



Università degli Studi di Perugia
DOTTORATO DI RICERCA IN ENERGIA E SVILUPPO
SOSTENIBILE XXX CICLO

Settore scientifico disciplinare ING-IND/10

Tesi di Dottorato

**“SISTEMI E TECNOLOGIE INNOVATIVE PER LA PRODUZIONE DI
BIOFUELS E BIOCHEMICALS A BASSO IMPATTO AMBIENTALE”**

Dottorando

Dott.ssa Silvia D'Antonio

Coordinatore del

Dottorato di Ricerca

Prof. Ing. Franco Cotana

Tutor

Prof. Ing. Franco Cotana

Correlatore

Ing. Gianluca Cavalaglio

Anno accademico 2016/2017

Sommario

ABSTRACT	6
INTRODUZIONE.....	7
Capitolo 1 : FILIERE E TECNOLOGIE PER L'UTILIZZO DI BIOMASSE.....	10
1.1 LE BIOMASSE E LA FILIERA LIGNOCELLULOSICA.....	10
1.2 I BIOCARBURANTI	12
1.2.1 Classificazione dei biocarburanti.....	14
1.2.2 Il Bioetanolo.....	14
1.2.3 Il Biodiesel.....	15
1.2.4 Biocarburanti di prima e seconda generazione.....	18
1.2.5 Biodiesel da microrganismi.....	19
Capitolo 2 : PROCESSI DI TRASFORMAZIONE DELLE BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE.....	21
2.1 LE BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE	21
2.2 PROCESSAMENTO DELLA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA PER BIOCARBURANTI DI II GENERAZIONE.	23
2.2.1 Pretrattamento.....	23
2.2.2 Steam explosion	25
2.2.3 Idrolisi Enzimatica.....	27
2.3 PROCESSI BIOCHIMICI.....	29
2.3.1 Fermentazione alcolica.....	32
2.3.2 Biosintesi di lipidi.....	33
Capitolo 3 : BIOMASSE TESTATE NELLA SPERIMENTAZIONE	35
3.1 BIOMASSE RESIDUALI PER LA PRODUZIONE DI BIOCARBURANTI.....	35
3.1.1 Biomasse Spiaggiate	35
3.1.2 Potature d'Olivo.....	36
3.1.3 Il cardo	38
OVERVIEW DEL LAVORO.....	41
Capitolo 4 : MATERIALI E METODI SPERIMENTALI	43
4.1 MATERIALI	43
4.1.1 Reagenti.....	43
4.1.2 Biomasse di partenza.....	43
4.1.3 Lieviti.....	44
4.2 APPARATO PROTOTIPALE	44
4.2.1 Reattore di Steam Explosion	45
4.2.2 Reattori di idrolisi e fermentazione.....	45
4.3 STRUMENTAZIONE DI ANALISI CHIMICA	46

4.3.1 TGA e CHN (Analisi immediata ed analisi elementare)	46
4.3.2 High Performance Liquid Cromatography (HPLC)	47
4.3.3 Gas cromatografia (GC-FID).....	49
4.4 METODI ANALITICI.....	51
4.4.1 Caratterizzazione Biomassa Tal Quale.....	51
4.4.2 Steam Explosion e Caratterizzazione Esploso	52
4.4.3 Idrolisi enzimatica.....	53
4.4.4 Fermentazione alcolica.....	54
4.4.5 Produzione biolipidi.....	54
4.4.6 Esterificazione degli acidi grassi	57
Capitolo 5 : RISULTATI	58
5.1 CARATTERIZZAZIONE BIOMASSE	58
5.2 RISULTATI STEAM EXPLOSION E CARATTERIZZAZIONE WIS E LF.....	60
5.3 IDROLISI ENZIMATICA.....	64
5.4 PROVE DI PRODUZIONE DI BIOETANOLO IN SSF	67
5.5 PROVE DI PRODUZIONE LIPIDI.....	69
5.5.1 Cinetiche in beuta.....	69
5.5.2 Profilo lipidico	73
5.5.3 Cinetiche in reattore da 5 litri	76
5.4 SINTESI DEI RISULTATI	81
Capitolo 6 : BIOCHEMICALS	85
6.1 GREEN CHEMISTRY E BIOBASED PRODUCTS	85
6.2 COLORANTI NATURALI.....	86
6.3 SPECIE VEGETALI DA GIALLO PER L'ESTRAZIONE DI COLORANTI	88
6.3.1 Reseda luteola L.....	89
6.3.2 Cotinus Coggygia	90
6.4 OVERVIEW DEL LAVORO.....	92
Capitolo 7 MATERIALI E METODI.....	93
7.1 MATERIALI	93
7.1.1 Reagenti.....	93
7.1.2 Specie vegetali	93
7.2 METODI.....	93
7.2.1 Caratterizzazione	93
7.2.2 Estrazioni	93
7.2.3 Analisi del Colorante.....	94

7.2.4 Ottenimento ed analisi delle polveri	95
Capitolo 8 RISULTATI	97
8.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE	97
8.2 ESTRAZIONI e CARATTERIZZAZIONI	97
8.2.1 Ottenimento ed analisi delle polveri	105
8.3 SINTESI DEI RISULTATI	108
CONCLUSIONI DEL LAVORO DI TESI.....	110
LISTA DEI PRINCIPALI ACRONIMI UTILIZZATI	112
BIBLIOGRAFIA	113

ABSTRACT

The use of lignocellulosic residues for biofuels and biochemicals production is becoming a noteworthy and environmental-friendly opportunity.

In this experimentation stranded driftwood residues (BS), olive prunings (OL) and cardoon (CA) were used as carbon sources for bioethanol and lipids production by different yeasts. The aim of this study was to investigate the ability of microorganism to grow and accumulate ethanol and lipids from 2nd generation carbohydrates obtained from steam-exploded and enzymatically hydrolysed lignocellulosic matrix.

The raw material was pre-treated by steam explosion (SE) at two different severity factors (LogR_0), and hydrolysed by commercial cellulolytic enzymes (NS by Novozyme).

The hydrolysed samples were then used for two different fermentative paths:

- **Alcoholic fermentation** by SSF process (Simultaneous Saccharification and Fermentation). *S. cerevisiae* yeast (Ethanol Red) provided by *Fermentis* was used to produce ethanol.
- **Lipids accumulation tests** by oleaginous yeasts. The strains *Leucosporidium creatinivorum* DBVPG 4794, *Naganisha adeliensis* DBVPG 5195 and *Solicoccozyma terricola* DBVPG 5870, (preserved in the Industrial Yeast Collection DBVPG, www.dbvpg.unipg.it), were used at two different temperatures (20-25°C) using a fixed C/N ratio.

The study confirmed the suitability of residual biomass as a substrate for the production of second-generation ethanol with good yields (from 9 to 13 grams of ethanol per grams of raw material) by using the SSF process. The best performance was obtained with cardoon producing about 13 g/g (grams of ethanol per grams of raw material in input).

At the same time the work demonstrated the ability of some basidiomycetous strains to use lignocellulosic residues (after SE and enzymatic hydrolysis pre-treatment) as cheap and environmental-friendly feedstocks for intracellular lipid accumulation. The tested yeasts were able to accumulate of TAGs (triacylglycerols) up to 50% of their dry biomass on lignocellulosic hydrolysate. Besides the produced oils exhibited similar FA profiles close to those of almond and olive oils.

This biotechnological approach could be regarded as a valid and sustainable alternative for biofuels and biochemicals production using sustainable materials and processes.

Vegetal biomass was also used as raw material for dye extraction to replace synthetic and fossil derived products. *Cotinus coggygria* and *Reseda* were tested to obtain two different shades of yellow dye. The extracted material was characterised by UV-VIS spectrophotometric analysis and the total phenolic content (TPC) and the total flavonoid content (TFC) of each extract was calculated as gallic acid and quercetin equivalents respectively.

The dyes were precipitated in order to obtain a powder usable for several application; the CIElab coordinates and the thermal degradation profile of the powders were obtained.

INTRODUZIONE

Nel corso del XX secolo l'aumento demografico a livello globale, il cambiamento climatico e la riduzione della capacità di resilienza degli ecosistemi hanno posto la necessità di aumentare l'utilizzo di risorse rinnovabili. La popolazione mondiale ha infatti decuplicato sia l'uso di combustibili fossili sia l'estrazione di risorse materiali; le materie prime, l'acqua, l'aria, la biodiversità e gli ecosistemi marini, terrestri e acquatici sono tutti sottoposti ad una pressione insostenibile. Nell'Unione Europea, ogni anno si usano circa 16 tonnellate per persona di materiali, di cui 6 tonnellate sono sprecate e metà di esse è collocata in discarica. La domanda globale di risorse continua ad aumentare con l'incremento demografico e le crescenti aspirazioni, in particolare delle persone a reddito medio nelle economie emergenti [1]. Le emissioni di gas serra (GHG) di origini antropogenica sono la principale causa del cambiamento climatico e stanno contribuendo in maniera significativa al fenomeno del surriscaldamento globale.

La comunità scientifica insieme a quella politica convengono sul fatto che circa il 20% delle emissioni di GHG siano dovute al settore dei trasporti, che è anche responsabile dell'aumento della richiesta di petrolio in tutto il mondo. Si stima che il settore dei trasporti subirà una crescita di circa 1.3% l'anno fino al 2030 [2]. Per contrastare la domanda energetica crescente, i prezzi volatili, i problemi di approvvigionamento e di l'impatto ambientale del settore energetico, l'UE ha attuato una chiara strategia energetica che fissa degli obiettivi specifici: riduzione gas serra, aumento quote di energia da FER ed efficientamento energetico. Ad oggi l'UE è sulla buona strada per raggiungere gli obiettivi fissati per il 2020 (dati Eurostat):

- **gas serra** ridotti del **18%** tra il 1990 e il 2012
- la quota di **energie rinnovabili** è passata dall'8,5% del 2005 al **14,1%** del 2012
- un aumento dell'**efficienza energetica** del **18–19%** entro il 2020

Gli stessi obiettivi per il 2050 prevedono di tagliare dell'80-95% i gas a effetto serra rispetto ai livelli del 1990 [3].

Cercare di sostituire, almeno in parte, prodotti di origine fossile con prodotti rinnovabili può essere considerata una soluzione a breve e medio termine per aiutare a perseguire gli obiettivi sopracitati e ridurre la dipendenza dal petrolio che, ad oggi, continua ad essere la risorsa prevalente, specialmente nel settore dei trasporti.

Lo sviluppo di un'economia che cresca rispettando l'ambiente e riducendo la dipendenza da risorse fossili, non rinnovabili, appare dunque un obiettivo prioritario delle politiche mondiali.

La Commissione Europea ha definito **bioeconomia** quell'economia che utilizza risorse naturali rinnovabili per produrre beni ed energia. Come tale presenta quindi il potenziale di "sostenere la crescita economica, con la creazione di lavoro sia nelle aree agricole che industriali, ridurre la dipendenza da combustibili fossili e migliorare la sostenibilità ambientale del sistema economico". I settori della bioeconomia in cui il nostro Paese può risultare competitivo, definiti dalla stessa CE, sono, oltre ai comparti di agricoltura, silvicoltura, pesca, ed affini anche i comparti della "chimica verde" ovvero quelli che utilizzano materie prime naturali e rinnovabili [4] per l'ottenimento di prodotti *bio-based*. Tra essi un ruolo rilevante è quello relativo alla produzione di biocarburanti tra cui bioetanolo e biodiesel.

Nonostante un ruolo ancora contenuto del nostro paese nel commercio mondiale di biocarburanti, alcuni elementi positivi di questo settore produttivo sono evidenti. Tra questi, come evidenziato nel Rapporto di Banca Intesa San Paolo "La bioeconomia in Europa" [4], la cooperazione tra grandi e piccoli produttori, con impianti diffusi su tutto il territorio, gli avanzamenti tecnologici e gli investimenti dedicati alla riconversione dei siti petrolchimici tradizionali (Porto Torres, Venezia, Porto Marghera).

Risulta evidente come, per valorizzare al meglio la capacità tecnologica che il nostro paese sta dimostrando nell'ambito delle industrie *bio-based*, elemento chiave sarà tentare di aumentare la capacità di produzione di biomassa, puntando sia a una maggiore produttività, sia ad un recupero delle superfici utilizzate, sia ad un migliore sfruttamento dei **residui** delle lavorazioni già esistenti.

L'utilizzo di biomasse lignocellulosiche residuali all'interno di una bioraffineria permette oltre alla produzione di biocarburanti, l'ottenimento di una serie di prodotti e sottoprodotti utilizzabili sia come fonti energetiche alternative (lignina) sia come building-blocks in diversi rami dell'industria (prodotti chimici, materiali, etc). Lo scopo è dunque quello di creare prodotti bio-based competitivi nel mercato finale in modo da sostituire in parte, od in alcuni casi anche totalmente, i prodotti derivanti dalla raffinazione del petrolio.

Un altro settore dove si sta facendo vivo l'interesse per l'utilizzo di sostituti sostenibili a partire da biomasse è quello dei coloranti. La "crisi" in atto dei coloranti sintetici, che anno dopo anno vengono ritirati dal mercato perché considerati dannosi per la salute, sta portando ad una enorme attenzione sulla possibilità di sostituirli, o quantomeno affiancarli, con le controparti naturali.

È noto da secoli che a partire da molte specie vegetali, così come da scarti di varia natura, è possibile estrarre dei principi coloranti. Lo sfruttamento di tali biomasse nel moderno concetto di bioraffineria permetterebbe di ottenere un prodotto ad alto valore aggiunto con una eventuale valorizzazione di tutte le componenti di scarto del processo di estrazione.

In questo scenario risulta necessario concentrare risorse e investimenti nella Ricerca e Sviluppo e nella formazione oltre che nel funzionamento dei mercati e nel sostegno alla competitività.

È su questa scia che si inserisce questo lavoro di tesi proponendo sperimentazioni sull'ottenimento di biocarburanti e biochemicals a partire da biomasse.

Nella prima parte, su cui si è lavorato maggiormente durante il periodo di dottorato, è proposta una sperimentazione riguardante la produzione di bioetanolo e biolipidi a partire da matrici lignocellulosiche residuali tra cui biomasse spiaggiate, potature di olivo e residui di cardo mediante processi di trasformazione biochimica che prevedono l'utilizzo di microrganismi specifici.

Nella seconda parte, la cui sperimentazione è ancora in una fase preliminare, si è sviluppato l'aspetto dell'ottenimento di biochemicals, in particolare coloranti naturali a partire da specie vegetali autoctone.

