D.M. 26282/7303/09 del 12/11/2009”

I Rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina
<http://www.enea.it/it/produzione-scientifica/rapporti-tecnici>

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.

PRODUZIONE INTEGRATA DI BIOETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE DA UNA COLTURA AGRARIA A BASSO CONSUMO IDRICO, IL SORGO ZUCCHERINO

“Il progetto MULTISORGO”

I. PISCIONERI, A. AMBRICO, R. ALBERGO, R. BALDUCCHI, G. DI NATALE, O. MACCIONI, S. PALAZZO, M. TRUPO

Riassunto

Il sorgo zuccherino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) è una coltura energetica tollerante la siccità, con una alta efficienza nell'utilizzo dell'azoto, e la sua biomassa per l'alta concentrazione di zuccheri liberi fermentabili è identificata come possibile materia prima nella produzione di etanolo. In questo lavoro l'attenzione è focalizzata sulla produzione di bioetanolo di seconda generazione dal residuo lignocellulosico derivante dalla spremitura della bagassa. La coltivazione del sorgo zuccherino è semplice ed economica, e potrebbe essere un'alternativa in particolare nelle regioni in cui le condizioni non sono favorevoli per la crescita di colture ricche in amido, come il mais. Diverse prove di campo sono state condotte al fine di selezionare le varietà di sorgo dolce per massimizzare la produzione di biomassa in condizioni di bassi input agronomici e poca irrigazione. Le piante della varietà Sucro 506 sono state tagliate e insilate in mini-silos di plastica in condizioni anaerobiche con diversi additivi per permettere la conservazione dello zucchero. I campioni di bagassa ottenuti dal materiale insilato, torchiati dopo tre e sei mesi, sono stati analizzati per il contenuto di fibre utilizzando diverse tecniche di estrazione. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad idrolisi enzimatica e fermentati per la produzione di bioetanolo di seconda generazione con il *Saccharomyces cerevisiae* ceppo M861/10a. Singoli campioni sono stati analizzati mediante gascromatografia e sono state stimate le rese percentuali in glucosio ed etanolo. Miglioramenti del rendimento in glucosio ed etanolo sono stati osservati rispetto alle diverse tecniche di insilamento, e differenze statisticamente significative sono state trovate come funzione del tempo insilamento.

Parole chiave: sorgo dolce, la fermentazione, il bioetanolo, la produzione di energia.

Summary

Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is a drought tolerant energy crop, with a high nitrogen use efficiency, identified as a possible ethanol feedstock because of its biomass yield and high concentration of fermentable free sugars. In this work the attention is focused on the production second generation bioethanol from lignocellulosic residue resulting from the pressing of the bagasse. The cultivation of sweet sorghum is easy and economic, and it could be an alternative in particular regions where conditions are not favorable for growing starch-rich crops, such as maize. Several field trials were conducted to select varieties of sweet sorghum to maximize biomass production under conditions of low agronomical inputs and reduced irrigation. The plants of SUCRO 506 variety were chopped and ensiled in plastic barrels under anaerobic conditions with different additives to allow the sugar preservation. The bagasse samples, obtained from the ensiled material crushed after three and six months, were analyzed for the content of fibers by using different extraction techniques. Then the samples were subjected to enzymatic hydrolysis and fermented with the M861/10a *Saccharomyces cerevisiae* strain for the production of 2nd generation bioethanol. Single samples were analyzed by gas-chromatography and the glucose and ethanol percentage yields were estimated. Improvements of the glucose and ethanol yield were observed with respect to the different ensiling techniques, and statistically significant differences were found as a function of ensiling time.

Keywords: sweet sorghum, fermentation, bioethanol, power generation.

INDICE

Il progetto MULTISORGO	pag. 9
- Obiettivi	pag. 10
- Risultati attesi	pag. 11
1. Introduzione	pag. 13
2. Aspetti agronomici	pag. 16
2.1 Aspetti generali ed obiettivi della ricerca	pag. 16
2.2 Metodologia sperimentale	pag. 17
2.3 Raccolta	pag. 19
2.4 Trinciatura, insilamento e caratterizzazione della biomassa	pag. 22
3. Caratterizzazione insilato, pretrattamento, idrolisi e fermentazione	pag. 28
3.1 Caratterizzazione insilato	pag. 28
3.2 Pretrattamento insilati	pag. 30
3.3 Idrolisi e fermentazioni insilati	pag. 32
4. Discussione e conclusioni	pag. 40
Bibliografia	pag. 41

Il progetto MULTISORGO

Il progetto MULTISORGO finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali con D.M. 26282/7303/09 è finalizzato alla realizzazione di un modello alternativo per la produzione di bioetanolo da sorgo zuccherino e quindi a favorire la diversificazione delle materie prime utilizzabili a fini energetici. Il Progetto coordinato dal Centro di Ecologia Teorica ed Applicata – C.E.T.A con sede in Gorizia ha come partner l'ENEA che partecipa come UTTRI-SSPP Trisaia ed il Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo (R.P.S.) afferente al Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura (C.R.A.)

Il sorgo zuccherino (*Sorghum bicolor* L. Moench) è una coltura utilizzabile anche a fini energetici tollerante la siccità, caratterizzata da elevata efficienza nell'utilizzo della risorsa idrica ed azotata. È considerata una interessante coltura alcoligena, in relazione alla sua elevata produzione di biomassa ed alla elevata concentrazione di zuccheri semplici fermentescibili nei culmi.

La coltivazione del sorgo zuccherino è semplice ed economica e rappresenta una valida alternativa in aree agricole dove le condizioni non sono favorevoli per la coltivazione di colture ricche di amido, come il mais. Il bagasso e la borlanda sono i principali sottoprodotti del processo di produzione di bioetanolo dal sorgo e rappresentano materie prime per ulteriori produzioni energetiche, quali i combustibili lignocellulosici, il biogas ed il bioetanolo di seconda generazione.

Il progetto Multisorgo intende studiare e valutare le potenzialità del sorgo zuccherino come coltura per la produzione di bio-energia. L'obiettivo principale del progetto è di ottimizzare tutti i singoli passaggi della filiera di produzione di bioetanolo dal sorgo zuccherino, focalizzando sulla conservazione degli zuccheri nel corso dello stoccaggio e sullo sfruttamento energetico dei sottoprodotti. Lo studio che riguarda le diverse filiere produttive coinvolte si propone di verificare la fattibilità economica dell'intera produzione di bioetanolo di I e II generazione, in modo da valutarne la convenienza indipendentemente dagli incentivi economici. L'approccio integrato, con cui sono affrontate le diverse filiere produttive orientato all'ottimizzazione del recupero energetico ed economico dei sottoprodotti può contribuire a ridurre significativamente l'attuale differenziale tra il costo di produzione del bioetanolo e quello dei concorrenti fossili. L'obiettivo finale è quello di proporre un modello sostenibile per la produzione di biocarburanti dal sorgo zuccherino, in impianti decentralizzati, nel rispetto dei restrittivi parametri imposti dalla Direttiva RES, non dimenticando inoltre valutazioni inerenti il mantenimento della fertilità del suolo. La finalità ultima, infatti, è quella di svincolare dalla necessità di incentivi la fattibilità economica della filiera del bioetanolo. Sono stati individuati due siti per la prova produttiva del Sorgo, in Friuli Venezia Giulia (CETA) e in Basilicata (ENEA).

L'impiego di una coltura energetica a basso fabbisogno idrico è suggerito dalle previsioni di un ridimensionamento delle disponibilità di acqua nel medio termine, per effetto dei cambiamenti climatici. Nel contesto del Progetto proposto, il bioetanolo sarà prodotto come biocarburante di prima generazione dall'estratto zuccherino, seguendo la sezione saccarifera della filiera, e come biocarburante di seconda generazione dal bagasso, residuo della separazione solido-liquido, seguendo la sezione lignocellulosica. La filiera per la produzione del biogas si inserirà in quella del bioetanolo, consentendo di ottimizzare il recupero dei suoi sottoprodotti, ossia il bagasso e la borlanda, residui della distillazione. Nell'ambito della sperimentazione sono state condotte delle prove agronomiche di coltivazione del sorgo zuccherino in diversi contesti territoriali nazionali (Friuli Venezia Giulia e Basilicata). Durante le prove vertenti su diverse varietà sono stati monitorati gli input energetici e la risorsa idrica utilizzata.

Obiettivi.

Prove agronomiche e di insilamento del sorgo zuccherino: saggiare il sorgo zuccherino, quale coltura alcoligena a basso fabbisogno idrico, in alcuni contesti territoriali italiani, differenti per condizioni pedologiche e climatiche (i.e. Friuli Venezia Giulia, Basilicata), e valutare l'insilamento come tecnica di conservazione degli zuccheri da applicare nella filiera agro-energetica.

- Modello alternativo per la produzione di bioetanolo nel breve termine: ottimizzare gli aspetti tecnologici e logistici per proporre un modello di filiera corta da avviare nel breve termine per produrre il bioetanolo di prima e seconda generazione dal sorgo zuccherino, in modo da contribuire a raggiungere gli obiettivi indicativi di incorporazione, coinvolgendo anche il comparto agricolo, tradizionalmente escluso da questa filiera energetica. Il modello elaborato potrà essere successivamente replicato anche in realtà non considerate nel Progetto e ugualmente vocate alla coltivazione del sorgo zuccherino.

- Sostenibilità della produzione del bioetanolo nel breve e medio termine: migliorare la sostenibilità della filiera del bioetanolo, valorizzando i sottoprodotti mediante la produzione di biogas e bioetanolo lignocellulosico; nel breve termine la biometanazione del bagasso e della borlanda e la combustione del biogas ottenuto in un'unità cogenerativa possono contribuire al fabbisogno energetico del processamento a bioetanolo di prima generazione, migliorando il bilancio energetico e riducendo il consumo di fonti fossili; nel medio termine la conversione del bagasso a bioetanolo lignocellulosico può contribuire a ottimizzare la resa agronomica in biocarburante, migliorando lo sfruttamento dei terreni agrari, mentre la borlanda di distillazione potrà continuare ad alimentare la biometanazione. Entrambi gli approcci consentono di ridurre il costo di produzione del bioetanolo,

contribuendo a svincolare la filiera dalle politiche di defiscalizzazione: nel primo caso inserendo la vendita dell'energia (*in primis* elettrica) tra le voci di ricavo e risparmiando sull'acquisto delle fonti primarie, nel secondo caso anche incrementando la produttività in bioetanolo dei terreni.

Nello specifico si è provveduto a:

- Realizzare dei campi sperimentali di sorgo zuccherino in Friuli Venezia Giulia e Basilicata, testando diverse varietà caratterizzate da un elevato contenuto di zucchero nel culmo.
- Realizzare dei mini-silos, testando diversi additivi coadiuvanti l'insilamento.
- Testare diversi ceppi di *S. cerevisiae* per ottimizzare la fermentazione alcolica dell'estratto zuccherino, ottenuto per separazione solido-liquido dai culmi del sorgo.
- Stimare le rese in bioetanolo di prima generazione conseguite nei diversi contesti territoriali considerati.
- Definire la migliore modalità di gestione del digestato.
- Stimare i consumi energetici della produzione del bioetanolo di prima generazione.
- Stimare le emissioni di anidride carbonica della produzione del bioetanolo di prima generazione.
- Contribuire all'ottimizzazione del pretrattamento del bagasso (e.g. tipologia di agente, durata, condizioni ambientali).
- Contribuire all'ottimizzazione dell'idrolisi enzimatica del bagasso pretrattato (e.g. ceppo microbico o enzima commerciale, durata, condizioni ambientali).
- Contribuire all'ottimizzazione della co-fermentazione alcolica degli zuccheri esosi e pentosi (e.g. ceppi microbici, durata, condizioni ambientali).
- Stimare le rese conseguite per il bioetanolo lignocellulosico.
- Stimare i consumi energetici della produzione del bioetanolo lignocellulosico dal bagasso.
- Stimare le emissioni di anidride carbonica della produzione del bioetanolo lignocellulosico.

Risultati attesi

- Definire gli input colturali (i.e. idrici, energetici, fitochimici) ed il conseguente costo colturale del sorgo zuccherino nei contesti territoriali considerati, in relazione alle rese agronomiche conseguite in termini di biomassa e zucchero.
- Individuare delle varietà di sorgo con elevate rese in biomassa e zucchero.
- Valutare l'effetto della coltivazione del sorgo zuccherino sulla fertilità del suolo nei contesti territoriali considerati.
- Individuare la migliore tecnica di insilamento per la preservazione degli zuccheri nella biomassa trinciata di sorgo zuccherino.

- Identificare le tecnologie ottimali per il processamento della biomassa del sorgo a bioetanolo di prima generazione (i.e. separazione solido-liquido, fermentazione).
- Identificare i parametri di processo ottimali per la biometanazione dei sottoprodotti del processamento del sorgo zuccherino (e.g. tempo di ritenzione idraulica, temperatura, pH, miscelazione tra i substrati).
- Individuare la logistica ottimale per l'alimentazione di un impianto di taglia medio-piccola (≤ 10.000 t/anno) nell'ambito di una filiera corta nei contesti territoriali considerati.
- Stimare i rendimenti ed i ricavi conseguibili attraverso il recupero energetico dei sottoprodotti mediante la biometanazione e la cogenerazione.
- Valutare la redditività dell'investimento per la produzione del bioetanolo di prima generazione dal sorgo zuccherino.
- Stimare la riduzione conseguita nel costo di produzione del bioetanolo di prima generazione a seguito della valorizzazione dei sottoprodotti.
- Stimare l'incremento conseguito nel bilancio energetico dell'intero processamento della biomassa a bioetanolo di prima generazione (i.e. fase agronomica, fasi di condizionamento e trasformazione).
- Stimare il risparmio nelle emissioni di gas serra conseguibile con la produzione del bioetanolo di prima generazione dal sorgo zuccherino ai sensi della Risoluzione legislativa del Parlamento europeo del 17 dicembre 2008 {COM(2008)0019 – C6-0046/2008 – 2008/0016(COD)}.
- Stimare la replicabilità del modello delineato anche all'interno di aree geografiche non considerate nel Progetto ma vocate per il sorgo zuccherino.
- Identificare le soluzioni ottimali per sostenibilità tecnica, energetica ed ambientale, tra quelle studiate per il processamento del bagasso a bioetanolo lignocellulosico.

1. Introduzione

Tra le fonti rinnovabili di energia, il bioetanolo ed il biogas assumono un ruolo di primaria importanza poiché contribuiscono alla riduzione dei combustibili fossili nei settori del trasporto e della generazione elettrica e termica, comparti che danno il più alto contributo alle emissioni di gas serra. Il bioetanolo, che si intende produrre dalla fermentazione dell'estratto zuccherino e dal processamento del bagasso del sorgo, trova applicazioni principalmente nell'autotrazione, dove è in grado di sostituire la benzina nei motori a ciclo Otto. La scelta a favore di una coltura, che alimenta contestualmente queste due filiere per la sostituzione dei prodotti petroliferi, tanto nel settore dei trasporti, quanto nella produzione energetica, è strategica, poiché massimizza lo sfruttamento dei terreni dedicati all'agroenergia, contenendo, dunque, la competizione con le filiere agroalimentari. Il sorgo zuccherino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], pianta interessante per la produzione di mangimi, fibra, carta e prodotti energetici (Barbanti L. *et al.*, 2006), sposa pienamente questo approccio, poiché è caratterizzato da elevate rese in biomassa (65-90 t/ha come tal quale, 20-30 t/ha come sostanza secca, s.s.), zucchero (6-8 t/ha) e, quindi, in bioetanolo (3,3-4,3 t/ha), cui si accompagna un'abbondante produzione di sottoprodotti (bagasso residuo della spremitura dei culmi: 24-28 t/ha con umidità 50-55 %; borlanda di distillazione: 30-35 m³/ha con sostanza secca 15-23 %), il cui recupero come biogas è ampiamente in grado di coprire il fabbisogno termico ed elettrico dell'intero processo.

La scelta a favore del sorgo zuccherino, pianta C4 e quindi con una maggiore efficienza fotosintetica coltivabile dai climi temperati ai climi caldi ed aridi, appare premiata anche da considerazioni di ordine ambientale in virtù delle sue strutture morfologiche come cuticola spessa, stomi piccoli, apparato radicale esteso. La pianta di sorgo è in grado di massimizzare lo sfruttamento delle risorse idriche (Curt M. D. *et al.*, 1995) e dei nutrienti naturalmente presenti nel terreno, presentando una elevata resistenza alla salinità (Vasilakoglou I., *et al.*, 2011) con una ampia adattabilità ad ambienti diversi (Janssen R., *et al.*, 2010). Inoltre ha la capacità di entrare in stasi vegetativa rallentando i processi vitali in caso di "stress" idrico che gli permette di riprenderli con danno limitato appena si siano ripristinate più favorevoli condizioni idriche, a differenza di quanto avviene nel mais dove lo stress idrico arresta la crescita irreparabilmente. Per avere delle buone produzioni è necessario che tra le riserve d'acqua del terreno e apporti di piogge durante il ciclo vitale si debba poter contare su una quantità d'acqua stimabile intorno a 300-350 mm. In terreni profondi e a buona capacità di ritenzione idrica bastano 120-150 mm di pioggia, distribuite nei mesi estivi, per assicurare rese soddisfacenti dal punto di vista tecnico ed economico. Ne consegue che il

fabbisogno idrico della coltura è significativamente ridotto rispetto a quello di altre specie alcoligene coltivabili nella fascia temperata (sorgo zuccherino: 250 m³/t s.s.; mais: 500 m³/t s.s.; barbabietola: 750 m³/t s.s.) come anche la richiesta di azoto (sorgo zuccherino: 119 kg/ha; mais: 250 kg/ha; barbabietola: 120 kg/ha) ed il relativo rischio di lisciviazione dei nitrati sono più contenuti. La coltura del sorgo zuccherino viene riprodotta da seme e può essere completamente meccanizzata (Reddy B.V.S., *et al.*, 2005), utilizzando le normali dotazioni di macchine ed attrezzature presenti in una azienda agricola specializzata in colture come il mais. Il sorgo zuccherino è considerato un'ottima fonte per la produzione di etanolo per la sua rapida crescita, ciclo breve ed il suo alto valore energetico totale (Smith G.A., *et al.*, 1993). Alcuni aspetti critici che attualmente ostacolano lo sviluppo di questa filiera e che, pertanto, sono stati scelti come oggetto della ricerca proposta, sono: la modalità di preservazione degli zuccheri nella biomassa trinciata, la fermentazione alcolica dell'eterogenea miscela di zuccheri dell'estratto (saccarosio, glucosio, fruttosio), la co-digestione anaerobica dei sottoprodotti con altri substrati (e.g. liquami zootecnici) ed il processamento del bagasso a bioetanolo lignocellulosico. L'impiego energetico del sorgo è penalizzato dall'elevata fermentescibilità della sua biomassa, a causa dell'abbondante presenza di acqua e zucchero. A fronte dell'insostenibilità economica di un impianto che processi la biomassa solo durante la raccolta (al massimo due mesi, tra settembre ed ottobre), l'insilamento derivato come modello dalla foraggicoltura appare una strategia adeguata a conservare gli zuccheri nella biomassa (zuccheri conservati 65%, secondo la letteratura scientifica) ed alimentare l'impianto di trasformazione durante l'intero anno solare. Gli svantaggi di questa tecnica sono i grossi volumi di stoccaggio e le perdite di zuccheri durante il periodo di insilamento (Bennett S.A., *et al.*, 2009). I principi di conservazione alla base dell'insilamento sono l'anaerobiosi e l'acidità (pH < 4), impostate nella biomassa trinciata e compattata (densità 650-700 kg/m³) ad opera dei batteri lattici eterofermentanti obbligati, che convertono il glucosio in quantità equimolari di acido lattico, acido acetico ed alcol etilico, e dei batteri eterofermentanti facoltativi, che producono prevalentemente acido lattico. L'acidificazione può essere favorita inoculando ceppi batterici con elevata produzione di acido lattico (*Lactobacillus plantarum*) o aggiungendo acidi organici come l'acido formico (Schmidt J., *et al.*, 1997). In merito alla fermentazione alcolica dell'estratto zuccherino, la letteratura scientifica sottolinea una certa recalcitranza dei ceppi di *S. cerevisiae* finora testati a convertire ad etanolo gli zuccheri in concentrazione di 100-150 g/l e con composizione complessa, presumibilmente a causa delle interazioni che si instaurano tra le differenti vie cataboliche; l'ottimizzazione della fermentazione è pertanto, un prerequisito essenziale a sviluppare questa filiera innovativa. La scelta di produrre il biogas ricorrendo alla co-digestione di vari substrati (bagasso come materiale ricco in fibra, liquami zootecnici come inoculo microbico, borlanda come

integratore di macronutrienti e micronutrienti) rende la biometanazione più stabile e gestibile, con il conseguente miglioramento delle rese; le fonti bibliografiche indicano che il biogas prodotto con l'approccio adottato è in grado di coprire il fabbisogno elettrico e termico del processamento a bioetanolo. La conversione del bagasso a bioetanolo lignocellulosico (bioetanolo di seconda generazione) è un settore in cui la ricerca scientifica sta investendo intensamente. Le fasi più critiche sono il pretrattamento, l'idrolisi enzimatica e la co-fermentazione degli zuccheri esosi e pentosi. Il pretrattamento è finalizzato a disgregare la struttura della parete cellulare, dove la cellulosa e l'emicellulosa, precursori del bioetanolo, sono legate alla lignina. Il pretrattamento si avvale dell'impiego di agenti chimici, enzimi, microrganismi o di processi chimico-fisici. La successiva idrolisi delle catene polisaccaridiche di cellulosa ed emicellulosa è conseguita con gli enzimi commerciali liberi o con l'inoculo dei relativi microrganismi. La fermentazione degli zuccheri esosi ottenuti è condotta generalmente con *S. cerevisiae*, mentre la conversione in bioetanolo degli zuccheri pentosi derivanti dall'emicellulosa (arabinosio, xilosio) si avvale di diversi microrganismi in corso di studio (*Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, ecc.). L'ottimizzazione del processamento del bagasso potrà incrementare significativamente le rese di bioetanolo dal sorgo.