SPERIMENTAZIONE BIOFUELS:

PRODUZIONE DI BIOCARBURANTI A PARTIRE DA BIOMASSE RESIDUALI

Capitolo 1 : FILIERE E TECNOLOGIE PER L'UTILIZZO DI BIOMASSE

1.1 LE BIOMASSE E LA FILIERA LIGNOCELLULOSICA

Con il termine “biomassa” viene indicata la materia organica di origine animale o vegetale, sia spontanea che coltivata dall'uomo, terrestre e marina, prodotta per effetto del processo di fotosintesi clorofilliana con l'apporto dell'energia della radiazione solare, di acqua e di svariate sostanze nutritive, e da cui sia possibile ricavare energia. L'art. 2 del D.lgs. 387/2003 (successivamente integrato dal D.lgs. 28/2011) riprende testualmente la direttiva 2001/77/CE e definisce biomassa come “la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, gli sfalci e le potature provenienti dal verde pubblico e privato, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani”.

L'utilizzo di biomassa come materiale di partenza all'interno di una bioraffineria¹ risulta una interessante alternativa all'energia di origine fossile per la produzione di energy carriers e chemicals così come un valido aiuto per mitigare i cambiamenti climatici [5]. Infatti mentre l'energia elettrica e quella termica possono essere generate da una serie di sostituti (solare, eolico, geotermico, idroelettrico) per la produzione di biocarburanti e biochemicals si può, al momento, far affidamento solo sull'utilizzo di biomasse, l'unica fonte di carbonio alternativa al fossile sulla Terra.

I biocarburanti e biochemicals di prima generazione sono prodotti a partire da colture alimentari come mais, soia, palma e canna da zucchero, tutte ottime fonti facilmente accessibili di zuccheri, amidi e olii.

L'utilizzo di tali materie prime causa una serie di problematiche: perdita di energia al netto delle emissioni di gas serra, aumento dei prezzi dei prodotti alimentari, competizione con l'industria alimentare e mangimistiche per l'utilizzo delle terre, disponibilità legata alla fertilità del suolo ed alle rese per ettaro; inoltre il risparmio di emissioni di CO₂ e di risorse fossili sono limitati dall'alta richiesta energetica richiesta per la coltivazione e la conversione delle materie prime che contestualmente vanno a gravare su altre categorie d'impatto come eutrofizzazione ed acidificazione.

Alcune di queste problematiche possono essere superate mediante l'utilizzo di materiali lignocellulosici tra cui residui delle operazioni selvicolturali o delle attività agroforestali, utilizzazione di boschi cedui, etc.; residui colturali provenienti dall'attività agricola (come paglie, stocchi, sarmenti di vite, ramaglie di potatura, etc.) e da colture marginali; residui provenienti dalle industrie del legno o dei prodotti in legno e dell'industria della carta, nonché residui dell'industria agroalimentare (sanse, vinacce, noccioli, lolla di riso, etc).

Entro i prossimi 10-15 anni, ci si aspetta che residui lignocellulosici diventino materiali di partenza d'elezione, i cosiddetti “next-generation feedstock”, per due motivi principali. In primo luogo in quanto essi sono largamente diffusi, poco costosi e facilmente reperibili; inoltre perché l'utilizzo di tale materiali permette la produzione sia di biocarburanti che di biochemicals così come di calore ed elettricità. Ciò porterebbe a migliori prestazioni energetiche ambientali ed economiche all'interno dello sviluppo delle moderne bioraffinerie.[6] La ricerca sulle filiere lignocellulosiche, in particolare quella legata allo sfruttamento di residui di silvicoltura ed agricoltura ha suscitato un sempre crescente interesse grazie al basso costo, l'abbondanza, la disponibilità immediata ed il loro carattere rinnovabile di tali materiali.

Le cosiddette lignocellulosic feedstock (LCF) biorefinery hanno dimostrato avere enormi potenzialità di successo in quanto permettono di allocare una serie di materie prime di scarto e con bassi costi per

¹ Bioraffineria = moderna piattaforma tecnologica che, attraverso processi di conversione di biomassa, permette la produzione integrata di un ampio spettro di prodotti commercializzabili: carburanti, energia e materiali destinati a diversi rami dell'industria (chimica, farmaceutica, agro-alimentare, etc).

convertirle in prodotti biobased in sostituzione agli esistenti prodotti di origine fossile [7]. Grazie alla loro composizione complessa ed eterogenea, l'utilizzo di biomasse lignocellulosiche permetterebbe di ottenere una vasta gamma di bioprodotto nonostante siano maggiormente recalcitranti, rispetto ad altre biomasse, ai processi di conversione [8]. In ogni caso lo sviluppo e l'applicazione di tecnologie per il frazionamento delle biomasse che siano tecnicamente ed economicamente fattibili sono ancora da migliorare. Pertanto ulteriori studi e ricerche risultano essere indispensabili. I materiali di partenza sono quindi legno, residui di lavorazione della carta, stoppie, paglia, arbusti e così via o possono includere paglia di grano, paglia di riso, torsoli di mais, rami, gambi e gusci etc con un variabile contenuto in cellulosa. E' stato stimato che la produzione annuale di cellulosa da biomassa è di circa 1.5 trilioni di tonnellate, rendendo questi materiali una fonte di enorme interesse per l'ottenimento di prodotti sostenibili e biocompatibili [9]. In questo contesto va evidenziata l'importanza della filiera di recupero delle "biomasse residuali" costituite dagli scarti di natura agricola e forestale. Queste biomasse rivestono un ruolo strategico nell'ambito dell'attuale politica energetica in quanto rappresentano una fonte di materia prima da destinare all'energia senza impiegare terreno per colture energetiche ma trasformando i residui, considerati scarti, in energia. I produttori possono pertanto risparmiare fasi di bruciatura in loco o interrimento, che causano immissione di fumi in atmosfera, traendo benefici in termini economici, ottenere energia e allo stesso tempo contribuire alla conservazione del territorio contro il rischio di incendi ed il dissesto geologico.

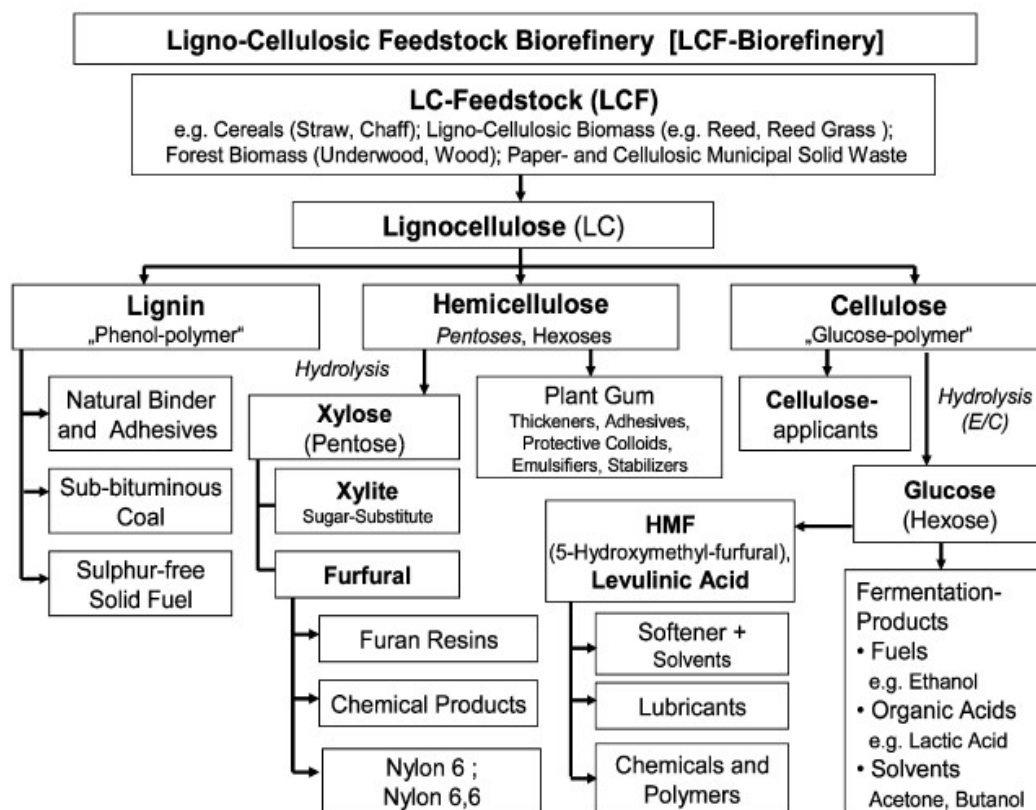


Figure 1-1: Lignocellulosic Feedstock Biorefinery

In questo tipo di piattaforme il punto di partenza consiste nella separazione tra le componenti della biomassa, ovvero i carboidrati e la lignina, mediante pretrattamenti specifici [10]. La componente cellulosica è considerata quella di maggior pregio ed andrà incontro a trasformazioni chimiche o biotecnologiche per ottenere vari prodotti chimici tra cui acido levulinico, intermedio chimico per altri prodotti di interesse industriale, e solventi come l'acetone o l'etanolo. L'etanolo è utilizzabile come

biocombustibile, come additivo ai carburanti tradizionali o anche convertito in etene, molecola utilizzata per la sintesi di altri composti chimici come il polietilene.

Le componenti meno pregiate sono quelle che possono sopperire alle esigenze energetiche all'interno delle bioraffinerie producendo calore ed energia elettrica. L'emicellulosa, che si idrolizza a dare xilosio può a sua volta subire fermentazione da parte di microrganismi che utilizzano zuccheri pentosi a dare etanolo o altri composti come il furfurale utilizzato come solvente in petrolchimica, per la produzione di resine solide, o come materiale di partenza per il Nylon 6,6 e il Nylon 6 (Fig. 1.1).

I prodotti ottenibili da una LCF si possono quindi suddividere in due grandi categorie: materiali, utilizzati principalmente per le loro proprietà chimico-fisiche; prodotti energetici, questi ultimi sono usati per il loro contenuto energetico per fornire energia, elettricità e calore all'impianto stesso e per essere immessi sul mercato.

I principali prodotti energetici sono:

- biocarburanti gassosi (biogas, syngas, idrogeno, biometano)
- biocarburanti solidi (pellet, lignina, carbone)
- biocarburanti liquidi per il trasporto (bioetanolo, biodiesel, bio-oil)

I prodotti e materiali in uscita in una bioraffineria sono invece:

- prodotti chimici (fine chemicals, building-blocks, bulk chemical: detergenti, tensioattivi)
- acidi organici (acido succinico, acido lattico ed altri derivati)
- Polimeri e resine (plastiche , resine fenoliche etc.)
- Biomateriali (cellulosa, carta , pannelli in legno)
- fertilizzanti
- mangimi

Tra questi, i biocarburanti hanno recentemente assunto un grande rilievo, in funzione del raggiungimento degli specifici obiettivi di sostituzione nella catena energetica dettati dalla Comunità Europea.

1.2 I BIOCARBURANTI

Il settore dei trasporti, che rappresenta nei paesi occidentali circa un terzo dei consumi di energia primaria, è quello nel quale gli interventi tesi alla diversificazione delle fonti ed alla riduzione delle emissioni inquinanti sono più faticosi, essenzialmente per l'attuale ridotta disponibilità di alternative rispetto ai combustibili tradizionali. L'impiego di fonti rinnovabili nel settore dei trasporti in Italia consiste nell'immissione in consumo di biocarburanti (biodiesel, bioetanolo, biometano etc.) puri o miscelati con i carburanti fossili.

I biocarburanti - ovvero i combustibili ricavati da input non fossili - rappresentano un prodotto di grande interesse, sia per il potenziale di sostituibilità, sia per i rilevanti problemi in termini di equilibrio con le risorse naturali destinate all'alimentazione. In questa categoria ricadono principalmente prodotti destinati al trasporto, ma anche bioliquidi destinati ad altri usi energetici. Dato il loro potenziale rilevante in termini di sostituzione di produzioni fossili, nel corso degli ultimi anni la produzione di biocarburanti è stata oggetto di specifici interventi incentivanti in numerosi paesi. In Italia, ad esempio, è fatto obbligo per i fornitori di benzina e gasolio (soggetti obbligati), di immettere nel territorio nazionale ("immissione in consumo") una quota minima di biocarburanti ogni anno al fine di svilupparne la filiera, aumentarne l'utilizzo e limitare l'immissione di CO₂ in atmosfera. Anche in funzione del complesso equilibrio tra l'obiettivo di riduzione delle emissioni di CO₂ e quello di garantire fonti alimentari certe, i biocarburanti incentivati devono rispettare criteri di sostenibilità (Direttive 2009/28/CE e 2009/30/CE), ovvero devono garantire un'effettiva

riduzione delle emissioni di gas serra lungo tutto il ciclo di vita pari al 35% (per poi salire al 50% dal 2017 ed al 60% dal 2018).

Il pilastro normativo che delinea le linee guida di sostenibilità per il settore trasporti è la Direttiva 2009/28/CE, nota anche come RED - Renewable Energy Directive, che stabilisce per tutti gli Stati membri l'obbligo al 2020 di coprire il 10% del fabbisogno energetico del settore trasporti attraverso fonti rinnovabili, ad oggi principalmente costituite da biocarburanti. In questo contesto, l'Italia ha recepito il raggiungimento al 2020 della quota del 10% di biocarburanti sul consumo complessivo del settore trasporti attraverso il Piano di Azione delle Energie Rinnovabili (PAER) del giugno 2010. Con il Decreto del 10 ottobre 2014, il Ministero dello Sviluppo Economico ha poi fissato i criteri per l'immissione in consumo dei biofuel a partire dal 2015, con la quota minima prevista salire dal 5% di quello stesso anno al 10% nel 2020.

Nel novembre 2016, la Commissione Europea ha pubblicato l'ultima di una serie di proposte di Direttive mai approvate, che dovrebbe abrogare la vigente Renewable Energy Directive (RED) del 2009. La nuova Direttiva, denominata RED II, entrerebbe in vigore dal 2021, con l'obiettivo di regolare l'utilizzo delle energie rinnovabili nel settore dei trasporti fino al 2030. Molte sono le novità della RED II, di seguito solo un piccolo sunto:

- a) l'Unione Europea deve raggiungere almeno una soglia del 27% di energie rinnovabili sul totale di energia consumata (elettrica, riscaldamento, raffreddamento e trasporti);
- b) il 6,8% dei carburanti deve provenire da fonti rinnovabili (biocarburanti avanzati ed elettricità rinnovabile);
- c) i biocarburanti avanzati prodotti dal 2021, dovranno comportare una diminuzione di emissioni del 70% rispetto ai carburanti fossili;
- d) Raggiungere al 2030 un limite minimo di blending di biocarburanti avanzati (prodotti da alghe, coprodotti di lavorazione, rifiuti ecc.) e carburanti fossili del 3,6%.