Nei capitoli successivi vengono illustrati brevemente i principali dati conseguiti dalla Unità Operativa ENEA nel corso del primo anno di sperimentazione relativamente al progetto MULTISORGO. I risultati preliminari che vengono riportati riguardano la produzione agronomica del sorgo zuccherino, seguiti dai dati relativi alla raccolta e caratterizzazione della biomassa, dall'insilamento e caratterizzazione dell'insilato alla produzione di bioetanolo di seconda generazione dal bagasso.

2. Aspetti agronomici

2.1 Aspetti generali ed obiettivi della ricerca

Le prove agronomiche si propongono come primo obiettivo quello di valutare l'adattabilità di alcune varietà di sorgo zuccherino alle condizioni pedoclimatiche del sito di sperimentazione, le cui caratteristiche più salienti sono riportate in tabella.1.

ENEA C.R. Trisaia S.S. 106 Ionica, km 419,500 75026 Rotondella (MT)	
Localizzazione	
Latitudine	40° 09' N
Longitudine	16° 38' E
Altitudine	30 m sul livello del mare
Caratteristiche climatiche	Clima con estati secche
Tipo di terreno	Di medio impasto tendente argilloso, con bassa percentuale di sostanza organica

Tabella 1. Dati del sito

Il secondo obiettivo è quello di individuare, tra le varietà a confronto, quella/e che riesce/ono a massimizzare la produzione di biomassa in condizioni di bassi *input* irrigui. Il terzo obiettivo sarà quello di individuare la migliore tecnica di insilamento per la preservazione degli zuccheri nella biomassa trinciata da utilizzare successivamente a fini energetici.

2.2 Metodologia sperimentale

Complessivamente sono state confrontate 3 varietà di sorgo zuccherino fornite da due Ditte Sementiere, come riportato in Tabella 2. Le diverse varietà sono state seminate in parcelle replicate 3 volte.

Varietà	Ditta Fornitrice
SUCRO 506	Syngenta Seeds S.p.A.
SUGARGRAZE	Padana Sementi Elette
NECTAR	Padana Sementi Elette

Tabella 2. Varietà di sorgo

Le parcelle sono state dimensionate in base alle esigenze sperimentali, con un investimento in superficie complessiva superiore ad un ettaro. Lo schema di semina tipo è riportato in figura 1

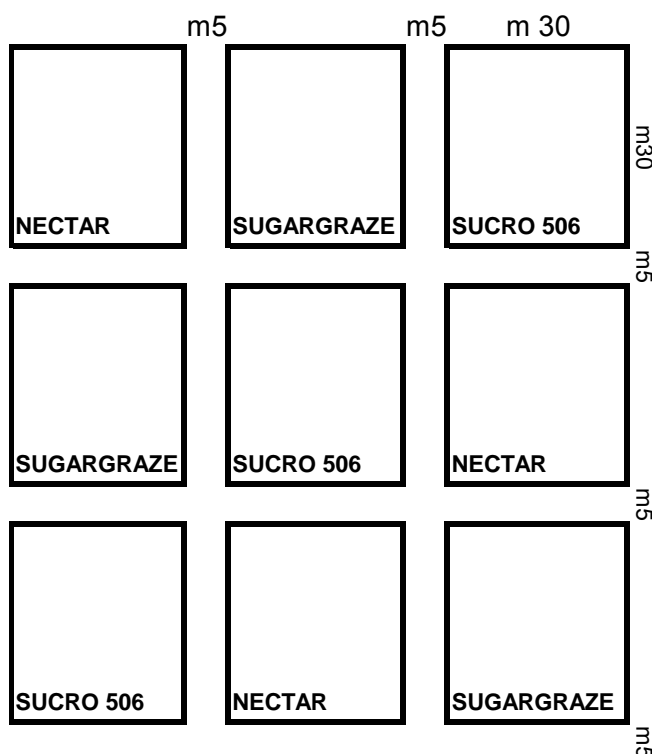


Figura 1: Schema Multisorgo 2010

La semina è stata effettuata nei primi giorni di maggio 2010, con qualche giorno di ritardo sulle previsioni, a causa delle frequenti precipitazioni. E' stata utilizzata una seminatrice parcellare (foto 1). Per un efficiente utilizzo della seminatrice, la distanza tra le file è stata regolata a 45 cm. Sono stati utilizzati circa 8 Kg/ha di seme.

L'aratura principale è stata eseguita durante il mese di marzo 2010. In questa fase sono stati prelevati sei campioni di terreno per le successive analisi chimiche come supporto indispensabile nella elaborazione di un corretto piano di concimazione.

Successivamente durante il mese di aprile è stata eseguita una frangizzollatura seguita da alcune fresature del terreno per una accurata preparazione del letto di semina.

La concimazione di fondo e la successiva concimazione di copertura è stata effettuata tenendo conto dei risultati delle analisi. L'apporto in macroelementi è stato di:

- 60 unità di N in presemina e 20 in copertura;
- 50 U di P₂O₅ in presemina;
- 50 U di K₂O in presemina.

L'emergenza è iniziata il dopo circa una settimana ed ha riguardato tutte le tre varietà di sorgo messe a confronto. Da questo momento ci siamo trovati di fronte ad un lungo periodo di bassa precipitazione (figura 2) che ha comportato delle pesanti ripercussioni sull'andamento della coltura, inizialmente programmata come coltura in asciutta. Al fine di non compromettere l'avvio del Progetto con il rischio di non avere materiale a sufficienza per la successiva fase di insilamento è stata presa la decisione di sottoporre un intero settore della coltura ad irrigazioni di soccorso con un apporto di circa 1500 m³/ha di acqua in totale.



Foto 1. Seminatrice parcellare

Per il controllo delle infestanti è stata adottata la tecnica della falsa semina consistente in una doppia fresatura a distanza di due/tre settimane della superficie destinata alla semina. Considerato il successivo lento sviluppo delle erbe infestanti non è stato necessario il loro controllo né chimico né meccanico, ad esclusione delle aree perimetrali intorno alle parcelle. Diversi rilievi fisiologici e produttivi sono stati effettuati durante il ciclo colturale, quali: percentuale di germinazione, durata del ciclo e delle principali fasi fenologiche, altezza, investimento reale, produzione di biomassa fresca e secca, accumulo di zuccheri, eventuali fisiopatie.

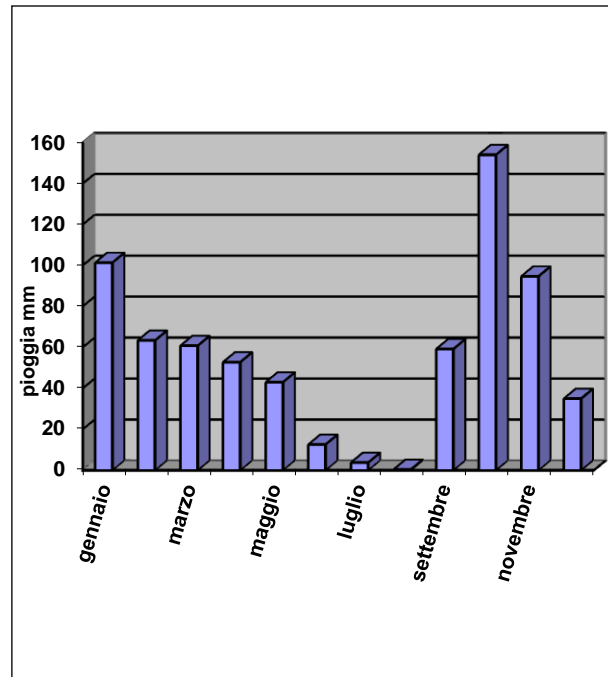


Figura 2. Sommatoria delle precipitazioni anno 2010

2.3 Raccolta

La coltura è stata raccolta nei giorni dal 7 al 16 settembre 2010 corrispondente con l'inizio della fase fenologica di maturazione cerosa (foto 2).



Foto 2: Sorgho alla raccolta

Nella figura 3 sono riportati i principali dati produttivi delle tre varietà di sorgo oggetto di sperimentazione.

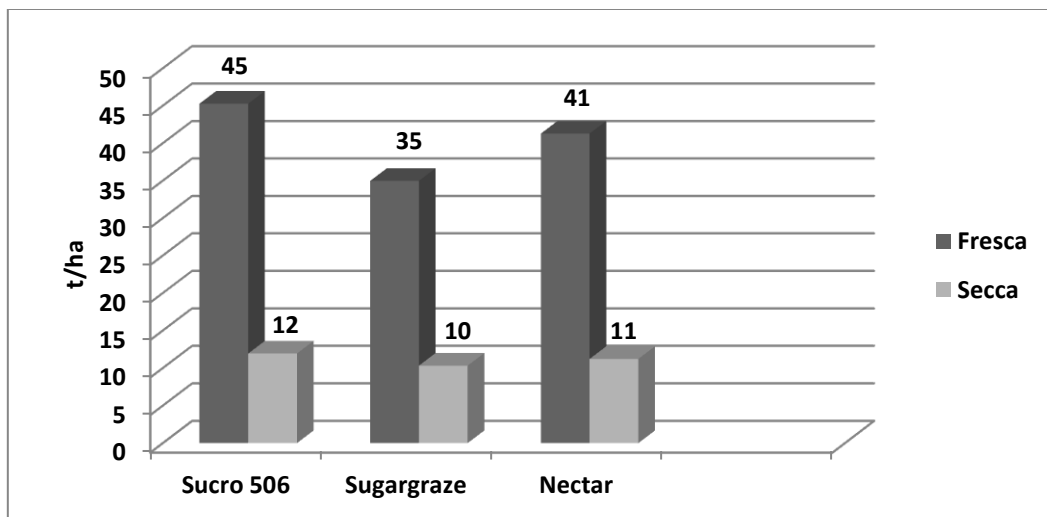


Figura 3. Confronto biomassa fresca e secca per coltura irrigua

Vengono riportati anche i dati relativi alla parte di coltura lasciata in asciutta dove le produzioni risultano molto più basse, nonostante la raccolta sia avvenuta il 21 ottobre, dopo che la coltura ha ripreso in parte a vegetare in seguito ai primi temporali. Nelle Fig.4,5,6 viene evidenziato il confronto di alcuni importanti valori tra la coltura sottoposta ad irrigazione di soccorso e la coltura in asciutta.

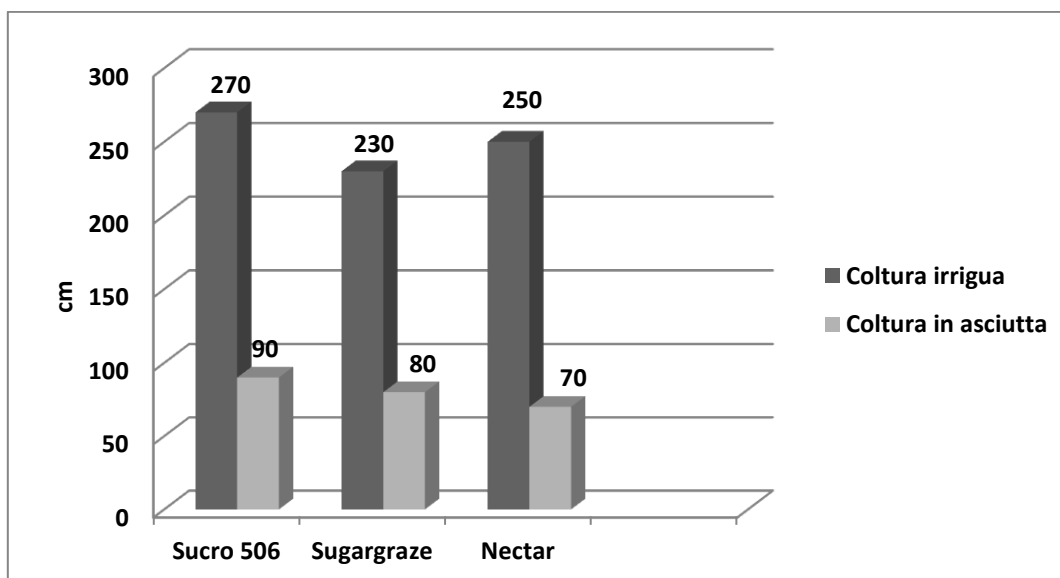


Figura 4. Altezza delle piante coltivate in asciutta e con irrigazione di soccorso.