Per biocarburante si intende dunque un carburante di natura liquida o gassosa, ottenuto da biomasse e utilizzato per l'alimentazione di motori a combustione interna in miscela con i carburanti di origine fossile o, in alcuni casi, anche puro. Partendo dall'utilizzo di risorse rinnovabili, si può affermare che nel corso del processo di produzione e combustione non viene incrementato l'ammontare di CO₂ presente nell'ambiente in quanto l'utilizzo dei biocarburanti accelera semplicemente il ritorno in atmosfera della CO₂ "fissata" dalle piante, con emissioni che rientrano nel normale ciclo del carbonio.

I vantaggi ambientali tipici, comuni a tutti i biocarburanti, sono:

- produzione di biossido di carbonio (CO₂) notevolmente inferiore a quella prodotta da combustibili fossili;
- contenuto di zolfo pressoché nullo e dunque mancata produzione dei relativi ossidi (responsabili delle piogge acide);
- scarsa tendenza all'auto-infiammabilità con conseguenti minori problemi dal punto di vista del trasporto e dello stoccaggio;
- biodegradabilità.

L'impiego dei biocarburanti non va pensato esclusivamente in relazione al settore dei trasporti, ossia per l'autotrazione in sostituzione dei combustibili fossili; essi possono trovare largo impiego come biocombustibili anche nella generazione di energia elettrica e termica, ed in particolare nei processi di cogenerazione. L'impiego nel settore dei trasporti risulterebbe comunque quello maggiormente incentivato: da indagini statistiche (Fig. 1.2) si evince infatti che i consumi energetici per il trasporto di persone e merci sono maggiori di quelli del settore industriale e di quello terziario e quasi uguali a quelli del settore civile [11].

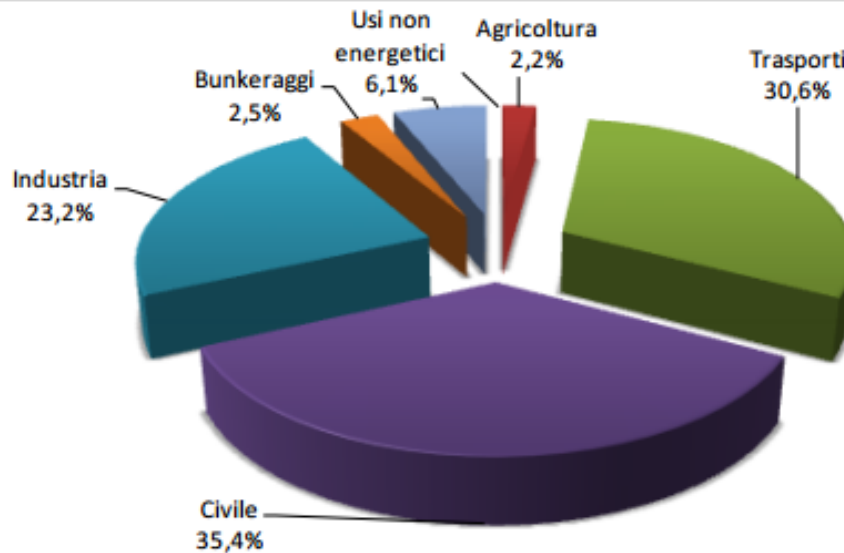


Figure 1-2: Impieghi finali di energia per settore. Anno 2010 , Fonte ENEA

1.2.1 Classificazione dei biocarburanti

La direttiva 2003/30/CE recepita in Italia dal d.lgs del 30 maggio 2005 n. 188 ed attuata tramite la legge Nazionale n. 81 del 11/3/2006, suddivide i biocarburanti nelle seguenti diverse tipologie:

- Biodiesel, ovvero l'estere metilico ricavato da un olio vegetale o animale;
- Bioetanolo, etanolo ricavato dalla biomassa e/o dalla parte biodegradabile dei rifiuti;
- Biogas, gas combustibile o miscela di diversi gas combustibili prodotti dalla fermentazione batterica in anaerobiosi di residui organici vegetali o animali;
- Biometanolo, metanolo ricavato dalla biomassa;
- Biodimetiltere, etere dimetilico ricavato dalla biomassa;
- Bio-ETBE (Etil-terz-butil-etere) e Bio-MTBE (Metil-terz-butil-etere), prodotti rispettivamente a partire dal bioetanolo e dal biometanolo;
- Biocarburanti sintetici, idrocarburi sintetici o miscele di idrocarburi sintetici prodotti a partire dalla biomassa;
- Biodrogeno, idrogeno ricavato dalla biomassa;
- Olio vegetale puro, prodotto da piante oleaginose mediante pressione, estrazione o processi analoghi; può essere grezzo o raffinato, ma chimicamente non è modificato.

1.2.2 Il Bioetanolo

Per Bioetanolo si intende l'etanolo ottenuto attraverso un processo di fermentazione da qualsiasi biomassa contenente carboidrati semplici (glucosio, saccarosio, mannosio, etc.) o carboidrati con struttura più complessa come amido, cellulosa, emicellulosa.

Le sue caratteristiche chimiche, fisiche e merceologiche lo rendono un carburante molto affine alla benzina alla quale può essere miscelato o in alcuni casi, mediante opportuni accorgimenti, sostituito interamente nell'alimentazione degli autoveicoli. Nella tabella 1.1 sono esposte le caratteristiche di maggiore rilievo riguardanti l'utilizzo del bioetanolo nei motori a benzina [12].

Table 1-1: Caratteristiche Bioetanolo/Benzina a confronto

Caratteristica	Bioetanolo	Benzina
Potere calorifico inferiore (PCI) (MJ/Kg)	27	44
Contenuto in Ossigeno (% in peso)	35	assente
Numero di ottano	113	90
Temperatura di ebollizione (°C)	78	100

Il biocarburante evidenzia una maggior capacità antidetonante rispetto a quella della benzina poiché presenta un numero di ottano più elevato. La temperatura di ebollizione, che esprime la volatilità di un liquido, nel bioetanolo è inferiore rispetto a quella della benzina; ciò si traduce in una miscelazione con l'aria più veloce ed omogenea ed una combustione migliore ed un più rapido avviamento a freddo. Unica nota negativa riguarda la bassa densità energetica del bioetanolo rispetto alla benzina, espressa come PCI, che si riflette in un maggior consumo di combustibile per chilometro. Per ovviare a questo problema è necessario aumentare il volume del serbatoio al fine di compensare la ridotta autonomia del mezzo.

L'utilizzo del bioetanolo anidro è già una realtà nei paesi del Sud America, in particolare in Brasile, dove i motori sono stati predisposti a questo uso già a partire dagli anni settanta, quando in concomitanza con la crisi energetica emersero in tutta la loro gravità, i problemi relativi agli approvvigionamenti petroliferi [11]. Sono stati quindi messe a punto le modifiche da attuare nei motori a ciclo Otto al fine di poter alimentare i veicoli con bioetanolo puro e riguardano principalmente il sistema di iniezione: quest'ultimo dovrà essere adattato ad un composto che presenta maggior quantità di ossigeno rispetto alla benzina. Altra modifica indispensabile riguarda la necessità di sostituire alcune componenti soggette al deterioramento e alla corrosione che può essere causato dai combustibili a base di alcol.

Un inconveniente riguardo all'utilizzo del bioetanolo come carburante riguarda la sua scarsa attitudine ad evaporare con le basse temperature, il che causa delle difficoltà nelle fasi di avviamento del motore: è proprio per ovviare a questo problema che si miscela il bioetanolo anidro con diverse concentrazioni di benzina dal 10% (E10) all'85% (E85). L'utilizzo di miscele a basso contenuto di bioetanolo hanno l'ulteriore vantaggio di non necessitare di una rete di distribuzione specifica (come accade invece per l'E85).

Il bioetanolo viene impiegato anche nella produzione di bio-ETBE che viene unito alla benzina come composto antidetonante ovvero in grado di regolarizzare ed omogeneizzare la combustione nella miscela all'interno del cilindro. La sintesi chimica dell'ETBE prevede la combinazione di etanolo (47%) ed isobutene (53%), quest'ultimo di origine petrolifera: per questo l'antidetonante è considerato un biocarburante solo per la frazione derivante dal bioetanolo [12].

1.2.3 Il Biodiesel

Il biodiesel è un biocarburante composto da una miscela di metilesteri di acidi grassi di oli vegetali e/o animali con un numero di atomi di carbonio da C_{12} a C_{22} generalmente, con vari gradi di insaturazione. Gli oli vegetali utilizzati per la produzione di biodiesel possono provenire da colture energetiche oleaginose dedicate che sono principalmente colza, soia, palma e girasole o da oli di scarto e grasso animale, previa rigenerazione.

Gli oli vegetali sono stati utilizzati da tempo nell'industria automobilistica; il tedesco Rudolph Diesel presentava già nel 1898 alla World Exhibition di Parigi il suo primo motore alimentato a olio di arachidi.

In tabella 1.2 sono riportate le proprietà generiche del biodiesel confrontate con quelle diesel. Rispetto al diesel petrolchimico, il biodiesel contiene tipicamente 11% di ossigeno in più portando ad una diminuzione del contenuto energetico pari al 10% ma migliorando la combustione. Il punto d'infiammabilità più alto comporta maggiore sicurezza nel trasporto e nello stoccaggio. La maggiore viscosità implica piccole

modifiche da effettuare sui motori in particolare alle guarnizioni in gomma mentre il numero di cetano più alto corrisponde ad un'accensione del motore più rapida. Il potere calorifico più basso (39 MJ/Kg rispetto a 43 MJ/Kg circa) è responsabile di consumi specifici leggermente superiori.

Quando queste specifiche sono comparabili al diesel petrolchimico, allora il biocarburante può essere utilizzato puro o in miscela a concertazione variabile con in diesel.

Table 1-2: Confronto tra le proprietà del diesel petrolchimico e del biodiesel [13]

Proprietà	Diesel petrolchimico	Biodiesel
Carbonio peso%	86,8	76,2
Idrogeno peso%	13,2	12,6
Ossigeno peso %	0	12,2
Peso Specifico	0,85	0,88
Numero di Cetano	40-45	45-55
Punto d'infiammabilità (°C)	70	120
Viscosità a 40°C mm ² /s	2 3	4 5
Contenuto energetico		
Base di massa MJ/Kg	43	39
Base di massa BTU/li.	18500	16600
Volume di base 1000 BTU/gal	130	121

Il biodiesel si ottiene sottoponendo l'olio vegetale ad un processo di transesterificazione. La transesterificazione è una reazione chimica, il cui principale risultato è la rottura delle molecole dei trigliceridi, cioè degli acidi grassi che caratterizzano l'olio vegetale e che sono alla base della sua elevata viscosità, formando 3 esteri metilici. Il processo di transesterificazione classico avviene utilizzando un reagente alcolico (in genere metanolo), la cui azione è rinforzata e accelerata da un catalizzatore (soda caustica, acido, enzima). L'alcol, reagendo con gli acidi grassi, produce da un lato biodiesel e dall'altro glicerolo. Il metanolo è l'alcool più comunemente utilizzato nel processo di esterificazione, in quanto presenta un'alta reattività comparabile agli alcoli a lunga catena [14] [15] mentre il catalizzatore più comunemente usato è acido solforico H₂SO₄ [16] [17]. La reazione tuttavia può essere svolta utilizzando, anziché metanolo, etanolo; ciò fornisce minori rese ma anche minore inquinamento derivante dalla tossicità del metanolo. Sottoprodotto è la glicerina che, depurata, può essere utilizzata per fini cosmetici o farmaceutici. Il processo di transesterificazione è riassunto nella figura 1.3.

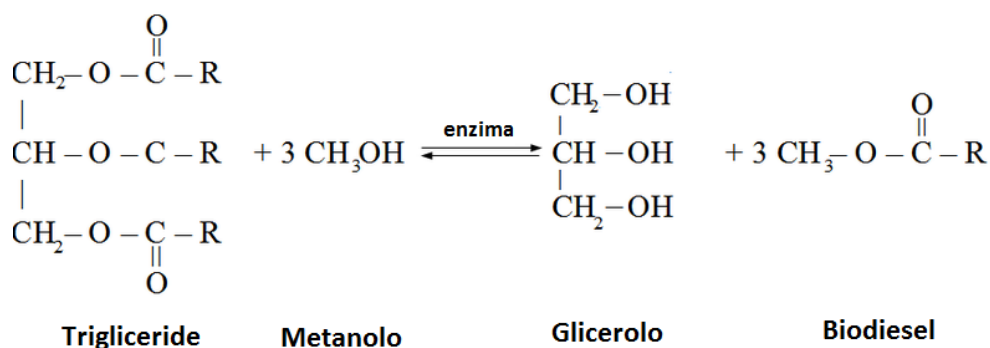


Figure 1-3: Reazione di esterificazione da triacilglicerolo a FAME

La composizione chimica del biodiesel, varia a seconda del substrato utilizzato [18], ma generalmente è composta da una miscela in percentuale variabile di acidi grassi che verranno poi eterificati e trasformati in

esteri metilici. Gli acidi grassi che posso andar a comporre il biodiesel, sono riportati in Figura 1.4, gli acidi grassi evidenziati in grigio, sono quelli più comunemente ritrovati nelle miscele di biodiesel; tra essi troviamo l'acido palmitico (C16:0), l'acido oleico (C18:1), lo stearico (C18:0), il linoleico (C18:2) ed il linolenico (C18:3) [13].

Common Name	Formal Name	CAS. No.	Abbreviation	Molecular Formula	Molecular Weight	Molecular Structure
Lauric acid	Dodecanoic acid	143-07-7	12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.32	
Myristic acid	Tetradecanoic acid	544-63-8	14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.38	
Myristoleic acid	cis-9-Tetradecenoic acid	544-64-9	14:1	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226.26	
Palmitic acid	Hexadecanoic acid	57-10-3	16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43	
Palmitoleic acid	cis-9-Hexadecanoic acid	373-49-9	16:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254.42	
Stearic acid	Octadecanoic acid	57-11-4	18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.48	
Oleic acid	cis-9-Octadecenoic acid	112-80-1	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.47	
Linoleic acid	cis-9,12-Octadecadienoic acid	60-33-3	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.46	
Linolenic acid	cis-9,12,15-Octadecatrienoic acid	463-40-1	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.44	
Arachidic acid	Eicosanoic acid	506-30-9	20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.54	
Gondoic acid	cis-11-Eicosenoic acid	5561-99-9	20:1	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310.53	
Behenic acid	Docosanoic acid	112-85-6	22:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340.60	
Erucic acid	cis-13-Docosenoic acid	112-86-7	22:1	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338.58	

Figure 1-4: Principali acidi grassi utilizzati per la transesterificazione

E' stato dimostrato che la composizione degli acidi grassi ha un enorme impatto sulle performance del biodiesel [19]. La lunghezza della catena, il grado di insaturazione e di ramificazione modificano il numero di cetano, il punto di fusione, la stabilità all'ossidazione, la viscosità cinematica ed il calore di combustione, che sono proprietà rilevanti che il biodiesel deve possedere per soddisfare gli standard come EN 14214² e ASTM D6751[20].

La relazioni tra la caratteristiche strutturali e le specifiche del biodiesel sono descritte in tabella 1.3:

² EN 14214 is a standard published by the [European Committee for Standardization](#) that describes the requirements and test methods for FAME - the most common type of [biodiesel](#) - ASTM D6751 is the standard used in USA and Canada

Table 1-1: Relazione tra la struttura degli acidi grassi ei parametri i performance del biodiesel

	N° di Cetano (alto è meglio)	Punto di fusione (basso è meglio)	Stabilità all'ossidazione (alto è meglio)	Viscosità cinematica (basso è meglio)	Calore di combustione (alto è meglio)
Lunghezza delle catene	Lunga	Corta	NR	Corta	Lunga
Grado di insaturazione	Satura	Insatura	Satura	Insatura	NR
Ramificazioni	NR	Ramificato	NR	NR	NR

* in tabella è indicata la soluzione preferibile - * NR= non rilevante

Il Biodiesel prodotto da oli vegetali, o grassi animali per mezzo di transesterificazione con alcol a basso peso molecolare è considerato un'ottima alternativa rinnovabile al gasolio di origine fossile. Esso è inoltre di facile da produrre e può essere utilizzato nei motori a diesel solo o miscelato con gasolio di origine fossile. Per l'identificazione delle miscele si ricorre alla siglatura **BD** (analoga alla **BA** per le miscele contenenti bio-alcol). Al biodiesel puro viene assegnata la sigla BD100, mentre le miscele vengono identificate con una sigla che incorpora un numero corrispondente alla percentuale di biodiesel contenuto (ad esempio, BD20 per un gasolio tagliato al 20% con biodiesel).

1.2.4 Biocarburanti di prima e seconda generazione

La classificazione del bioetanolo e biodiesel come biocarburante di prima o di seconda generazione è basata esclusivamente sulle materie prime impiegate per la sua produzione, poiché le caratteristiche del prodotto finale sono identiche.

Il bioetanolo di **prima generazione** è prodotto da materie prime di origine zuccherina e amidacee provenienti sia da colture dedicate, sia da residui agricoli e dell'industria agro-alimentare, comunemente denominate alcoligene in quanto i loro prodotti si collocano nella filiera del bioetanolo in virtù del loro contenuto in carboidrati. Quelle meglio sfruttate nella realtà italiana sono principalmente la barbabietola da zucchero ed il sorgo zuccherino per quanto riguarda le saccarifere ed il mais per quanto riguarda le amidacee. I residui agroalimentari, attualmente convertiti in bioetanolo derivano dalla fermentazione del melasso, sottoprodotto nella produzione dello zucchero, dalla distillazione delle eccedenze di vino e frutta.

Il bioetanolo di **seconda generazione** è ottenuto da materie prime lignocellulosiche che possono a loro volta provenire da colture dedicate o da biomasse residuali. Le colture alcoligene lignocellulosiche ritenute più redditizie in Italia, tra le specie erbacee annuali e poliennali, sono il sorgo da fibra, la canna comune, il miscanto ed il panico; tra le specie arboree coltivabili come ceduo a turno breve ci sono invece i salici, i pioppi, la robinia e gli eucalipti. Le biomasse residuali derivanti da scarti di potature o del verde pubblico, da scarti forestali o industriali o anche coltivazioni marginali ed infestanti, come il cardo, il cui utilizzo risulterebbe quindi ancor più vantaggioso dal punto di vista economico. Numerose ricerche realizzate su queste specie circa le caratteristiche bioagronomiche e produttive, nonché la relativa sperimentazione applicata sui principali aspetti della tecnica colturale, hanno permesso di ottenere quelle informazioni che permettono la scelta delle specie più promettenti e di quelle che per produttività, adattabilità o facilità di gestione risultano essere le più idonee all'introduzione nei nostri ambienti. Risulta evidente come la produzione di biocarburanti di seconda generazione presenti numerosi vantaggi, oltre ad evitare la competizione con la filiera agro- alimentare [21]. Questi biocarburanti sono caratterizzati da una maggiore capacità di contribuire, per unità di combustibile fossile sostituito, alla riduzione delle emissioni di gas ad effetto serra se si considera l'intero ciclo di vita della relativa filiera produttiva. Nel caso specifico delle colture da biomassa a scopo energetico, ad esempio, è noto che già oggi la produttività per ettaro è molto

più elevata rispetto a quella dei cereali o delle oleaginose, oltretutto con minori consumi idrici e richieste di fertilizzanti e pesticidi. Inoltre i processi di conversione in biocarburanti di seconda generazione consentono di utilizzare una frazione maggiore della biomassa prodotta o addirittura l'intera pianta il che si traduce immediatamente in bilanci energetici ed ambientali molto più vantaggiosi rispetto a quelli dei corrispondenti biocarburanti di prima generazione attualmente in uso.

Allo stesso modo, a seconda della biomassa utilizzata per la sua produzione, si può distinguere tra biodiesel di prima o seconda generazione.

Per la produzione di biodiesel di **prima generazione** sono impiegati semi oleaginosi derivanti da colture alimentari come il girasole, colza, olio di palma o grassi animali ottenuti da scarti di lavorazioni industriali.

L'estrazione di oli vegetali dai semi può avvenire tramite estrazione meccanica da spremitura se la componente grassa supera il 20% in peso del materiale, oppure estrazione chimica mediante utilizzo di solventi se la percentuale in peso risulta essere inferiore al 20%. Una volta estratto l'olio, questo viene purificato e sottoposto alla seconda fase di lavorazione, il processo di esterificazione dell'acido grasso.

Il biodiesel di prima generazione, comporta delle problematiche in fatto di approvvigionamento delle materie prime, perché essendo queste ultime di natura agroalimentare, di necessità comportano un elevato impatto economico sia in termini di estensione della coltura, sia in termini di approvvigionamenti alimentari. In aggiunta si potrebbe minare la biodiversità stessa della pianta, oltre che ottenere un ridotto tasso di abbattimento della CO₂ e delle problematiche a livello di processo di transesterificazione.

Il biodiesel di **seconda generazione**, viene prodotto utilizzando biomasse lignocellulosiche e la reazione di Fischer-Tropsch [22], Il processo denominato Fischer-Tropsch prevede la gassificazione delle biomasse lignocellulosiche, la purificazione e il condizionamento del gas prodotto e la successiva conversione in biocarburanti liquidi. I prodotti liquidi sono costituiti da idrocarburi a catena lineare, non contengono composti dello zolfo e possono essere ulteriormente convertiti in combustibili per l'autotrazione.

1.2.5 Biodiesel da microrganismi

Un'alternativa all'utilizzo di oli vegetali tipici della prima generazione ed alla reazione di Fischer-Tropsch è l'utilizzo dei cosiddetti "microbial oils" ottenibili dal metabolismo di alcuni microrganismi. La produzione biotecnologica di acidi grassi sta ricevendo una crescente attenzione fittando le attuali necessità riguardo ai temi di sostenibilità economica e ambientale relativi alla produzione di biocarburanti [23].

Molti microrganismi tra cui alghe, batteri e lieviti sono noti per la loro capacità di accumulare quantità significative di lipidi (Figura 1.5) [24]. L'attitudine ad accumulare lipidi sta suscitando forte interesse nel mondo scientifico per il possibile impiego di questi ultimi nella produzione di biodiesel, oltre che di biolubrificanti, bioplastiche etc. [25].

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
Microalgae		Yeast	
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bacterium		Fungi	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Figure 1-5: contenuto di olio in alcuni microrganismi[24]

I **lieviti oleaginosi** sono così definiti per la loro capacità di accumulare lipidi con alte rese. Alcuni ceppi come *Rhodospiridium sp.*, *Rhodotorula sp.* and *Lipomyces sp.* possono infatti accumulare lipidi intracellulari per una percentuale pari a circa il 70% del loro peso secco crescendo in particolari condizioni.

I lipidi prodotti sono per la maggior parte triacilgliceroli con una percentuale di acidi grassi saturi di circa il 44% valore simile a quello dei principali oli vegetali [26] e possono andare incontro al processo di transesterificazione per la produzione di biodiesel.

Nonostante il profilo lipidico dipenda dal tipo di microrganismo, dalle condizioni di crescita e dall'ambiente, gli acidi grassi più frequentemente ritrovati sono quelli a 16 e 18 atomi di carbonio (C16 e i C18) sia saturi che insaturi. Il più rappresentato nei lieviti oleaginosi sono infatti l'oleico (18:1) ed il linoleico (18:2) insieme col palmitico (16:0) ed il palmitoleico (C16:1) [27]. Questi acidi grassi sono allo stesso tempo quelli più presenti negli oli vegetali usati per la produzione di biodiesel, come olio di colza o girasole [28].

In seguito all'analisi degli acidi grassi che, come già descritto incide sui parametri di performance del biodiesel, è stato proposto di selezionare lieviti che producano una grossa quantità di oleico .

La produzione di un cosiddetto "oleochemical", come il biodiesel, mediante l'utilizzo di lieviti oleaginosi richiede comunque una selezione di una specie e del ceppo di quella specie, capace di produrre gli acidi grassi desiderati così come l'identificazione di appropriate condizione di crescita.

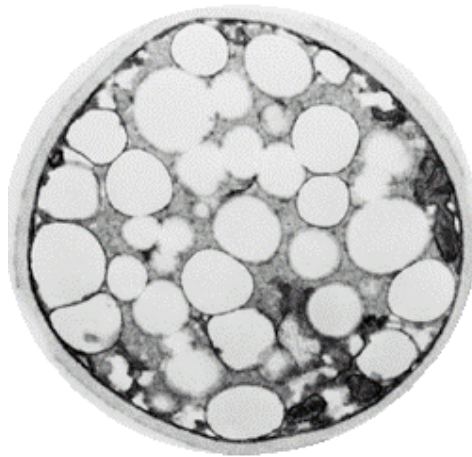


Figure 1-3: Lipidi endocellulari accumulati nei cosiddetti "lipid bodies" in una cellula di lievito

Capitolo 2 : PROCESSI DI TRASFORMAZIONE DELLE BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE

2.1 LE BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE

Per biomasse lignocellulosiche intendiamo quei materiali derivanti dai residui colturali e dalle colture agricole dedicate, di natura erbacea e/o legnosa.

La composizione di tale biomasse (Fig. 2.1) è caratterizzata dalla presenza di tre polimeri essenziali, cellulosa, emicellulosa e lignina, che insieme conferiscono la struttura della parete delle cellule vegetali. Come è osservabile in Figura 2.1, la parete della cellula vegetale consiste schematicamente di due fasi: una fase fibrillare ed una matrice [29]. La fase fibrillare è costituita dalle microfibrille di cellulosa che conferiscono al materiale resistenza e rigidità; esse sono circondate da fibrille di emicellulosa, polisaccaridi legati alla superficie esterna che tende a plastificare il materiale mantenendo costante la distanza con le microfibrille vicine mantenendo così la flessibilità del materiale. Oltre all'effetto elasticizzante, l'emicellulosa svolge anche una funzione di reticolazione, ancorando le microfibrille in maniera parziale le une con le altre. Il grado e la forza dell'ancoraggio sembrano essere modulate in modo perfetto durante l'espansione cellulare da una serie di proteine della parete cellulare che possono rompere questi legami o allentare questa associazione con la superficie microfibrillare. I polisaccaridi della parete secondaria delle cellule vegetali sono ben mantenuti in una matrice polimerica resistente e chimicamente impermeabile chiamata lignina. La parete non solo rende più resistente la parete cellulare ma consente anche lo sviluppo di sistemi vascolari esterni che permettono di far circolare l'acqua nella pianta e garantisce un miglioramento delle proprietà meccaniche.

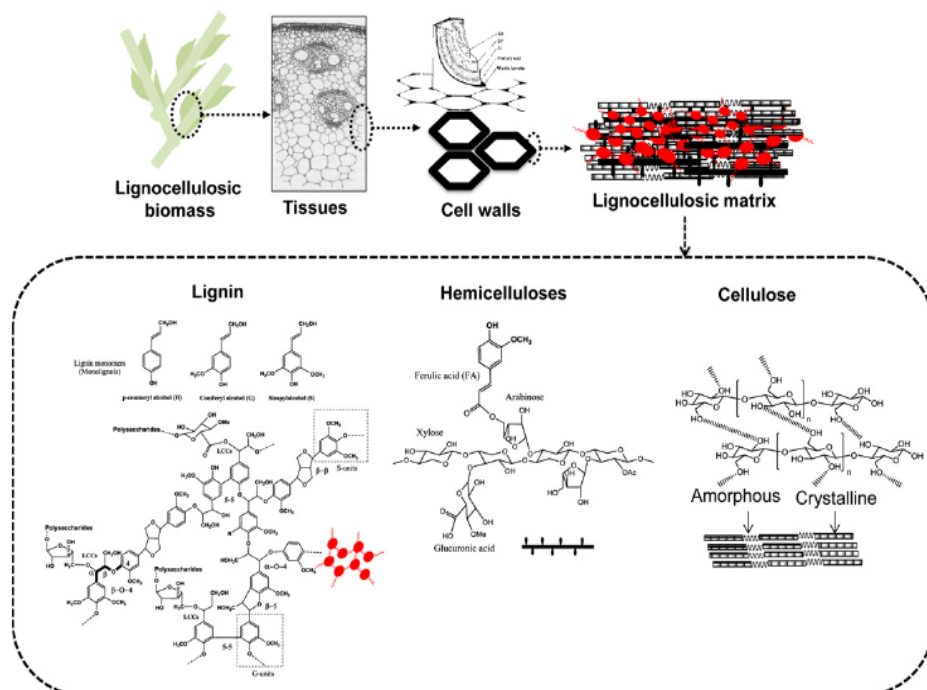


Figure 2-1: Composizione, struttura e organizzazione della biomassa lignocellulosica

La **cellulosa** è il principale costituente delle biomasse vegetali (30-60% in peso); è un polimero di molecole di glucosio unite tra loro da legami beta 1-4 glicosidici a formare catene lineari di zuccheri. Queste catene si dispongono parallelamente le une alle altre e si uniscono mediante legami a idrogeno a formare fibrille, catene molto lunghe difficili da dissolvere. La formazione delle fibrille impartisce resistenza ed elasticità alla fibra vegetale.