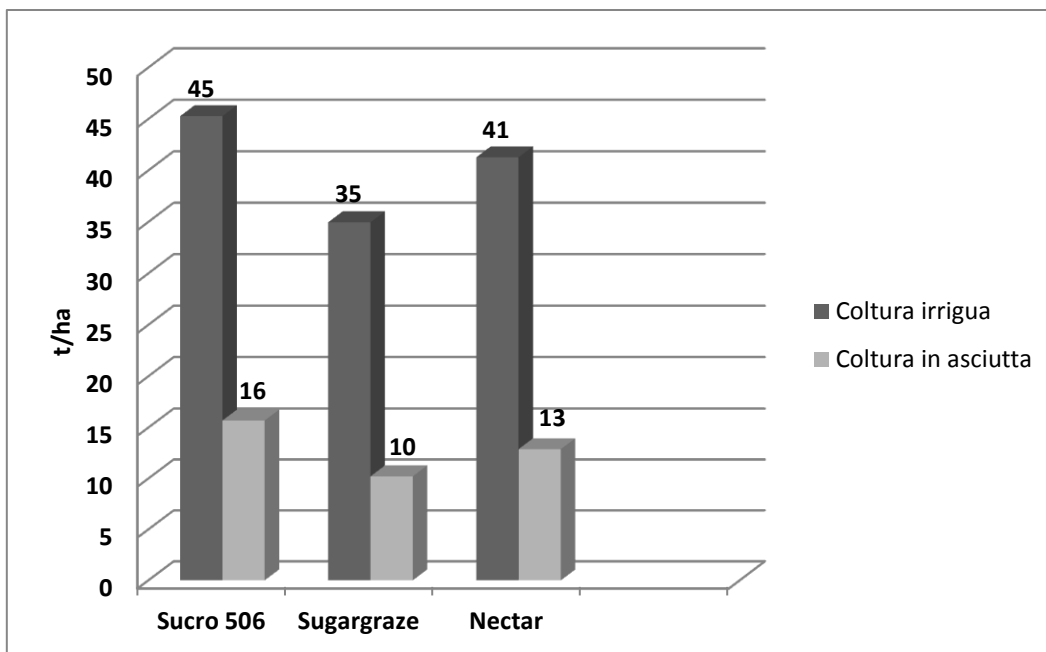


Figura 5. Biomassa fresca t/ha prodotta nelle Coltura irrigua/Coltura in asciutta

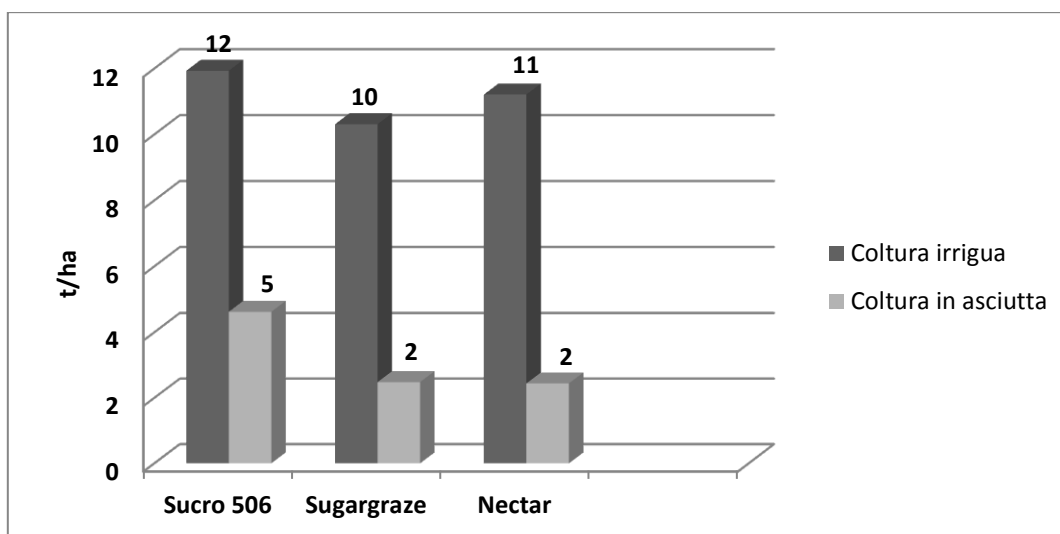


Figura 6. Biomassa secca t/ha. Confronto Coltura irrigua/Coltura in asciutta

Lo sviluppo dell'apparato radicale delle 3 varietà è stato rilevato misurando il peso delle radici. La varietà Sucro 506 ha prodotto una massa radicale notevolmente superiore alle altre due varietà in prova raggiungendo il peso di 7 t/ha.

L'assenza di irrigazione nella coltura in asciutta ha determinato una riduzione dello sviluppo radicale rispetto alla coltura irrigua i cui valori sono di circa 3, 3 e 2 t/ha rispettivamente per le varietà Sucro 506, Sugargraze e Nectar (Figura 7)

Nella figura 7 sono riportati i dati relativi allo sviluppo dell'apparato radicale relativo alle tre varietà.

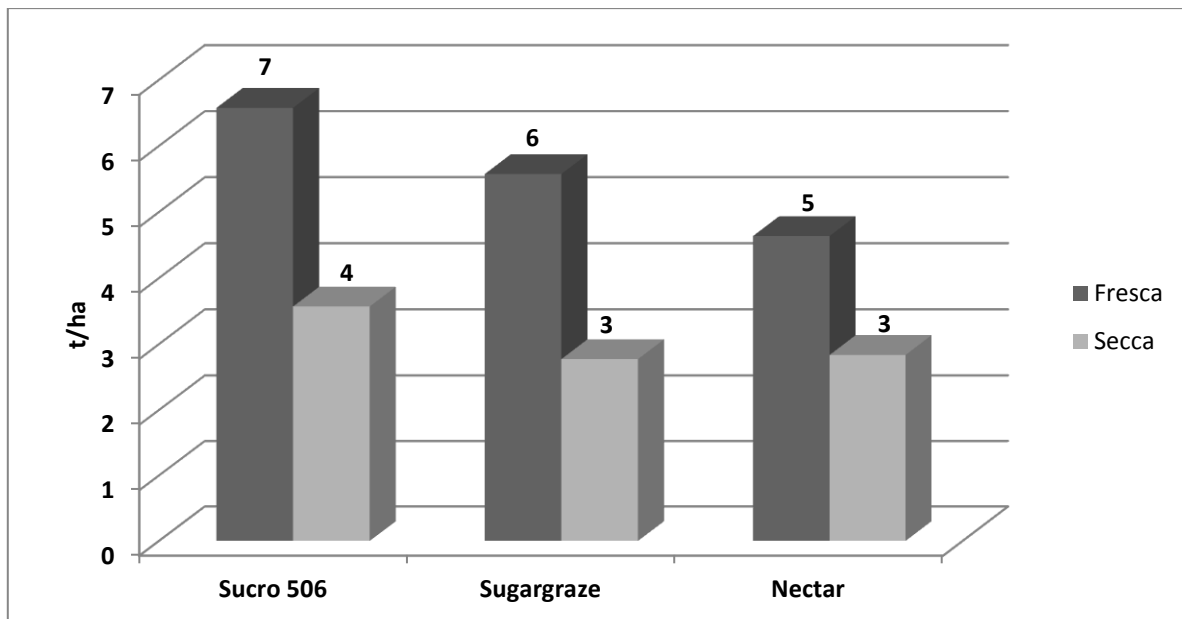


Figura 7. Peso biomassa radici

Il confronto fra i dati produttivi delle diverse varietà ci permette di trarre alcune importanti considerazioni. Nella coltura sottoposta ad irrigazione le tre varietà si sono comportate similmente dal punto di vista produttivo. La varietà SUCRO 506 invece è apparsa molto più rustica sia in vigoria che per resistenza agli stress da fattori ambientali, comportamento che appare più evidente nella coltura in asciutta (4,62 t/ha di s.s.) dove ha dato una produzione doppia rispetto alle altre due varietà. Dall'esame di questi primi dati produttivi si può affermare che alle condizioni pedoclimatiche che caratterizzano il nostro sito di sperimentazione non è possibile pensare di procedere alla coltivazione del sorgo in asciutta senza assumersi il rischio di veder compromessa in alcune annate l'intera produzione. La varietà SUCRO 506 oltre che per il portamento più vigoroso, dai primi dati di resa è anche la più produttiva in biomassa totale per ettaro.

2.4 Trinciatura, insilamento e caratterizzazione della biomassa

In contemporanea ad ogni giornata di raccolta si è proceduto alla trinciatura e successivo insilamento della biomassa. Per le fasi di trinciatura è stato utilizzato un tritatore a martelli (Foto 3) portando la biomassa a dimensioni tra mezzo centimetro e due centimetri.



Foto 3. Tritratore



Foto 4. Minisilos

Come silos sono stati utilizzati fusti in plastica da 50 litri (Foto 4). A detti fusti è stata applicata una valvola di sicurezza per lo sfiato di eventuali gas prodotti durante la fase di stoccaggio. Sono stati riempiti di biomassa fresca della varietà SUCRO 506 diciotto minisilos e portati alla densità di 650-700 kg/m³. Sono state allestite tre tesi replicate ciascuna tre volte: inoculo microbico, additivazione di un acido organico, controllo negativo (senza inoculi o additivi). Per contrastare l'eventuale sviluppo di microrganismi aerobici che potrebbero deteriorare la biomassa si è proceduto con l'inoculo di un ceppo di *Lactobacillus plantarum*. In alternativa la stabilizzazione della biomassa può avvenire in seguito all'apporto di acidi organici e nella sperimentazione si è intervenuti con l'aggiunta dello 0,5% di acido formico rispetto alla biomassa fresca insilata. La biomassa trinciata è stata caratterizzata determinando il contenuto in umidità, zuccheri, sostanza solubili al detergente neutro (fibra solubile o NDS), contenuto percentuale in fibra non solubile (emicellulosa, cellulosa e lignina) e ceneri.