L'**emicellulosa** costituisce il 10-40% della biomassa lignocellulosica; si presenta come un polimero misto, relativamente corto (da 10 a 200 molecole) e ramificato, formato sia da zuccheri a sei atomi di carbonio (glucosio, mannosio, galattosio) sia da zuccheri a cinque atomi di carbonio (xiloso e arabinosio). Alla presenza dell'emicellulosa si devono alcune importanti proprietà delle fibre, la principale delle quali è quella di favorire l'imbibizione delle stesse, quando è presente l'acqua, che ne provoca il rigonfiamento. L'emicellulosa presenta proprietà adesive, pertanto tende a cementare o a diventare di consistenza cornea con la conseguenza che le fibre diventano rigide e si imbibiscono più lentamente.

La **lignina**, è uno dei costituenti principali dei vegetali poiché ne rappresenta il 10-30% della massa, in dipendenza della specie. La sua principale funzione consiste nel legare e cementare tra loro le varie fibre per conferire compattezza e resistenza alla pianta, costituisce inoltre, una protezione contro insetti, agenti patogeni, lesioni e luce ultravioletta.

La lignina è utilizzata principalmente come combustibile, ma attualmente trova largo impiego nell'industria come disperdente, indurente, emulsionante, per laminati plastici, cartoni e manufatti in gomma. Inoltre può essere trattata chimicamente per produrre composti aromatici, tipo vanillina, siringaldeide, β -idrossibenzaldeide, che possono essere usati nella chimica farmaceutica, nell'industria cosmetica e alimentare.

Oltre ai composti ad alto peso molecolare quali cellulosa, emicellulosa e lignina sono presenti altre sostanze relativamente più semplici di natura organica (estrattivi) ed inorganica (ceneri). Per **ceneri** si intende il materiale inorganico che rimane dopo la combustione del campione in condizioni standard.

La presenza della ceneri incide sulla frazione combustibile della biomassa:

- minore potere calorifico;
- maggiore quantità di materiale solido da smaltire (costi);
- formazione ed emissione di incombusti, ossia di materiale particellare nei gas di combustione;
- fenomeni di erosione, corrosione e incrostazione degli impianti (Cl e sostanze alcaline).

Riassumendo possiamo quindi affermare che le biomasse vegetali sono costituite da una serie di componenti le cui quantità e percentuali variano a seconda della specie e dell'età della pianta (Fig.2.2))[29].

Biochemical composition and physicochemical properties of different lignocellulosic biomasses.

Lignocellulosic biomasses	Grasses and energetic plants						Hardwood		Softwood	
	Wheat straw	Wheat bran	Corn stover	Rice straw	Switchgrass	Miscanthus	Poplar	Eucalyptus	Spruce	Pine
Celluloses (%)	39.6	42.5	38.8	32.0	40.1	37.7	44.5	54.1	45.5	43.3
CrI	50.3	n.d.	50.3	51.7		n.d.	49.9	54.3	38.4	n.d.
Hemicelluloses (%)	26.6	21.2	29.6	18.0	25.6	37.3	22.5	18.4	22.9	21.5
Xylose (Xyl)	24.3	15.4	22.2	14.3	22.1	33.8	19.4	15.0	6.6	5.3
Arabinose (Ara)	2.1	3.1	5.5	2.3	2.5	2.8	0.5	0.5	1.2	1.6
Galactose	0.2	2.7	2.9	1.2	1.0	0.6	2.0	1.5	0.6	2.9
Mannose	–	–	–	0.2	nd	0.1	0.6	1.5	13.5	10.7
Ara/Xyl	0.09	0.20	0.25	0.16	nd	0.08	0.025	0.03	0.18	0.3
Lignin (%)	21.0	3.4	22.1	11.2	18.8	25.1	19.5	21.5	27.9	28.3
G/S/H	49/46/05	–	35/61/4	45/60/15	–	–	41/59/nd	38/62/nd	98/tr/2	82/tr/18
β -O-4 (μ mol/g of lignin)	1040	–	610	630	–	–	2390	2780	1230	1140

G: guaiacyl units in lignin; S: syringyl units; H: p-hydroxyphenyl; CrI: crystallinity index; nd: not detected; tr: traces.

Figure 2-2: composizione chimica di biomasse lignocellulosiche [9]

È importante assicurare una corretta gestione della biomassa lungo la filiera di approvvigionamento al fine di minimizzare la contaminazione con materiali inorganici. I minerali, infatti, confluiscono nella cenere divenendo residui solidi che rimangono dopo la conversione termica o termo-chimica. Le ceneri, a loro volta, riducono l'efficienza della combustione e rappresentano un problema per lo smaltimento, quindi sarà richiesta particolare attenzione nella progettazione di caldaie e nella gestione della rimozione delle ceneri e dei minerali.

La composizione chimica influenza particolarmente le proprietà di stoccaggio del materiale, poiché gli estrattivi vengono rilasciati dal legno già a basse temperature. Cellulosa ed emicellulosa, durante lo stoccaggio della biomassa, verranno entrambe attaccate da funghi che provocheranno, così, il deterioramento del combustibile e la diminuzione del contenuto di energia nel caso in cui lo stoccaggio sia improprio.

2.2 PROCESSAMENTO DELLA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA PER BIOCARBURANTI DI II GENERAZIONE

La prima fase del processo di produzione di biocarburanti da biomasse legnose prevede la riduzione delle dimensioni della biomassa stessa, fase che può avvenire alla raccolta o in post raccolta. Per le colture erbacee in generale si prevede la trinciatura delle piante in piedi mediante l'utilizzo di macchine falcia-trincia-caricatrici, normalmente utilizzate per la produzione del silomais. Le dimensioni finali della biomassa saranno di pochi centimetri (1-2 cm). Successivamente la biomassa, a seconda della schema di processo, potrà subire una ulteriore riduzione delle dimensioni. Per rendere omogenea la composizione dei materiali legnosi viene solitamente effettuata la cippatura, un'operazione meccanica che riduce gli assortimenti legnosi di diversa misura in scaglie di piccole dimensioni, detti chip. In questo modo è agevolata la movimentazione e l'alimentazione degli impianti.

La dimensione dei chip varia con le tecniche di taglio; le dimensioni richieste sono in funzione del tipo di impianto e del suo sistema di alimentazione, da 10 a 50mm di lunghezza, da 5 a 25mm di larghezza e uno spessore pari a 1/5-1/10 della lunghezza.

La geometria, la dimensione, la densità sono caratteristiche importanti se i chip sono destinati all'industria del legno mentre l'omogeneità è il parametro più importante se i chip sono destinati alla combustione.

La qualità del legno cippato dipende sia dal materiale di provenienza che dalla tecnologia di produzione. Il processo di cippatura deve essere distinto da quello di triturazione o frantumazione del legno, che si basa principalmente su un'azione di percussione e sfibratura e che viene praticato per ridurre il volume di vari tipi di scarti legnosi. Il legno cippato, avendo una pezzatura sufficientemente regolare ed essendo costituito da particelle con dimensioni omogenee (dimensioni standard 40x20x10 mm), risulta facilmente utilizzabile quale biocombustibile.

2.2.1 Pretrattamento

La fase di pretrattamento ha lo scopo di alterare la struttura lignocellulosica, separare le tre frazioni in modo da favorire la successiva fase di idrolisi enzimatica, cercando di formare una minima quantità di composti che possano inibire la fermentazione da parte del lievito.

Nel materiale legnoso solo una piccola frazione della parete delle cellule vegetali risulta accessibile agli enzimi: un determinato pretrattamento è in grado di aumentare l'area accessibile agli enzimi eliminando la componente emicellulosica e destrutturando la lignina (Fig.2.3).

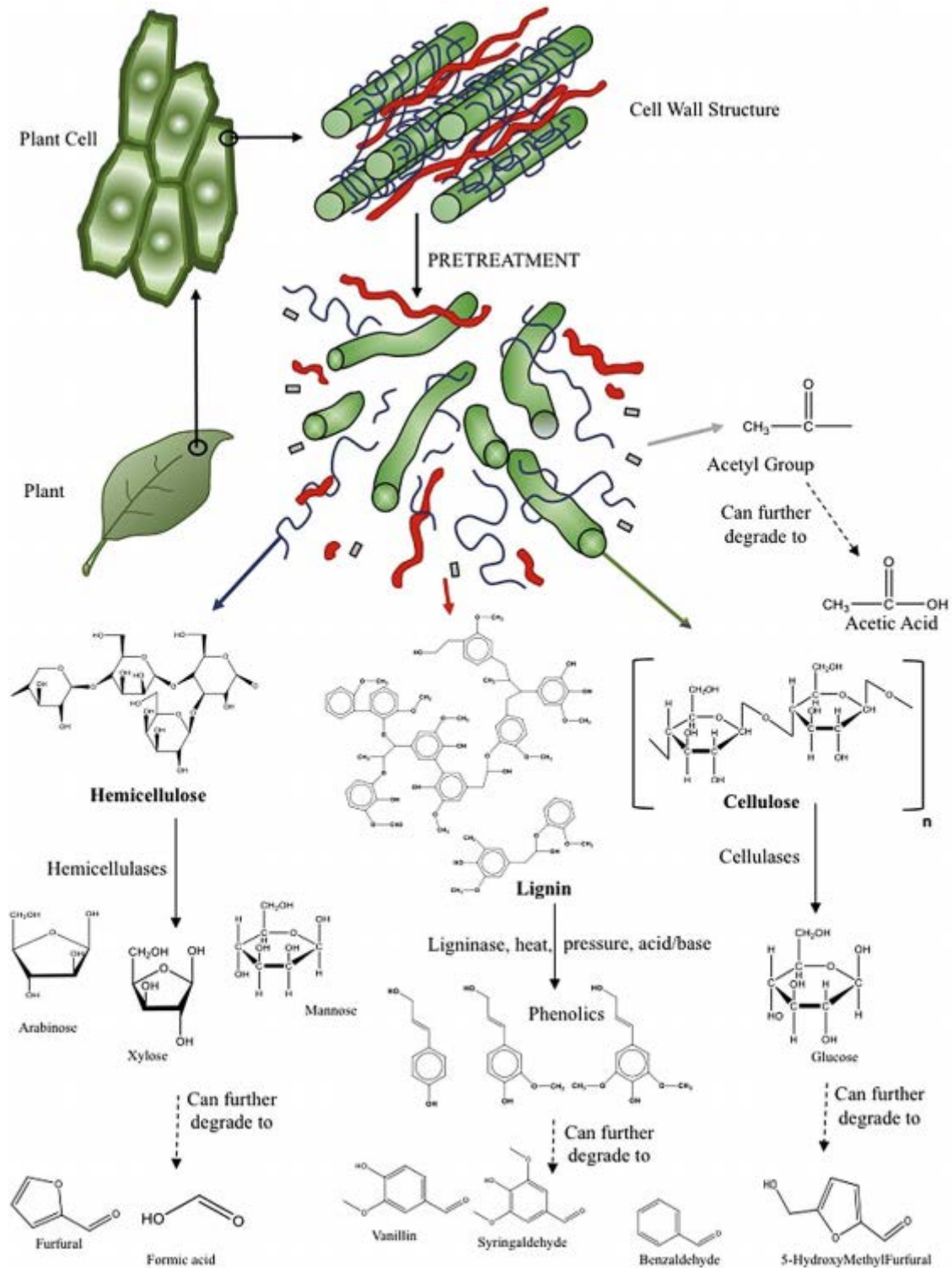


Figure 2-3: Pretrattamento e decomposizione della biomassa

Il pretrattamento può essere condotto secondo diverse modalità[30]:

A) pretrattamento con sodio idrossido: la soda è impiegata in soluzione acquosa al 8-12% in peso; il pretrattamento è condotto alla temperatura di 80-120°C e ha una durata di 30-60 minuti. Questa soluzione

tecnica è gravata dagli elevati costi, legati all'impiego di reagenti chimici e alle misure di sicurezza nelle fasi di stoccaggio e manipolazione;

B) pretrattamento di “steam explosion”: la biomassa è saturata con acqua, per azione del vapore acqueo saturo a elevata pressione (1,5-4,0 MPa) e temperatura (180-230°C) per un tempo variabile di 1-10 minuti; la biomassa è successivamente estrusa in un reattore a pressione atmosferica, dove subisce una rapida espansione. Le condizioni imposte hanno anche l'effetto di innescare una parziale idrolisi delle catene di cellulosa ed emicellulosa. Sul costo di questo pretrattamento esercita una forte incidenza l'assorbimento energetico;

C) pretrattamento di “steam explosion” con anidride solforosa: l'anidride solforosa, utilizzata in forma gassosa, ha l'effetto di acidificare la biomassa prima di sottoporla al pretrattamento di *steam explosion* e di favorire l'innescare dell'idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa. L'utilizzo di reagenti e l'assorbimento energetico rendono i costi di pretrattamento molto elevati;

D) pretrattamento di “Ammonia Fiber Explosion” (AFEX): la biomassa è sottoposta all'azione dell'ammoniaca alla temperatura di 27°C e alla pressione di 1,24 MPa; la successiva brusca riduzione della pressione determina la rapida espansione della biomassa pretrattata. I costi sono molto elevati e possono essere ridotti sostituendo l'ammoniaca con anidride carbonica, come fluido supercritico, operando a valori di pressione di 7,6-20,7 MPa;

E) pretrattamento biologico: si avvale dell'impiego di microrganismi, che disgregano la parete cellulare, degradando la lignina. In particolare sono in corso studi su alcuni funghi basidiomiceti, tra cui *Phanerochaete chrysosporium*. I risultati finora conseguiti, tuttavia, mettono in evidenza come i pretrattamenti di natura chimica e chimico-fisica siano più promettenti, soprattutto per il rendimento della successiva idrolisi enzimatica.

2.2.2 Steam explosion

Il pretrattamento della biomassa mediante Steam Explosion (SE) è al momento uno tra i pretrattamenti più utilizzati e quello meglio ottimizzato dati i vantaggi legati al suo utilizzo: il basso consumo energetico nonché alla mancanza dell'utilizzo di solventi chimici, che rende il processo “green” e ad impatto ambientale quasi nullo. Il pretrattamento di steam explosion viene attuato per destrutturare la biomassa di partenza e rendere più accessibili le catene di cellulosa durante la fase di idrolisi enzimatica (Figura 2.4).

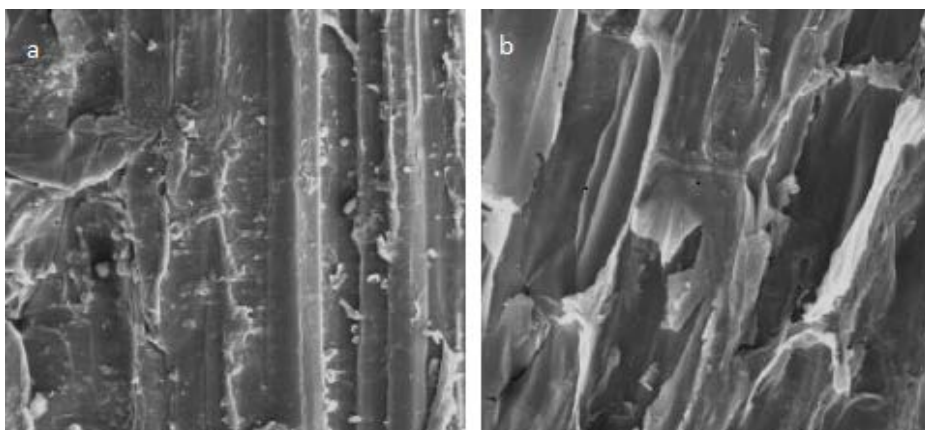


Figure 2-4: scansione SEM di un campione di cellulosa prima (a) e dopo (b) il pretrattamento

La Steam Explosion è un trattamento idrotermico che rende più facile e meno impattiva la separazione delle tre differenti frazioni costituenti i comuni substrati vegetali (emicellulosa, cellulosa e lignina). Come già accennato il processo consiste nell'uso di vapore saturo ad alta pressione per riscaldare rapidamente la biomassa in un reattore continuo o discontinuo (Fig 2.5).

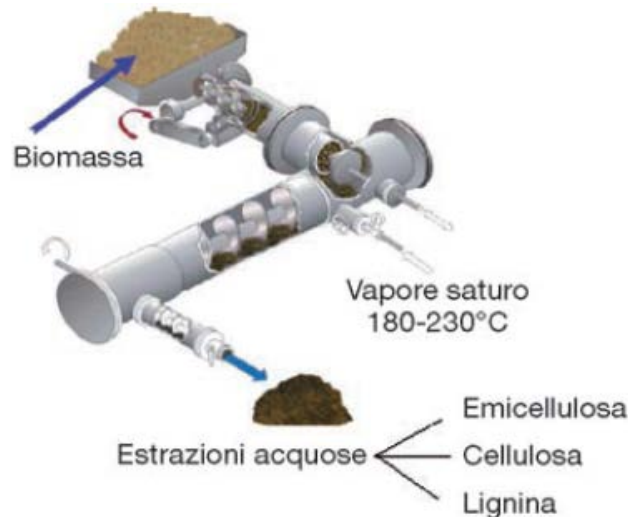


Figure 2-5: Rappresentazione schematica di un reattore di Steam Explosion

Il materiale viene tenuto alla temperatura desiderata (180-230°C) per un breve periodo (1-10 minuti) nel corso del quale l'emicellulosa viene idrolizzata e resa solubile. Alla fine di questo intervallo di tempo, la pressione viene rapidamente riportata al valore atmosferico ottenendo una decompressione esplosiva che sfibra ulteriormente la biomassa.

L'emicellulosa viene degradata mentre la lignina subisce una trasformazione legata all'alta temperatura. Gli acidi organici formati dal gruppo acetilico presente sulla matrice sembrano catalizzare ulteriormente l'idrolisi dell'emicellulosa. L'alto livello di digeribilità è dovuto alla meccanica distruzione della cellulosa cristallina durante l'esplosiva decompressione.

I fattori che influenzano questo pretrattamento sono il tempo di processo, la temperatura, la misura dei trucioli e il contenuto di umidità. E' possibile quantificare il grado di aggressività di un pretrattamento di steam explosion utilizzando un indice, il cosiddetto Fattore di severità R_0 , che combina i termini relativi a tempo e temperatura nella seguente espressione [31]:

$$R_0 = t \cdot e^{\left[\frac{(T-100)}{14.75}\right]}$$

Un'ottimale solubilizzazione e degradazione dell'emicellulosa può essere ottenuta con alte temperature per bassi tempi di reazione (270 °C, 1 minuto) o basse temperature per tempi lunghi (190 °C, 10 minuti) [32].

I vantaggi di questo processo includono una bassa richiesta energetica rispetto alla triturazione meccanica, ridotto costo ambientale o bisogno di riciclaggio. Gli svantaggi, invece, riguardano la distruzione della frazione di xilani, l'incompleta distruzione della matrice lignina-cellulosa e la generazione di composti che inibiscono i microrganismi utilizzati nelle fasi successive del processo (Fig. 2.3 e 2.6).

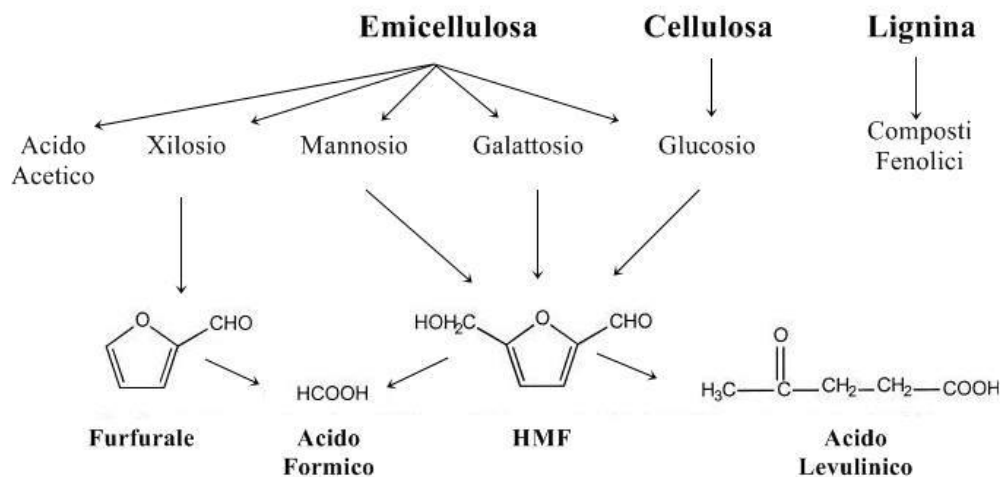


Figure 2-6: Formazione dei principali inibitori

E' noto infatti [33] che quando l'emicellulosa è degradata vengono liberati xilosio, mannosio, galattosio, glucosio ed acido acetico. Ad alte temperature e pressioni lo xilosio è convertito rapidamente in furfurale mentre il 5-idrossimetilfurfurale (HMF) si forma dalla degradazione degli esosi. L'effetto inibitorio dei furani sulla fermentazione alcolica sembra dovuto al fatto che furfurale e HMF inibiscono direttamente gli enzimi alcol deidrogenasi, piruvato deidrogenasi e l'aldeide deidrogenasi.

Quando furfurale e HMF sono degradati si forma acido formico, mentre l'acido levulinico si forma a partire dalla degradazione del solo HMF. L'effetto inibitorio degli acidi deboli è da imputare all'accumulo di anioni intracellulari. A livello intracellulare, infatti, a causa del maggiore pH, l'acido debole si dissocia liberando protoni, causando così una diminuzione del pH del citosol. La cellula contrasta questo fenomeno grazie all'azione di ATPasi di membrana, che estrudono i protoni prodotti dalla dissociazione dell'acido. In questo modo, la cellula consuma ATP riducendone di conseguenza la quantità disponibile per la crescita cellulare. Dalla parziale degradazione della lignina si generano invece composti fenolici, in diverse varianti che dipendono dal tipo di lignina dalla biomassa di partenza tra cui la vanillina, la siringaldeide, la 4-idrossibenzaldeide e l'acido ferulico. Il meccanismo inibitorio dei composti fenolici è ancora poco chiaro ma sembra essere legato alla perdita di integrità delle membrane biologiche.

È necessario in genere, dopo il pretrattamento sciacquare la biomassa con acqua per rimuovere il più possibile questi inibitori insieme all'emicellulosa solubile in acqua.

2.2.3 Idrolisi Enzimatica

La fase di pretrattamento ha dunque lo scopo di rendere la cellulosa accessibile all'attacco da parte di enzimi cellulasi, responsabili della trasformazione della cellulosa in zuccheri semplici, e di allontanare gran parte dell'emicellulosa che sarà recuperata nel liquido di lavaggio.

L'idrolisi enzimatica della cellulosa cristallina richiede tipicamente la partecipazione di tre diversi enzimi: una endo-1,4-β-glucanasi che rompe la molecola in modo casuale producendo catene con estremità libere, una eso-1,4-β-glucanasi che stacca unità di cellobiosio, dimero del β-glucosio, dalle estremità non-riducenti delle catene lineari e una β-glucosidasi che idrolizza da cellobiosio a glucosio.

Gli enzimi cellulasi sono prodotti da diversi tipi di microrganismi tra cui funghi filamentosi aerobi, actinomiceti aerobici, batteri ipertermofili etc. Gli studi negli ultimi anni si sono però concentrati in

particolare su funghi filamentosi aerobi *T. Reesei* che al momento sono quelli maggiormente utilizzati per la produzione a livello industriale degli enzimi idrolitici [34].

L'idrolisi viene solitamente condotta ad un pH di 5.0 ed alla temperatura di 45-50 °C (condizioni di lavoro ottimali per l'enzima) e viene effettuata per 48-72 ore, per ottenere la massima concentrazione di glucosio possibile.

L'esatto meccanismo di idrolisi della cellulosa non è conosciuto, sebbene siano stati proposti vari meccanismi d'azione. Una di queste teorie prevede un'iniziale attacco dalle endocellulasi (EG), che rompono i legami β -1,4 interni, dando vita ad una sezione di cellulosa amorfa. Le esocellulasi (CBH), di seguito, attaccano le unità di cellobiosio all'estremità non-riducente della cellulosa. Infine, le β -glucosidasi (β G) convertono il cellobiosio in glucosio monomero (Fig.2.7) [35].

Caratteristica importante da ricordare è che questi enzimi agiscono in sinergia o in cooperazione[36]. Le endocellulasi agiscono, quindi, internamente sulla cellulosa lineare, producendo estremità riducenti o non-riducenti che possono essere attaccate dalle esocellulasi, le quali rimuovono una molecola terminale, o nuovamente da endocellulasi, producendo altre piccole cellobiosine. Entrambi questi enzimi sono inibiti dal cellobiosio, ma la rottura del cellobiosio in glucosio, da parte della β -glucosidasi, riduce fortemente questa inibizione, aumentando l'attività cellulolitica. Dopo l'idrolisi gli enzimi si distaccano dal substrato e ritornano nel mezzo fluido, pronti per un nuovo attacco idrolitico.

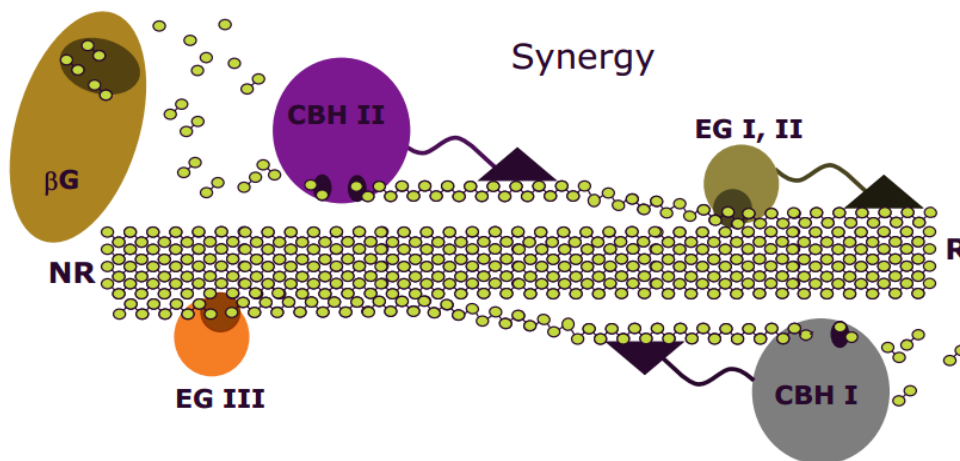


Figure 2-7: Azione degli enzimi cellulasi e β -glucosidasi

L'obiettivo da perseguire nel processo di idrolisi è la conversione di una grande quantità di cellulosa nel minor tempo possibile: l'efficienza dell'enzima può essere definita in termini di percentuale di cellulosa convertita (ovvero la quantità di cellulosa convertita in glucosio sul totale di cellulosa iniziale). E' facile dedurre che una maggiore efficienza è ottenibile o lavorando in eccesso di enzima o allungando i tempi di idrolisi; ma in questo caso bisogna considerare la convenienza del processo in termini di capitale speso: il costo globale del processo di trasformazione della materia prima lignocellulosica in etanolo è quindi fortemente influenzato dalla voce di acquisto enzimi rendendo di importanza primaria un possibile riutilizzo degli enzimi stessi attraverso immobilizzazione.

Un importante elemento da tenere in considerazione è la possibile inibizione degli enzimi da parte del glucosio: una eccessiva quantità di glucosio bloccherebbe l'attività enzimatica riducendo le rese.

Numerosi studi sono stati condotti su dei promettenti microrganismi capaci di produrre enzimi cellulolitici, quali cellulasi, emicellulasi, xilanasi, mannanasi. Questi microrganismi possono essere sia batteri, aerobici o anaerobici, che funghi [37].

2.3 PROCESSI BIOCHIMICI

Un processo biochimico sfrutta la capacità biosintetica dei microorganismi per convertire un substrato grezzo in un prodotto utile per altri scopi o processi industriali.

Quando si mette a punto un processo di questo tipo, con l'obiettivo di ottenere un determinato prodotto, è necessario conoscere nel dettaglio la fisiologia del microorganismo utilizzato e le condizioni ottimali per favorirne l'attività metabolica per l'ottenimento di uno specifico prodotto. Non sempre le condizioni ottimali di crescita microbica coincidono con le condizioni ottimali per la produzione del metabolita desiderato. I prodotti di un processo metabolico, definiti metaboliti, sono classificati in:

1. Metaboliti primari
2. Metaboliti secondari
3. Metaboliti terziari

I metaboliti **primari** si ottengono quando infatti la fase di crescita del microorganismo coincide esattamente con la fase di produzione del metabolita, il quale sfrutta un processo biosintetico catabolico. Possono essere classificati metaboliti primari: la biomassa stessa (intesa come accumulo cellulare utilizzabile per altri processi biochimici), oppure prodotti di fermentazione diretta (alcolica o lattica).