Il contenuto di fibre del sorgo tal quale è stato ottenuto utilizzando il metodo di Van Soest (Van Soest *et al*, 1979). La biomassa viene dapprima macinata, seccata e setacciata in maniera tale da passare attraverso un setaccio con pori di 1 mm (18 mesh). Un grammo della biomassa così preparata è pesato in un crogiuolo di vetro con la base fornita di pori del diametro di 45µm. Il crogiuolo con la biomassa è quindi messo nell'estrattore Velp FIWE 6 (Foto 5) che può alloggiare fino ad un massimo di 6 crogiuoli per analisi. A questo punto vengono aggiunti a freddo 100 ml di soluzione detergente neutra composta come indicato in tabella 3



Foto 5 : Analizzatore di fibre VELP FIWE 6 usato per l'analisi delle fibre del sorgo prima e dopo il pretrattamento

Specie	Conc.
Na₂B₄O₇·10H₂O	0,018 M
EDTA	0,055 M
Sodio lauril solfato	0,1 M
2-Etossietanolo	0,1 M
Na₂HPO₄	0,033M

Tabella 3. Composizione della soluzione al detergente neutro

La soluzione è riscaldata fino all'ebollizione e quindi mantenuta per 60 minuti.

Al termine del riscaldamento la soluzione viene filtrata e lavata per 3 volte con acqua distillata bollente e successivamente 2 volte con acetone freddo. Con questo metodo vengono solubilizzati i carboidrati solubili, la maggior parte delle proteine, i lipidi e le sostanze minerali solubili. Il contenuto solubile compone i cosiddetti estrattivi o fibra solubile (NDS). Il residuo invece rappresenta i costituenti fibrosi delle cellule vegetali: emicellulosa, cellulosa, lignina e ceneri (NDF).

Il residuo è quindi seccato in stufa a 105°C per un minimo di 8 h e comunque fino a peso costante.

Il residuo NDF è quindi ulteriormente trattato con 100 ml di soluzione al detergente composta come indicato in tabella 4.

Specie	Conc.
C₁₉H₄₂O₇BrN	0,08 M
H₂SO₄	1 N

Tabella 4. Composizione della soluzione al detergente acido

La soluzione è riscaldata fino all'ebollizione e quindi mantenuta per 60 minuti.

Al termine del riscaldamento la soluzione viene filtrata e lavata per 3 volte con acqua distillata bollente e successivamente 2 volte con acetone freddo. Con questo metodo viene solubilizzata selettivamente l'emicellulosa così che il residuo risulta essere costituito solamente da cellulosa, lignina e ceneri (ADF).

Il residuo è quindi seccato in stufa a 105°C per un minimo di 8 h e comunque fino a peso costante.

La differenza tra NDF ed ADF rappresenta il contenuto percentuale di emicellulosa.

Il residuo ADF è infine trattato con 25 ml di H₂SO₄ al 72% a freddo e per 3 h, avendo cura di agitare il campione ogni ora.

Al termine dell'estrazione il campione è filtrato e lavato con acqua bollente fino a neutralità, seccato a 105°C per 8 h e comunque fino a peso costante.

Con questo metodo viene solubilizzata esclusivamente la cellulosa mentre il residuo è costituito da lignina e ceneri (ADL).

La differenza tra ADF ed ADL rappresenta il contenuto percentuale di cellulosa.

A questo punto i crogiuoli in cui ormai è rimasto solo il residuo ADL, sono introdotti in una muffola dove il residuo ADL è incenerito a 600°C per 2 h. Una volta raffreddati in essiccatore, i campioni sono quindi pesati per la determinazione delle ceneri.

Nella figura 8 vengono riportati i dati relativi alla caratterizzazione della biomassa al momento della trinciatura.

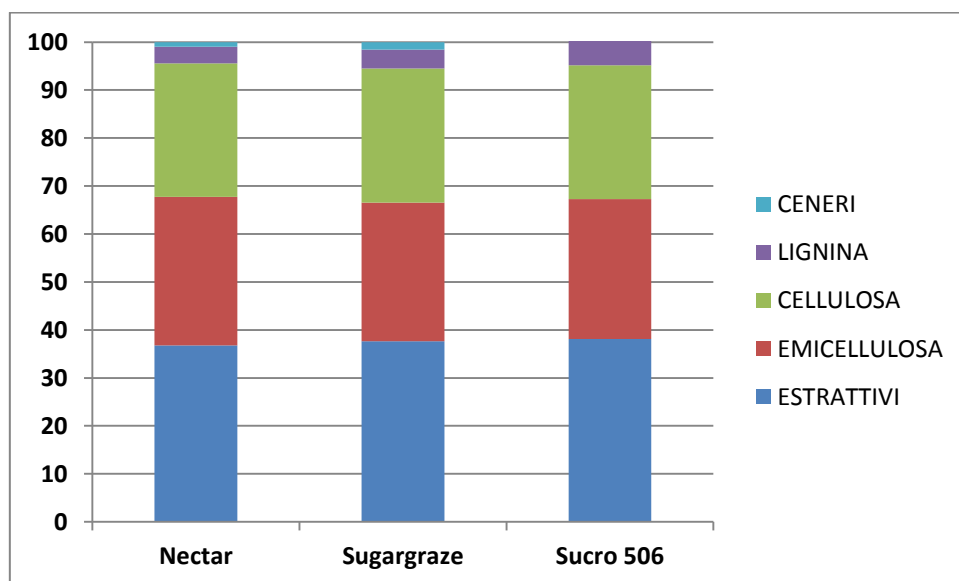


Figura 8. Composizione delle tre varietà di sorgo

In figura 9, sono riportati i contenuti di zuccheri della biomassa trinciata.

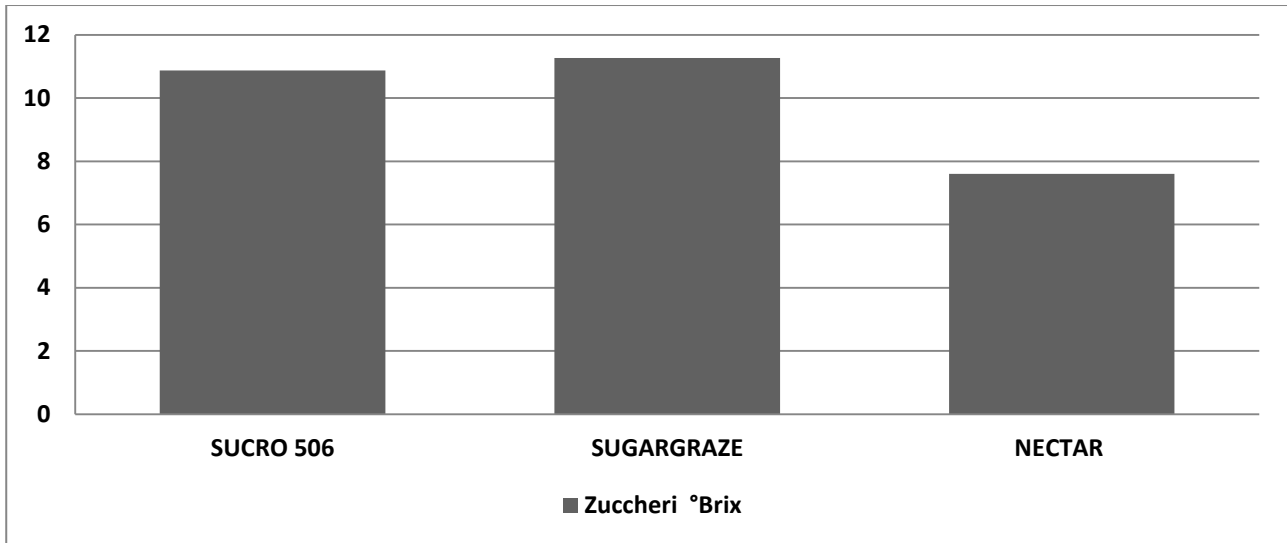


Figura 9. Contenuto zuccheri liberi delle tre varietà di sorgo considerato

3 Caratterizzazione insilato, pretrattamento, idrolisi e fermentazione

3.1 Caratterizzazione insilato

L'apertura dei minisilos come previsto dal Progetto, è avvenuta a distanza di tre e sei mesi dall'insilamento, e cioè a dicembre 2010 ed a marzo 2011. All'apertura dei minisilos la biomassa si presentava ben conservata caratterizzata da un colore verde oliva e da un odore gradevole con una punta di acidulo (Foto 6).



Foto 6. Insilato di sorgo

Campioni di biomassa, sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione della percentuale di sostanza secca (DM), del pH, del contenuto di zuccheri espresso in gradi Brix, i cui valori sono riportati nelle tabelle 6 e 7. Dai valori di pH e dai valori ancora alti degli zuccheri espressi in gradi Brix si evidenzia la buona riuscita della tecnica di conservazione (Tabelle 5 e 6).

Viene di seguito riportata una breve nota per la lettura delle tabelle successive:

C-Controllo (SUCRO 506 come spiegato precedentemente); AF-aggiunta acido formico;

L-aggiunta di *Lactobacillus*; (a) -insilato a tre mesi di conservazione; (b) - insilato a sei mesi di conservazione.

	% DM	pH	°Brix
C I a	27.53	3.7	7.7
C II a	24.71	3.7	7.9
C III a	23.66	3.8	8.0
AF I a	29.97	3.9	8.0
AF II a	23.78	3.8	7.9
AF III a	24.36	3.8	6.2
L I a	28.30	3.9	8.0
L II a	24.11	3.8	7.8
L III a	26.63	3.8	7.6

Tabella 5. Dati insilato a tre mesi

	% DM	pH	°Brix
C I b	28.71	3.7	7.4
C II b	29.32	3.8	7.2
C III b	20.89	3.6	6.1
AF I b	29.17	3.8	8.1
AF II b	26.03	3.9	7.1
AF III b	21.36	3.8	6.0
L I b	23.96	3.8	6.8
L II b	26.03	3.7	5.9
L III b	23.45	3.8	7.4

Tabella 6. Dati insilato a sei mesi

Nelle figure 10 e 11 sono riportati i dati relativi al contenuto di fibre dell'isilato al momento dell'apertura dei mini silos, ottenuti con la metodica di Van Soest descritta in precedenza.

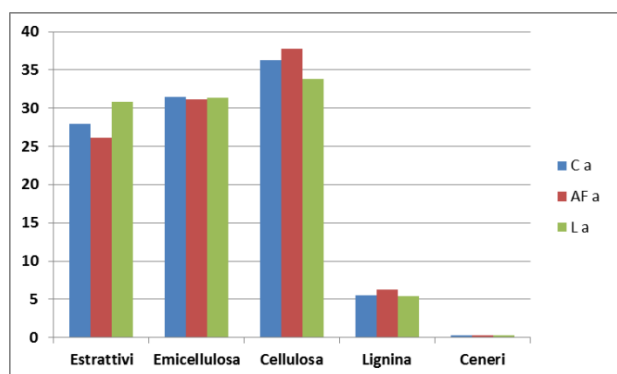


Figura 10: Composizione in fibre degli insilati a 3 mesi

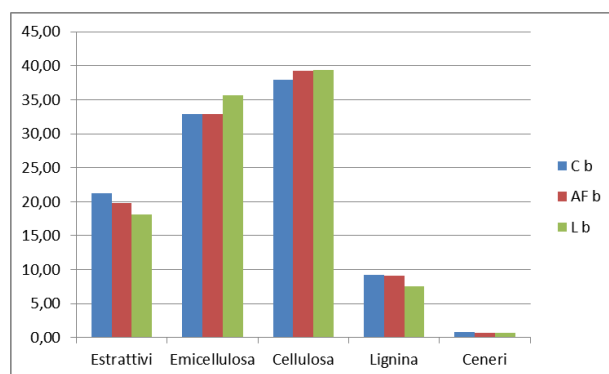


Figura 11. Composizione in fibre degli insilati a 6 mesi

Analizzando le figure 10 ed 11 e confrontandole con la tabella 7 si nota che gli insilati tal quali di sorgo SUCRO506 (Ca e Cb) hanno un contenuto minore di sostanze estrattive rispetto al sorgo tal quale non pretrattato tanto minore quanto più lungo è il tempo di insilamento. Molto probabilmente

tali sostanze vengono perse per evaporazione attraverso la valvola di sfiato di cui ogni mini-silos è dotato. Per contro aumentano le quantità percentuali di emicellulosa e cellulosa.