I metaboliti **secondari** invece presentano una modalità di biosintesi, non è correlata direttamente alla crescita microbica. Infatti iniziano il loro ciclo produttivo al termine della crescita esponenziale (Fig. 2.8).

Per comprendere meglio questo processo, andiamo a considerare una curva di crescita microbica, dove possono essere individuate due zone di sviluppo (**Trofofase** ed **Idiofase**). La trofofase fa riferimento alla fase di crescita microbica, mentre l'idiofase fa riferimento alla produzione del metabolita a partire dall'arresto della crescita esponenziale. Il parametro che permette il viraggio metabolico da crescita esponenziale, ad accumulo metabolico, dipende dalla concentrazione di N (azoto) nel mezzo. Quando la biomassa ha consumato tutto l'N presente nel terreno colturale, non può più continuare a moltiplicarsi esponenzialmente, e quindi utilizza il C (carbonio) rimanente, in modo tale da iniziare la fase di accumulo di materiale di riserva, andando a costituire così delle riserve energetiche. Tra i metaboliti secondari possiamo individuare composti come acido citrico o accumulo di lipidi nel citoplasma.

I metaboliti **terziari** invece presentano una netta distinzione tra trofofase e l'idiofase, essendo prodotti durante la fase anabolica del metabolismo, e generalmente non sono prodotti essenziali per la crescita cellulare, in questo gruppo possono essere classificati prodotti di biosintesi come gli antibiotici.

In figura 2.8 sono riportati gli andamenti delle diverse tipologie di metaboliti in riferimento al tempo di reazione ed alle concentrazioni delle fonti di C ed N nel mezzo.

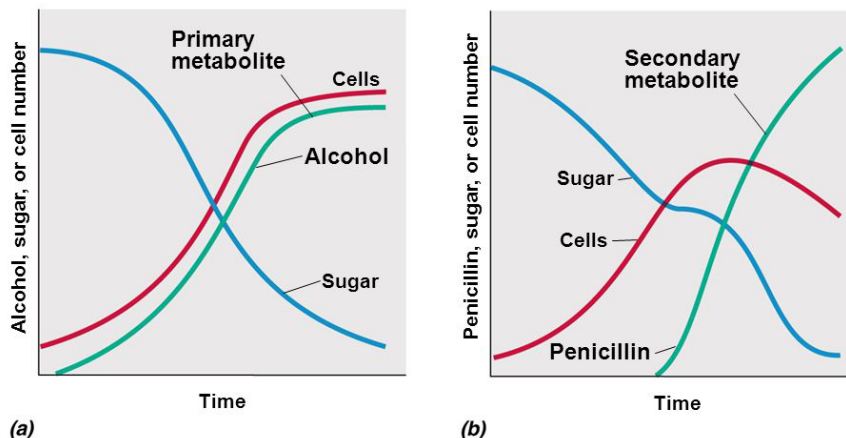


Figure 2-8: Curve di produzione di metaboliti (in verde) primari (a) e secondari (b)

Si nota infatti che nella produzione dei metaboliti di primo ordine la sintesi è correlata alla crescita microbica. Per le altre due tipologie si ha invece una fase di latenza nella produzione più o meno accentuata in base al tipo di metabolita considerato.

Un passaggio obbligato per mantenere la dipendenza del metabolita dalla fonte di N, è la preparazione del mezzo di coltura. Quando si prepara un terreno colturale, non si tiene conto solo del rapporto C/N, ma anche di tutti gli altri elementi e condizioni che servono al microrganismo per produrre la maggior quantità di metabolita.

I processi biochimici a livello industriale o semi industriale, vengono svolte all'interno di bioreattori.

Il bioreattore oltre a servire come contenitore per la reazione, svolge altre importanti funzioni; come l'isolamento della coltura microbica dall'ambiente esterno impedendone l'inquinamento o la fuoriuscita, serve a gestire e controllare tutti i parametri di reazione come ossigenazione, pH, temperatura, quantità dei nutrienti ecc.

Esistono due grandi tipologie di bioreattori suddivisi in base al tipo di agitazione che utilizzano:

1. Bioreattori ad agitazione meccanica o convenzionale (Stirred Tank Reactor STR)
2. Bioreattori non convenzionali o reattori a circolazione (Bubble Column ed Air Lift).

Il sistema più utilizzato a livello internazionale nei processi di fermentazione è il reattore STR (Fig.2.9).

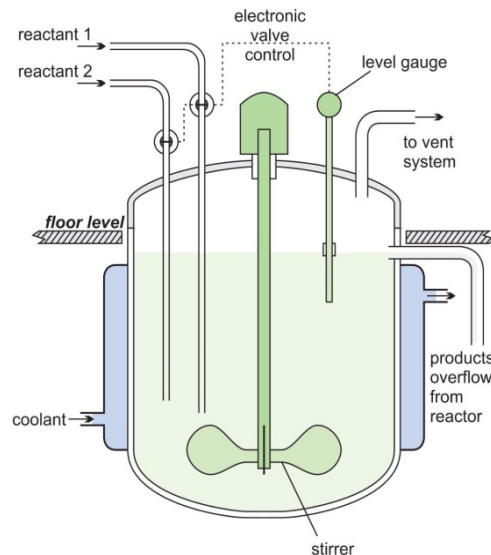


Figure 2-9: Schema di un fermentatore STR

Quando si allestisce un processo biochimico in un bioreattore, un passaggio essenziale è la preparazione del terreno colturale, che prevede l'adeguata miscelazione di tutti i nutrienti che serviranno ai microrganismi nella fase fermentativa. Gli elementi da combinare al terreno per avere un'adeguata formulazione sono:

1. fonte di carbonio (C),
2. fonte di azoto (N),
3. fonte di sali minerali ed oligoelementi.

Per il C vengono utilizzati generalmente melassi [38], ricavati dalla lavorazione diretta o da scarti di lavorazione di colture zuccherine come la barbabietola, canna da zucchero o lo sciroppo di mais, ma per far fronte alla richiesta energetica si sta cercando di utilizzare come fonte di carbonio gli zuccheri derivanti da materiale lignocellulosico. Come fonte di N vengono utilizzati composti organici ed inorganici, come NH_3 , acque di macerazione, farine vegetali, borlande di distilleria. Come fonti di oligoelementi e sali minerali,

invece vengono utilizzati estratto di lievito, peptoni o idrolizzato di caseina, mentre per le fonti di sali inorganici vengono utilizzati i sali specifici corrispondenti.

Dopo aver valutato la composizione chimica degli elementi che servono al microrganismo per portare alla produzione ed eventuale accumulo del metabolita, si passa a correggere ed impostare gli altri fattori che servono per avere il massimo rendimento dal processo. I parametri che vanno verificati, corretti o regolati sono: pH, temperatura, ossigenazione, precursori, antischiuma.

Dopo la preparazione del terreno, il fermentatore ha la possibilità di regolare in automatico il pH la temperatura, l'ossigenazione ed agenti antischiuma in base alle diverse condizioni di crescita ottimali per ottenere la massima resa di produzione.

Il terreno deve essere sterilizzato, in modo tale da mantenere isolato il microrganismo dall'ambiente esterno, ed avere una coltura pura che porti alla produzione del metabolita desiderato, ed in contemporanea, impedisce la contaminazione del microrganismo verso l'ambiente esterno al reattore.

Contestualmente alla preparazione del terreno, si procede alla preparazione dell'inoculo che verrà utilizzato per la fermentazione. L'inoculo microbico, viene preparato in più step, si parte dalla scala di laboratorio, dove viene controllata la purezza delle colture microbiche, e successivo preinoculo per ottenere una quantità di biomassa tale da poter inserire nel reattore e avviare subito la fermentazione.

Nell'allestimento di un processo biochimico, bisogna considerare anche la tipologia di coltura più adatta al processo, si possono infatti applicare colture in batch, fed-batch o in continuo, e la scelta di una modalità rispetto ad un'altra dipende principalmente dal metabolita che si vuole produrre e dal tipo di impianto che si utilizza.

La reazione in batch prevede un sistema chiuso, dove non si ha né fuoriuscita di materiale, né ingresso di nuovo terreno colturale, i microrganismi presentano una normale curva di crescita, e limitata nel tempo.

La coltura in fed-batch presenta invece l'ingresso di nuovo substrato fermentabile, quindi anche una variazione di volume all'interno del fermentatore, ma nessuna fuoriuscita di prodotto; questo processo, permette l'aumento dei tempi fermentativi rispetto ad una normale fermentazione batch, ma comunque limitata nel tempo. Un esempio di coltura in fed-batch è la produzione di lipidi da parte di lieviti oleaginosi, perché viene aggiunto nuovo terreno colturale al reattore prolungando la reazione [39].

Il processo in continuo prevede costante ingresso e fuoriuscita di substrato e metaboliti, con recupero di biomassa che viene reinserita nel ciclo produttivo. Questo procedimento permette di aumentare le rese produttive prolungando il tempo in cui i microrganismi possono utilizzare terreno fresco senza subire inibizione [40] causata dall'aumento della concentrazione del prodotto stesso. Un esempio di questo processo è la produzione di idrogeno in continuo da colture anaerobiche di microrganismi [41].

Al termine del processo di trasformazione biochimica, si passa alla fase di down-stream, isolamento e purificazione del metabolita. Esistono varie tipologie di purificazione dei metaboliti microbici, e variano in base alla tipologia di metabolita che si sta producendo. Si passa infatti dalla semplice separazione delle cellule microbiche dal terreno colturale qualora il metabolita finale sia la biomassa stessa da utilizzare in altri ambiti industriali, alla distillazione per la separazione del bioetanolo; a processi più complessi che generalmente sono associati a metaboliti di secondo e terzo ordine.

Per questi metaboliti, in base alla loro localizzazione se intra o extra cellulari si attuano processi di purificazione, che prevedono l'allontanamento della biomassa qualora siano extra cellulari o la lisi cellulare qualora siano intracellulari. Una volta separati dalla biomassa o dai detriti cellulari, si passa alla fase di purificazione attuata con tecniche differenti che vanno dalla semplice precipitazione sotto forma di sale a tecniche più elaborate come le cromatografie ed ultrafiltrazione.

L'ultimo parametro da tenere in considerazione quando si allestisce un processo biochimico, sono le rese di reazione ottenibili, che cambiano sostanzialmente in base al tipo di metabolita che si vuole ottenere.

La resa di processo è espressa in genere come grammi di prodotto su litro di brodo di coltura, ogni tipologia di metabolita ha le sue rese tipiche, ad esempio per la produzione di etanolo, si ottengono rese di circa il 50%, in quanto metà del substrato è utilizzato per la crescita microbica; per i metaboliti isolabili catabolici, si possono raggiungere rese per metabolita comprese tra il 50 ed il 90% come ad esempio la produzione di acido citrico. Per i metaboliti di terzo ordine non vi è invece una correlazione diretta tra i litri di terreno utilizzato e le unità di prodotto formato. Ne è un esempio la biosintesi di Vitamina B12 che viene prodotta in piccole quantità (pochi mg/l), ma il valore del prodotto finito permette di superare i costi di gestione dell'impianto [42]. Per migliorare le rese di produzione, oltre a formulare un terreno colturale adeguato, si può agire sulla fisiologia del microrganismo come ad esempio andare ad aumentare la permeabilità di membrana qualora il prodotto sia intracellulare, favorendone la fuoriuscita.

2.3.1 Fermentazione alcolica

Il processo di fermentazione di zuccheri semplici in glucosio è noto da tempi remoti: durante questo processo una molecola di glucosio è convertita in due molecole di etanolo con contestuale formazione di due molecole di CO_2 .

La fermentazione degli zuccheri semplici della cellulosa è svolta principalmente da lieviti, in particolare per quanto riguarda la produzione di bioetanolo dal lievito *S.Cerevisiae*, un organismo che produce etanolo con alte rese ed ha una spiccata tolleranza verso l'etanolo stesso, che come solvente può creare gravi danni alla cellula fermentante. In un processo industriale il primo requisito per un organismo fermentante è che esso sia in grado di assicurare alte rese in termini di etanolo prodotto e ottimizzare i tempi di fermentazione, riducendo la fase di crescita e divisione cellulare durante la quale non è prodotto etanolo; *S.Cerevisiae* risponde in modo eccellente a tali requisiti. A livello molecolare come primo step avviene il processo di glicolisi: la molecola di glucosio, defosforilata da due molecole di ATP, si scinde in due molecole di acido piruvico. L'assenza di ossigeno impedisce poi il verificarsi del normale ciclo di Krebs e della respirazione cellulare aerobica implicante il trasferimento di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna; è per tale ragione che la cellula passa ai processi caratteristici della fermentazione. Il *S. Cerevisiae* richiede in realtà una piccola quantità di O_2 per la sintesi degli steroli, implicati nella costituzione delle membrane cellulari. Pertanto durante la fermentazione periodicamente e in maniera controllata si alimenta dell'aria. Il flusso d'aria aiuta anche a rimuovere CO_2 dalla soluzione. La concentrazione di O_2 disciolto deve essere mantenuta a valori molto bassi per evitare l'attivazione del metabolismo aerobico.

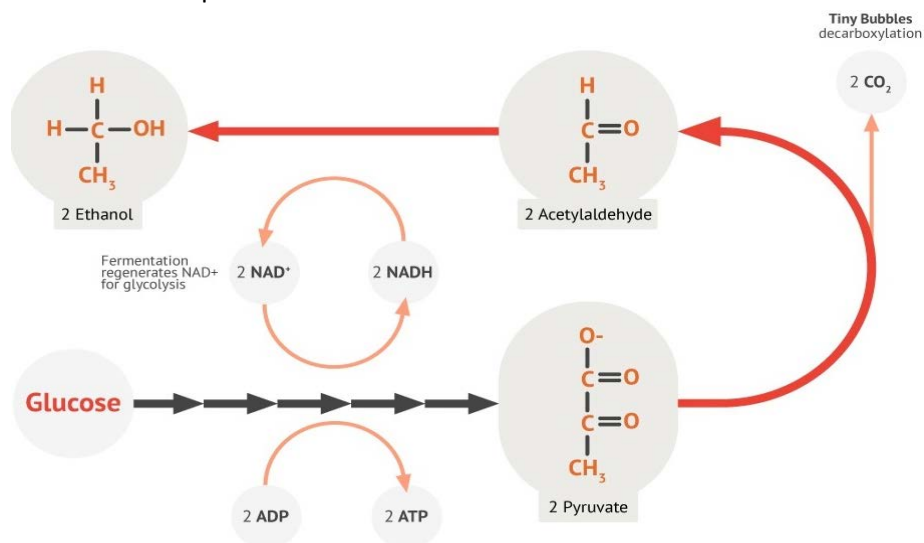


Figure 2-10: Fermentazione alcolica

L'acido piruvico viene privato di una molecola di anidride carbonica (liberata nell'ambiente extra cellulare) spezzando il gruppo -COOH per formare come prodotto intermedio l'aldeide acetica, estremamente velenosa. Questa viene infine arricchita di due ioni idrogeno, la cellula ricarica così le molecole di NAD e forma, in qualità di sottoprodotto, l'etanolo (Fig. 2.10).