L'insilamento con acido formico comporta un'ulteriore perdita di sostanze estrattive ed un relativo aumento della fibra insolubile. Molto probabilmente la soluzione acida facilita la solubilizzazione ed il trasporto di tali sostanze.

L'insilamento con *Lactobacillus* ha prodotto risultati contrastanti ed ulteriori approfondimenti dovranno essere condotti in tal senso.

INSILATI NON PRETRATTATO DI SUCRO506I						
	%NDF	% NDS	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
C a	72,04±1,19	27,96±1,19	31,44±1,21	36,23±1,56	5,57±1,14	0,33±0,07
AF a	73,83±0,89	26,17±0,89	31,11±1,47	37,76±3,66	6,26±2,64	0,29±0,03
L a	69,19±3,42	30,81±3,42	31,32±0,70	33,78±4,37	5,37±2,44	0,31±0,09
C b	78,80±6,60	21,20±6,60	32,83±1,04	37,96±4,99	9,24±0,77	0,76±0,09
AF b	80,19±1,00	19,81±1,00	32,94±0,87	39,25±1,00	9,07±1,99	0,72±0,14
L b	81,87±3,84	18,13±3,84	35,60±0,98	39,40±2,77	7,55±1,84	0,67±0,09

Tabella 7: Composizione degli insilati non pretrattati

3.2 Pretrattamento insilati.

I campioni da pretrattare sono preventivamente macinati in un blender in acciaio inox e quindi setacciati con un setaccio di 18 mesh. Ci sono infatti delle evidenze sperimentali per cui la grandezza delle fibre pretrattate influenza la resa dell'idrolisi. Diminuendo la grandezza delle fibre aumenta la superficie esposta agli enzimi e teoricamente la resa finale. Non bisogna però andare oltre 1-2mm di lunghezza per non aumentare eccessivamente il peso di questo step nel bilancio energetico finale.

I campioni macinati (18 mesh) e seccati sono trattati con H₂SO₄ al 2% alla temperatura di 80°C per circa 24 h usando una concentrazione di biomassa pari al 5% w/v (circa 45 g di biomassa secca in 900 ml di H₂SO₄ al 2% in una bottiglia da 1 L). Le bottiglie sono poste in un bagno termostatico su un piano basculante mantenuto alla velocità di agitazione di 130 rpm. Questo passaggio ha lo scopo di allontanare l'emicellulosa (Curreli et al., 2002). Dopo 24 h il residuo è filtrato, lavato abbondantemente con acqua distillata fino a perdita della acidità e seccato overnight alla T di 105°C

fino a peso costante. Il residuo secco è trattato per 24 h con NaOH all' 1% alla T di 40°C usando sempre una concentrazione di biomassa pari al 5% w/v e mantenendo il tutto sotto agitazione di 130 rpm. Al termine delle 24 h è aggiunto dell' H₂O₂ al 50% fino alla concentrazione dell'1% e la T portata a 25°C. In questa ultima fase il pretrattamento viene eseguito mantenendo al buio le bottiglie coprendole con dei fogli di alluminio in modo tale da evitare la foto-decomposizione dell'acqua ossigenata. Questo passaggio ha lo scopo di allontanare la lignina e l'eventuale residuo di emicellulosa del passaggio precedente (Curreli et al., 1997). Il residuo così ottenuto è filtrato, lavato dapprima con acido acetico 0.1M per abbattere l'alcalinità residua ed in seguito con acqua deionizzata, seccato overnight alla T di 105°C fino a peso costante. Una piccola parte del campione è usata per l'analisi del contenuto in fibre alla fine del pretrattamento. La restante parte è avviata all'idrolisi e fermentazione per la produzione di etanolo. Al termine del pretrattamento è stata nuovamente determinata la composizione in fibre mediante il metodo di Van Soest (come descritto nella sezione precedente). In tabella 8 sono riportati i dati dopo il pretrattamento delle fibre.

INSILATI PRETRATTATI						
	%NDF	% NDS	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% ash
C a	94,48±0,58	5,52±0,58	8,45±1,36	80,82±0,20	5,94±0,53	0,12±0,06
AF a	94,44±0,71	5,56±0,71	9,12±2,26	82,23±2,90	3,20±0,99	-
L a	94,43±0,47	5,57±0,47	8,27±0,70	82,23±2,35	2,88±0,65	0,32±0,05
C b	96,70±0,38	3,30±0,38	6,53±0,56	85,00±1,68	5,15±0,78	0,08±0,01
AF b	96,70±0,71	4,00±0,71	6,43±1,16	84,55±1,37	4,84±2,49	0,17±0,06
L b	96,99±0,70	3,01±0,70	6,25±0,73	86,88±1,20	4,59±0,04	0,07±0,01

Tabella 8. Composizione degli insilati dopo il pretrattamento

Il pretrattamento delle fibre ha determinato in tutti i campioni un aumento della percentuale di cellulosa ed un abbattimento della percentuale di emicellulosa e lignina. Il recupero in cellulosa è stato più alto (intorno all'85%) nelle tesi sottoposte ad un periodo di conservazione di sei mesi rispetto alle tesi insilate per soli tre mesi (tab. 9).

Sucro 506	Recuperi E Solubilizzazione Fibre		
	Solub emicell.	Recup. cell.	Solub. lign.
Ca-W	82±3	76±6	92±2
AFa-W	81±6	67±5	95±2
La-W	83±1	69±7	94±3
Cb-W	82±5	85±13	91±2
AFb-W	83±4	85±5	92±4
Lb-W	84±2	88±1	94±2

Tabella 9. Efficienza del pretrattamento

Dall'esame dei dati appare evidente l'efficacia del pretrattamento. I campioni infatti, a prescindere dal tipo e dalla durata dell'insilamento si concentrano in cellulosa e si delignificano. Gli effetti del pre-trattamento si notano sulle percentuali di recupero della cellulosa. Maggiore è il tempo di insilamento maggiore è la cellulosa recuperata. Le diverse tipologie di inoculo non sembrano influire significativamente sul recupero di cellulosa.

Come previsto dal Progetto l'insilato utilizzato nelle successive fasi di fermentazione per la produzione di bioetanolo di seconda generazione da residuo lignocellulosico è stato sottoposto a torchiatura per separare il bagasso dalla borlanda.

Idrolisi e fermentazione insilati

I campioni di pretrattato provenienti da sorgo insilato a concentrazione nota di cellulosa sono state sottoposti preliminarmente ad idrolisi enzimatica e successivamente a fermentazione con il lievito *Saccaromices cereviseae* ceppo M861/10a isolato da ENEA. Prima di effettuare le prove sia in beuta che in fermentatore, il lievito è stato seminato per striscio in piastre di Potato Dextrose Agar (PDA; 70139 Sigma) ed incubato a 25 °C per 48 ore al fine di ottenere colonie singole e pure (Foto 7).

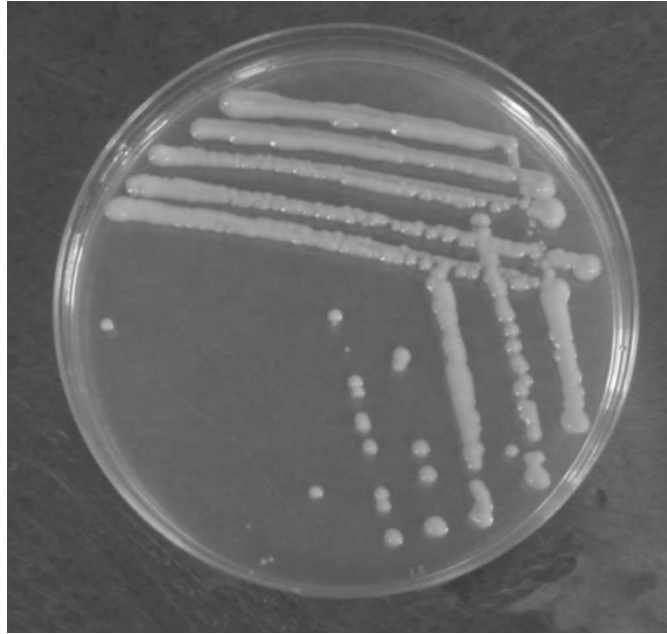


Foto 7. Isolato M861/10a di *Saccaromices cerevisiae*

Prove preliminari in beuta

Idrolisi: Per l'idrolisi sono stati utilizzati due enzimi acquistati da Sigma–Aldrich: Celluclast 1.5 L (Cellulase) prodotto da *Trichoderma reesei* (Cat C2730, Lot 058K1200) e Novozyme 188 (Cellobiase) prodotto da *Aspergillus niger* (Cat C6105, Lot 058K1144). L'attività dei due enzimi è di 70 FPU (filter paper units)/ml e di 230 CBU (b-glucosidase units)/ml, rispettivamente determinate mediante il metodo di Ghose (Ghose 1987). Cinque grammi secco di ogni campione sono stati risospesi in beuta "Erlenmayer" del volume di 500 ml contenente 100 ml di substrato liquido costituito da: 4,5 g/l di KH_2PO_4 anidro; 2 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/l di NaCl; 1 g/l di estratto di lievito; 100 $\mu\text{l/l}$ di CaCl [1 M]; 1 ml/l di MgSO_4 [1 M]; pH 5 ± 0.2 .

Le beute sono state sterilizzate in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Successivamente al substrato liquido, in condizioni di sterilità, sono stati addizionati i due enzimi alla dose di 20 FPU · g⁻¹ e di 30 CBU · g⁻¹ di cellulosa rispettivamente di Celluclast 1.5 L e Novozim 188. Le beute sono state poste per 72 ore a 40 °C a 110 RPM in un incubatore-agitatore orbitale (Foto 8). Durante l'idrolisi sono stati prelevati campioni a 6, 30, 48 e 72 ore, sottoposti a trattamento termico a 100 gradi per 5 minuti al fine di disattivare gli enzimi e conservati a -20 °C.

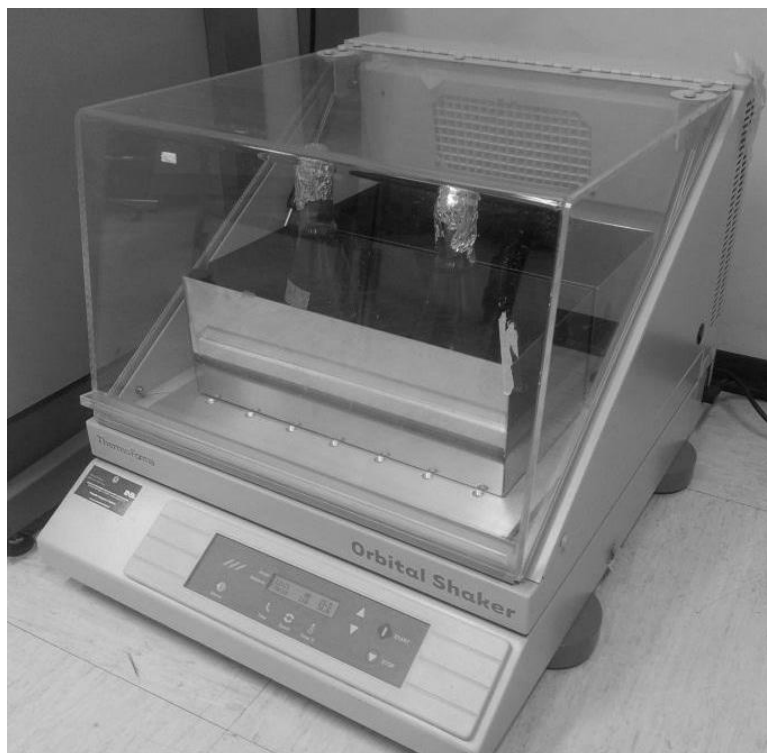


Foto 8. Incubatore-agitatore orbitale

Fermentazione: Dopo 72 ore dall'inizio dell'idrolisi in ogni beuta sono stati aggiunti 0,3 ml di NaOH 6 M per costituire un tampone fosfato a pH 6.

Una colonia pura di 2 giorni del ceppo M861/10a di lievito è stato stemperato in 25 ml di Yeast-Peptone-Dexstrose broth (YPD-broth; Sigma Y1375) sterile contenuto in beute da 100 ml al fine di ottenere una coltura "starter". Le beute sono state poste in agitazione per 24 ore a 110 RPM fino al raggiungimento della fine fase esponenziale di crescita. La biomassa cellulare è stata separata dal liquido colturale per centrifugazione a 5.000 RPM per 5 minuti a 4 °C con una centrifuga modello BECKMAN "COULTURE AVANTI-J25TM". Il pellet di cellule ottenuto è stato risospeso e successivamente inoculato con una pipetta sterile monouso nella beuta contenente il campione idrolizzato.

La fermentazione è stata condotta in anaerobiosi a 30 °C per 24 ore a 110 RPM.

Al termine della fermentazione sono stati prelevati campioni di brodo colturale per le analisi HPLC del contenuto di alcool etilico e del glucosio residuo. Successivamente il contenuto della beuta è stato filtrato per separare il liquido dal solido. Per effettuare la filtrazione, un imbuto Buchner è stato inserito, a tenuta mediante una opportuna guarnizione, su una beuta codata. All'interno del fondo dell'imbuto, poggiato sulla parete bucherellata, è stato inserito un disco di carta da filtro Whatman n. 3 delle dimensioni tali da toccare i bordi del filtro. La beuta codata è stata collegata ad una pompa da vuoto per facilitare il processo di filtrazione. La carta da filtro con il materiale ancora

umido è stato posizionato in stufa a 100 °C per 12 ore ed, in seguito, è stato misurato il peso secco del materiale ligno-cellulosico residuo.

Prove di idrolisi e fermentazione su scala di laboratorio.

I processi di idrolisi e fermentazione su scala laboratorio sono stati effettuati in una unità di fermentazione e bioreazione installata presso la Hall Tecnologica del Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis del Centro Ricerche Trisaia dell'ENEA.

Sono state usate tecniche in coltura liquida in “batch” in un fermentatore (modello Braun Biotech International “Biostat B”) dotato di un vessel di vetro Pyrex della capacità di 5 litri e di un sistema a sonde per il controllo del pH e della temperatura (Foto 9).

Idrolisi: I campioni pretrattati (125 g di secco) sono stati risospesi in 2.500 ml di substrato liquido della stessa composizione adottato nelle prove in beuta e versati nel vessel del fermentatore. Dopo la sterilizzazione in autoclave a 121 °C per 15 minuti, in condizione di sterilità sono stati aggiunti gli enzimi Celluclast 1.5 L e Novozim 188 rispettando le dosi adottate in precedenza. L'idrolisi è stata condotta a 50 °C per 72 ore in agitazione continua del mezzo di coltura con un agitatore meccanico a pale. Durante l'idrolisi sono stati prelevati campioni a 6, 30, 48 e 72 ore da sottoporre ad analisi HPLC e microbiologica al fine di verificare lo sviluppo di microrganismi estranei inquinanti.

Fermentazione: Dopo 72 ore di idrolisi, nel vessel è stato aggiunto il ceppo M861/10a di *S. cerevisiae* ottenuto da 600 ml di coltura “starter” rispettando la stessa metodologia descritta nelle prove in beuta. La fermentazione è stata condotta a 30 °C per 24 ore e con agitazione continua del mezzo di coltura. Il pH è stato mantenuto costante a $5,0 \pm 0,1$ mediante l'aggiunta automatica di NaOH 1N e di H₂SO₄ 0,5 N sterili. Al termine della fermentazione sono stati prelevati campioni di brodo colturale per le analisi HPLC del contenuto di alcool etilico e del glucosio residuo.

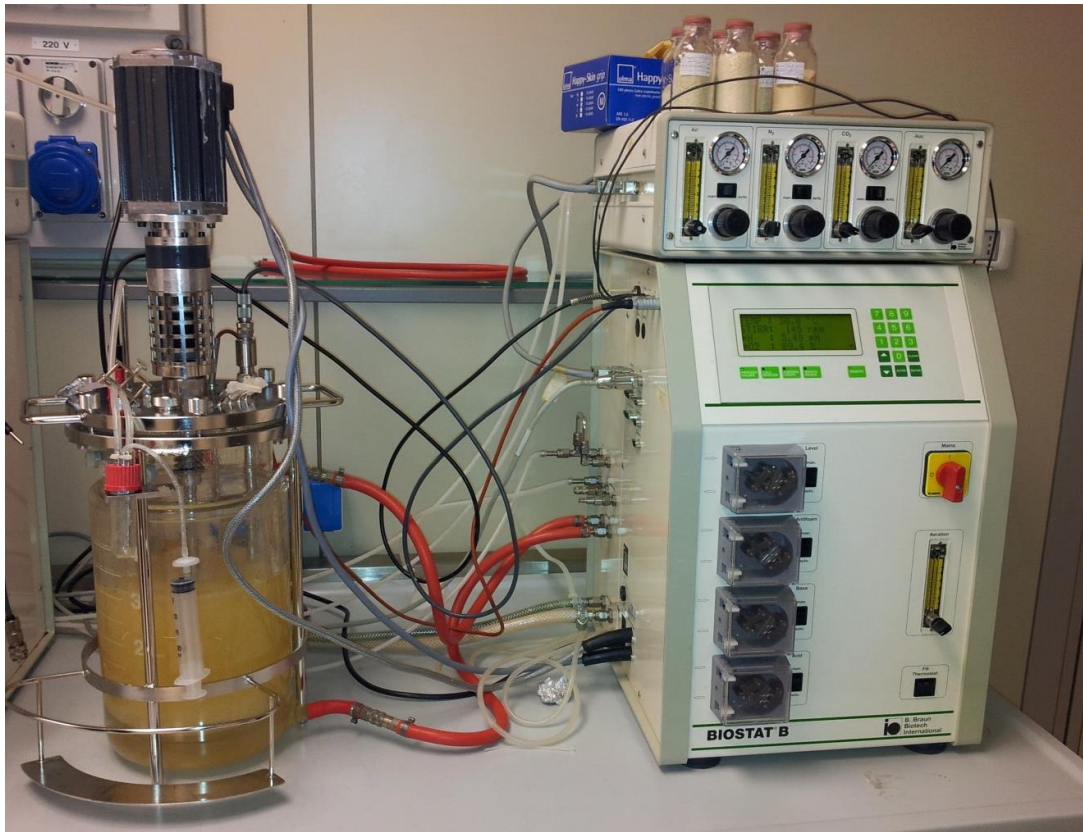


Foto 9. Fermentatore usato per le prove di idrolisi e fermentazione su scala laboratorio

Analisi HPLC di glucosio ed etanolo

Le analisi qualitative e quantitative di glucosio e etanolo, sono state condotte mediante un HPLC (Varian) composto da due pompe (mod. PS-210 Varian), un forno termostatico per la colonna montato su un modulo CVM 500 (Varian), e da un rivelatore a indice di rifrazione (mod. 9040 Varian). La strumentazione, nonché l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è gestita da una workstation (Star LC Workstation ver. 6.3).

La separazione è stata condotta su una colonna ad esclusione ionica Metacarb H Plus (dim. 300 mm x 7.8 mm) (Varian), utilizzando come eluente H_2SO_4 0.0075 M (pH 2.0) in isocratica (Martin *et al.*, 2007).

I parametri operativi sono stati i seguenti:

Temperatura della colonna: 65°C

Volume del campione: 20 μL

Flusso dell'eluente: 0.4 mL/min

Durata della corsa: 50 min

La determinazione qualitativa e quantitativa di glucosio ed etanolo è stata effettuata per interpolazione automatica di una retta di taratura costruita con soluzioni acquose di standard puri delle due sostanze, a concentrazione esattamente nota. A tal fine sono state preparate 2 soluzioni madri in acqua deionizzata aggiungendo rispettivamente Glucosio (50 g/L) e Etanolo (50 g/L).

Da ciascuna di queste soluzioni madri sono state preparate quattro soluzioni di glucosio + etanolo a diversa concentrazione, dalle quali è stata preparata la retta di taratura (Glucosio 25 g/L + Etanolo 25 g/L; Glucosio 12,5 g/L + Etanolo 12,5 g/L; Glucosio 6,25 g/L + Etanolo 6,25 g/L; Glucosio 3,1 g/L + Etanolo 3,1 g/L).

Analisi dei risultati

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), ed è stato utilizzato il McNemar's test per valutare le differenze tra i diversi trattamenti oggetti di studio (Testimone Vs A. formico Vs *L. plantarum*) e il tempo di conservazione (3 mesi Vs 6 mesi).

Risultati prove di idrolisi e fermentazione in beuta

I risultati ottenuti dalle prove di idrolisi e di fermentazione in beuta del materiale ligno-cellulosico estratto dal sorgo sottoposto a diverse tecniche di insilamento sono riportati nelle tabelle seguenti (Tab. 10, 11 e 12). Nelle colonne che si riferiscono al glucosio sono riportate le medie, espresse in percentuale, del rapporto tra i grammi di zucchero prodotto durante l'idrolisi e quelli attesi (grammi di cellulosa moltiplicati per il coefficiente di conversione 1,1). Viceversa, nelle colonne che si riferiscono all'etanolo sono riportate le medie, espresse in percentuale, del rapporto tra i grammi di etanolo prodotto durante la fermentazione e quelli attesi (grammi di glucosio attesi moltiplicati per il coefficiente di conversione 0,51).

TESI	% RESA GLUCOSIO	% RESA ETANOLO
L a	54.6 a*	47.2 a
AF a	45.7 a	39.3 a
C a	43.7 a	39.1 a

* Le medie con la stessa lettera non sono significativamente differenti (P=0.05)

Tabella 10. Effetto del trattamento con Acido formico e *L. plantarum* dopo 3 mesi di conservazione della biomassa di sorgo nel silos

TESI	%RESA GLUCOSIO	% RESA ETANOLO
L b	68.1 a*	55.3 a
AF b	61.4 a	51.1 a
C b	63.7 a	55.3 a

* Le medie con la stessa lettera non sono significativamente differenti (P=0.05)

Tabella 11. Effetto del trattamento con Acido formico e *L. plantarum* dopo 6 mesi di conservazione della biomassa di sorgo nei silos.

Le tecniche di insilamento adottate (aggiunta di acido formico, aggiunta di batteri lattici) non hanno determinato un miglioramento nelle rese percentuali in glucosio e in etanolo rispetto al controllo (Tab. 11 e 12). Anche se le rese differiscono tra loro numericamente, dall'analisi dei dati non risultano statisticamente significative. Viceversa, analizzando i dati in funzione del tempo di conservazione dell'insilato sono state riscontrate importanti differenze. Infatti, dopo 3 mesi di conservazione la resa teorica di glucosio e la resa teorica di etanolo è risultata rispettivamente del 48.0% e del 41.7% entrambi statisticamente inferiore rispetto a quanto rilevato dopo 6 mesi (Tab. 12).

TESI	% RESA GLUCOSIO	%RESA ETANOLO
Tempo a	48.0 b*	41.7 b
Tempo b	64.4 a	53.9 a

* Le medie con la stessa lettera non sono significativamente differenti (P=0.05)

Tabella 12. Effetto del tempo di conservazione sulla resa in glucosio ed etanolo

Risultati prove di idrolisi e fermentazione su scala laboratorio

I risultati dell'idrolisi e della fermentazione ottenuti con prove in beuta sono da considerarsi propedeutici per successive prove mediante bioreattore da banco.

Poiché i risultati migliori si sono avuti con il sorgo conservato per lunghi periodi, nelle successive prove in fermentatore sono state replicate solamente le idrolisi e le fermentazioni su biomasse insilate per 6 mesi. In figura 12 sono riportati i risultati ottenuti espressi come percentuale della resa teorica di glucosio ed etanolo. Generalmente le percentuali delle rese in glucosio sono più alte nelle esperienze ottenute in fermentatore rispetto a quelle ottenute in beute. Questo può essere attribuito al fatto che usando il fermentatore si ottiene un migliore mescolamento dei reagenti e della biomassa soprattutto all'inizio della fase di idrolisi quando la biomassa non è ancora liquefatta dagli

enzimi. La migliore reologia che c'è quindi all'interno del fermentatore sicuramente rende meno importanti quei fenomeni che possono, in certo qual modo, inibire l'idrolisi come la stratificazione degli enzimi o l'adsorbimento permanente sulla superficie della biomassa.

In 2 casi su 3 le rese di idrolisi, rispetto alle prove in beuta sono migliorate fino all'ottimo caso del pretrattato con acido formico che arriva al 97%.

L'aumento in resa in glucosio non è stato seguito da un aumento in resa in etanolo. Le rese in etanolo ottenuto utilizzando il fermentatore, sono paragonabili a quelle ottenute in beuta intorno al 50-55%. Molto probabilmente questo è dovuto alla concentrazione di sostanze inibenti che si formano durante la fermentazione (acido acetico, anidride carbonica e lo stesso etanolo) arrestando l'azione dei lieviti (Viola *et al.*, 2004).

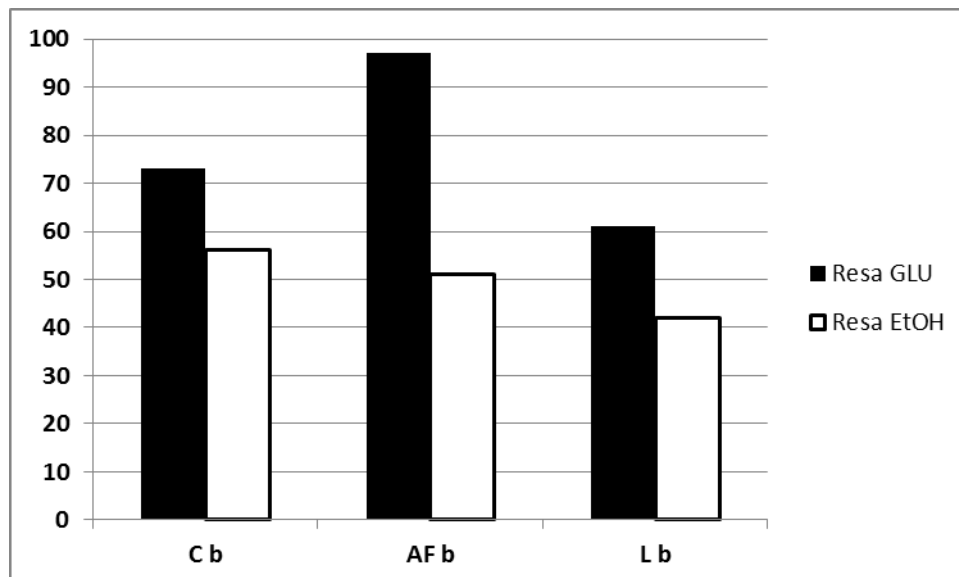


Figura 12 – Produzione di glucosio ed etanolo espressa come percentuale sul teorico ottenute dalle prove di idrolisi e fermentazione su scala laboratorio

4 Discussione e conclusioni.

Per quanto riguarda i dati agronomici, il confronto tra le diverse varietà ci permette di trarre alcune importanti conclusioni. Nella coltura sottoposta ad irrigazione le tre varietà si sono comportate similmente dal punto di vista produttivo. La varietà SUCRO 506 invece è apparsa molto più rustica sia in vigoria che per resistenza agli stress da fattori ambientali, comportamento che appare più evidente nella coltura completamente in asciutta dove ha dato una produzione doppia rispetto alle altre due varietà. Dall'esame di questi primi dati produttivi si può affermare che alle condizioni pedoclimatiche che caratterizzano il nostro sito di sperimentazione non è possibile pensare di procedere alla coltivazione del sorgo in asciutta senza assumersi il rischio di veder compromessa in alcune annate l'intera produzione. La varietà SUCRO 506 oltre che per il portamento più vigoroso, dai primi dati risulta anche la più produttiva in biomassa totale per ettaro.

L'insilamento del sorgo sperimentato nel corso di questo lavoro ha dimostrato di essere un metodo adatto per conservare la biomassa permettendo così il suo utilizzo durante tutto l'anno. Il pH, l'odore, il contenuto zuccherino e l'assenza batteri butirrici putrefattivi riscontrato all'apertura dei mini-silos indicano che il processo di insilamento in tutte le tesi saggiate ha consentito di ottenere un prodotto che bene si adatta alla successiva fase di trasformazione in bioetanolo (Pakarinen A. *et al.*, 2011).

La fase di produzione di etanolo di questo studio ha messo in evidenza che il pretrattamento chimico proposto oltre ad essere economico e con un basso impatto ambientale poiché caratterizzato dall'utilizzo di basse temperature e da reagenti diluiti, si è rivelato efficace quando applicato al bagasso del sorgo zuccherino insilato. Infatti alla fine del pretrattamento viene restituito un materiale quasi esclusivamente costituito da cellulosa e delignificato pronto per essere idrolizzato. Un tempo di insilamento più lungo sembra favorire un maggior recupero di cellulosa. Questo aspetto si traduce in rese più alte di idrolisi e fermentazione in accordo con le esperienze di Oleskowicz-Popiel, P. *et al.*, 2007.

Lo *scaling-up* del processo con fermentatori su scala banco ha messo in evidenza che la resa di idrolisi del bagasso pretrattato può essere aumentata con la temperatura di idrolisi ottenendo i risultati migliori per la biomassa di sorgo insilata con acido formico. L'aumento della resa di idrolisi non ha però portato un significativo aumento della resa di produzione di etanolo. In tutti i casi, infatti, la percentuale di resa in etanolo non ha superato il 55%-56% molto probabilmente perché il lievito o non sopporta le concentrazioni di etanolo ottenute oppure durante la fermentazione si è sviluppato qualche metabolita che ha inibito la fermentazione.

Bibliografia

Barbanti L., Grandi S., Vecchi A., G. Venturi (2006). Sweet and fiber sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), energy crops in the frame of environmental protection from excessive nitrogen loads. *European Journal of Agronomy*, 25, 30-39.

Bennett S.A., R.P. Anex (2009). Production, transportation and milling costs of sweet sorghum as a feedstock for centralized bioethanol production in the upper Midwest. *Bioresource Technology*, 100, 1595-1607.

Curreli N., Agelli M., Rescigno A., Rinaldi A.C, Sanjust E., Rinaldi A. 2002. Complete and efficient pretreatment of wheat straw. *Process Biochemistry* 37, pp. 937-941.

Curreli N., Fadda M.B., Rescigno A., Rinaldi A., Soddu G., Sollai F., Vaccargiu S, Sanjust E., Rinaldi A. 1997. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. *Process Biochemistry* 32 (8) pp. 665-670.

Curt M.D., Fernandez J., M. Martinez (1995). Productivity and water use efficiency of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cv. "Keller" in relation to water regime. *Biomass and Bioenergy*, 8, 6, 401-409.

Ghose T.K. 1987 . Measurement of cellulose activities, *Pure & Appl. Chem.*, Vol 59 (2), pp. 257-268.

Janssen R., Rutz D., Braconnier S., Reddy B., Rao S., Schaffert R., Parella R., Zaccharias A., Rettenmaier N., Reinhardt G., Monti A., Amaducci S., Marocco A., Snijman W., Terblanche H., F. Zavala-Garcia (2010). Sweet Sorghum – An alternative Energy Crop. *Proceedings of XVIII European Biomass Conference and Exhibition*, 3-7 May, Lyon, France, 200-206.

Martin C., Klinke H.B., Thomsen A.B. 2007. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* 40, pp. 426-432.

Reddy B.V.S., Ramesh S., Sanjana Reddy P., Ramaiah B., Salimath P.M., R. Kachapur (2005). Sweet sorghum - A potential alternative raw material for bio-ethanol and bio-energy. *International Sorghum and Millets Newsletter* 46:79–86.

Schmidt J., Sipocz J., Kaszás I., Skaszás G., Gyepes A., R.P. Tengerdy (1997). Preservation of sugar content in ensiled sweet sorghum. *Bioresource Technology*, 60, 9-13.

Smith, G.A., Buxton, D.R., 1993. Temperate zone sweet sorghum ethanol production potential. *Bioresource Technology*, 43, 71–75.

Van Soest P.J., Robertson J.B. 1979. Systems of analysis evaluating fibrous feeds. Cornell University, Ithaca-N.Y.

Vasilakoglou I., Dhima K., Karagiannidis N., T. Gatsis (2011). Sweet sorghum productivity for biofuels under increased soil salinity and reduced irrigation. *Field Crops Research*, 120, 38-46.

Viola E., De bari I., Zimbardi F. Braccio G. 2004. Simulazione di un processo ed analisi dei costi per un impianto di produzione di etanolo da biomasse lignocellulosiche. Collana Rapporti tecnici Enea RT/2004/31/ENE ISSN/0393-3016.

Edito dall' **ENEA**
Servizio Comunicazione

Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Stampa: Tecnografico ENEA - CR Frascati
Pervenuto il 7.6.2013

Finito di stampare nel mese di giugno 2013