La fermentazione è dunque un processo mediante il quale le molecole di zuccheri esosi (principalmente glucosio) sono convertite in etanolo fino a valori di concentrazione inferiori alla soglia di inibizione dei lieviti utilizzati (i.e. 10-18% v/v per *Saccharomyces cerevisiae*).

E' importante considerare, tra gli aspetti limitanti il processo stesso, l'incapacità di tali lieviti di fermentare gli zuccheri pentosi, non possedendo enzimi in grado di utilizzare tali zuccheri nelle proprie vie metaboliche: a questo scopo sono in via di studio ceppi modificati in grado di utilizzare entrambe le tipologie di zuccheri, aumentando le rese del processo.

2.3.2 Biosintesi di lipidi

Nel lieviti oleaginosi posti in particolari condizioni di stress, il carbonio metabolizzato è convogliato nel ciclo degli acidi grassi, portando alla biosintesi di acidi grassi, accumulati in goccioline all'interno della cellula.

I lieviti definiti non oleaginosi, al contrario, se sottoposti alle stesse condizioni limitanti di crescita, tenderanno a limitare la crescita di biomassa, o continueranno a metabolizzare il carbonio rimanente nel mezzo di coltura non per l'accumulo di lipidi, che si attesta solo intorno al 10%, ma per accumulare una vasta gamma di polisaccaridi (glicogeno, glucani, mannani) [28].

Per permettere ai microrganismi oleaginosi di accumulare lipidi, è necessaria la limitazione dell'azoto nel terreno di coltura, creando un rapporto C/N sbilanciato a favore del primo.

L'importanza di un rapporto C/N sbilanciato è spiegata dal fatto che in un terreno di coltura ricco in fonti di carbonio e carente in azoto la produzione della biomassa cellulare, quindi la sintesi delle proteine e degli acidi nucleici, rallentano mentre l'eccesso di carbonio promuove la sintesi di triacilgliceroli (TAGs), sotto forma di gocce lipidiche intracellulari [43]. In particolare, in condizioni di un alto rapporto C/N diminuisce la produzione di AMP, si interrompe il ciclo degli acidi tricarbossilici, incrementa il livello dell'enzima isocitrato deidrogenasi che provoca l'accumulo di isocitrato fino al raggiungimento di un valore critico. Questo composto viene convertito in citrato e successivamente in acetil-CoA nel citoplasma. L'acetil-CoA viene trasportato nel citoplasma e deriva dalla ripartizione di acido citrico che le cellule avevano precedentemente accumulato all'interno dei mitocondri. La presenza dell'enzima ATP citrato liasi (ACL) è stata identificata come fondamentale per la formazione di acetil-CoA nei microrganismi oleaginosi. L'attività della ACL è necessaria per tenere conto della capacità di accumulo dei lipidi, ma la sua presenza non è una garanzia che il microrganismo oleaginoso. Successivamente il citrato entra nel citoplasma attraverso uno scambio con il malato e viene scisso dalla ACL per dare acetil-CoA, che viene utilizzato per la biosintesi degli acidi grassi e dell'ossalacetato [44, 45].

Questo passaggio è considerato come il collo di bottiglia per la biosintesi degli acidi grassi. La sintesi di 1 mole di un acido grasso C18 richiede 16 moli di NADPH. Il principale fornitore di NADPH per la biosintesi degli acidi grassi è considerato l'enzima malico. Tuttavia, l'attività di questo enzima non sembra essere onnipresente tra i microrganismi oleaginosi e può essere anche assente in alcuni di essi [46]. Dopo la generazione del malonil-CoA la biosintesi degli acidi grassi prosegue con l'ausilio del complesso multi-enzimatico dell'acido grasso sintetasi (FAS). L'ultima fase prevede l'esterificazione dell'estere dell'acido grasso-CoA con glicerolo per dare la forma di triacilglicerolo (TAG). Questa sintesi è condotta principalmente dalla α -glicerolo fosfato. [45]

In quasi tutti gli organismi, la biosintesi dei lipidi risulta nella formazione di acidi grassi saturi ed insaturi C16 o C18. In generale, l'acido oleico (Δ^9 C18: 1) è il principale acido grasso accumulato con quantità che

raggiungono in alcuni casi il 70% w/w, mentre il linoleico ($\Delta 9,12$ C18:2) si trova come quantità al secondo posto [45].

Il processo è riassunto nella Figura 2.11 [46]:

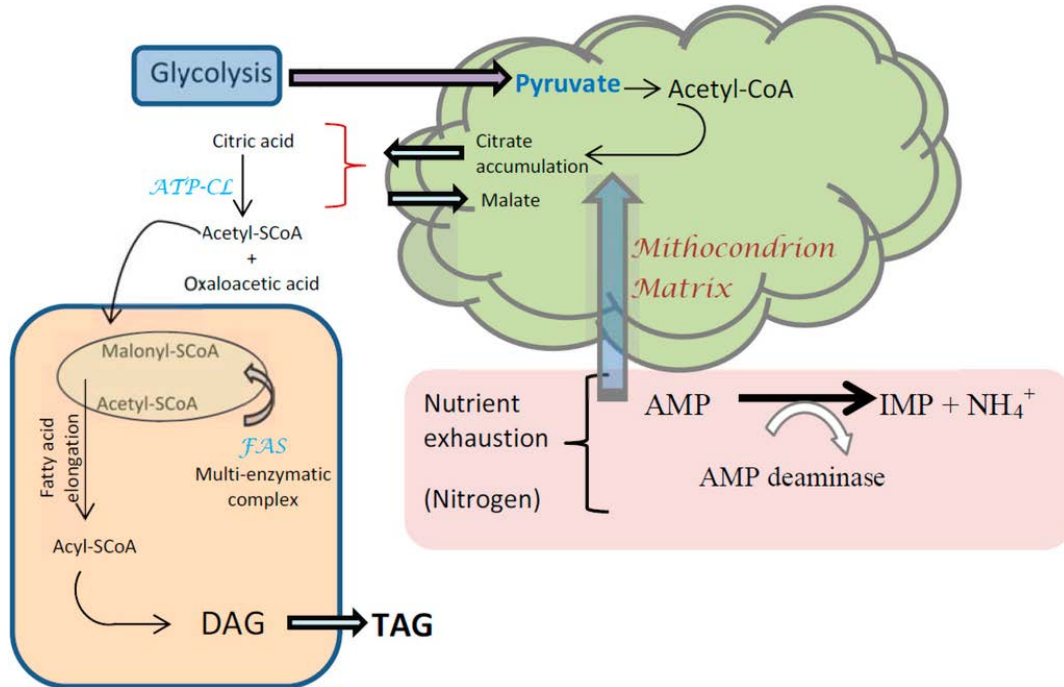


Figure 2-11: Processo di biosintesi dei lipidi

Il costo della produzione di oli da microrganismi, ancora presenta un prezzo superiore all'olio prodotto da colture oleaginose, ma vi sono vari studi in corso volti all'ottimizzazione dei processi al fine anche di diminuire i costi di produzione dei grassi, che saranno poi trasformati in biodiesel.

A tale scopo risulta interessante il possibile utilizzo di materiale lignocellulosico come fonte primaria di carboidrati, diminuendo così i costi di approvvigionamento della materia prima.

Capitolo 3 : BIOMASSE TESTATE NELLA SPERIMENTAZIONE

3.1 BIOMASSE RESIDUALI PER LA PRODUZIONE DI BIOCARBURANTI

Il termine biomasse residuali indica quella fonte di materie prime da destinare alla valorizzazione energetica e non, senza impiegare terreno per colture dedicate ma trasformando i residui, agroforestali ed agroindustriali considerati scarti e gravati da costi di smaltimento, in una fonte di energia.

I produttori potrebbero pertanto risparmiare fasi di dismissione in discarica, bruciatura in loco o interrimento che causano immissioni in atmosfera creando benefici in termini economici ed energetici.

All'interno di questa trattazione sono state inserite come appartenenti a questa categoria anche tutte le biomasse coltivate in terreni non adibiti all'agricoltura in quanto aridi, sconnessi e difficilmente coltivabili, come per esempio il cardo.

3.1.1 Biomasse Spiaggiate

Il fenomeno dello spiaggiamento è un fenomeno del tutto naturale e riconducibile all'effetto sinergico tra la presenza quali-quantitativa delle specie vegetali nell'ecosistema marino, i cicli biologici delle specie stesse, l'idrodinamismo (intensità e direzione delle onde e delle correnti), geo-morfologia dei litorali (natura del litorale, orientamento della costa, presenza di baie e porti o altre strutture di origine naturale o antropica).

Le intense precipitazioni innescano a livello dei fiumi processi colluviali, come frane e colate detritiche, i quali accoppiati alle dinamiche fluviali, immettono nel corso del fiume grandi quantità di sedimenti e spesso residui legnosi quando i bacini dei fiumi scorrono all'interno di foreste.

I residui legnosi si immettono nei canali e vengono trasportati lungo il corso del fiume accumulandosi nel suo letto, oppure vengono spinti direttamente verso il mare (Fig 3.1). In questo modo i residui vegetali si accumulano sui litorali marittimi causando la formazione di ammassi legnosi tanto più abbondanti quanto è vicina la foce del fiume. Il fenomeno di accumulo è accentuato durante le periodiche mareggiate invernali.

Le biomasse vegetali spiaggiate rappresentano, quindi, materiale organico di natura vegetale, trasportato sulla costa dal moto ondoso, dalle correnti e dai venti [47].



Figure 3-1: Biomasse spiaggiate lungo le coste italiane

Rispetto alle classiche tipologie di biomasse lignocellulosiche, le biomasse spiaggiate possono presentare caratteristiche differenti, come ad esempio il contenuto di Sali che può essere valutato indirettamente misurando la conducibilità elettrica (EC) dell'acqua di lavaggio della biomassa. La EC, infatti, è un parametro

correlato alla concentrazione di sali solubili totali disciolti in un certo volume di acqua e misura la capacità di una soluzione di condurre corrente elettrica. I sali disciolti in acqua liberano ioni, quindi, maggiore è la quantità di ioni disciolti, maggiore sarà la conduttanza, ovvero la capacità di tale soluzione di condurre elettricità.

Il contenuto di sostanze volatili, carbonio, azoto e idrogeno mostra valori tipici delle biomasse legnose, mentre il contenuto di ceneri è mediamente superiore rispetto ad esse. Questo è dovuto principalmente alla presenza di sabbia depositata sul materiale legnoso.

Per quanto riguarda la salinità, invece, i materiali assorbono una quantità di sali minore in proporzione al proprio peso, inoltre elevate quantità di sali sono presenti soprattutto sulla superficie del materiale e, pertanto, potenzialmente asportabili mediante un lavaggio idoneo.

Da dati raccolti durante la campagna di studio effettuata dal CIRIAF unitamente con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare nel periodo 2010-2015 hanno mostrato che, ogni anno, si accumulano sui litorali, circa 200.000 tonnellate di residui di biomasse vegetali [48].

La normativa vigente inquadra tali biomasse ai sensi dell'art. 184, comma 1, lettera d) del D.Lgs. 152/2006 e ss. mm. ii., fra "i rifiuti di qualunque natura o provenienza, giacenti sulle strade ed aree pubbliche o sulle strade ed aree private comunque soggette ad uso pubblico o sulle spiagge marittime e lacuali e sulle rive dei corsi d'acqua", rientrando di fatto nella categoria dei rifiuti urbani. Tale decreto però non definisce strumenti operativi in merito alla gestione di tale materiale che, stante le evidenti peculiarità, non risulta di semplice esecuzione. Ogni comune è pertanto tenuto alla raccolta di tali rifiuti ed il loro smaltimento in discarica oppure ad un loro incenerimento in situ. Il primo approccio è contraddistinto da alti costi gestionali, stimati intorno ai 120 €/ton, e da problematiche ambientali quali l'occupazione di terreni oltre che dall'inquinamento di suolo, acqua ed aria legato al rilascio di prodotti di degradazione da parte del legno in putrefazione. L'incenerimento in situ è sicuramente un approccio economicamente più conveniente ma molto più impattante a livello ambientale. Bruciare infatti tali materiali può causare la produzione di poli-cloro dibenzo diossine e furani (PCDD/F) a causa del sale assorbito da tali biomasse.

L'obiettivo è pertanto quello di valorizzare tali biomasse cercando di ottenere, da quelli che altrimenti sarebbero rifiuti, energia e/o prodotti ad alto valore aggiunto.

3.1.2 Potature d'Olivo

La coltura dell'olivo è molto diffusa nel Centro-Sud Italia, ma è anche presente in zone pedemontane nei pressi dei grandi laghi del Nord (lago di Garda), oltre che in Liguria e Romagna. La forma e le dimensioni variano in maniera consistente di zona in zona, dalle piccole dimensioni dell'Italia centrale (circa 4-5 metri), fino a piante di 15-20 m in alcune zone del Sud-Italia [49]. I residui della potatura dell'olivo consistono in legna e frasche (o ramaglie), per questo, molto spesso le potature vengono lavorate in un secondo momento onde separare tronchi e rami dalle frasche. La raccolta della legna, costituita da rami di maggiori dimensioni, e delle frasche avviene durante e dopo la potatura (gennaio-aprile), che viene effettuata con cadenze variabili in base alle metodologie colturali ed alle varietà delle colture. Le frasche possono essere lasciate in campo per un periodo di 20-30 giorni al fine di far perdere al materiale parte dell'umidità in esse contenuta, periodi più lunghi possono però innescare fenomeni di decomposizione del materiale. I sistemi di recupero sono differenti a seconda del sottoprodotto: la legna è generalmente raccolta a mano; mentre le frasche possono essere raccolte principalmente con due sistemi: con macchine raccoglimentatrici (che producono ballette da 34-40 kg) oppure con triciacaricatrici che convogliano il prodotto trinciato in grandi sacchi, cassoni integrati alla macchina operatrice o rimorchi agricoli [50]. Data la ridotta dimensione delle aziende olivicole, la legna è quasi sempre impiegata come combustibile in azienda; le frasche, invece, a causa della loro difficile gestione sono molto spesso bruciate in campo.

Nonostante abbia perso il primato mondiale a favore della Spagna, la produzione di olio di oliva continua a rivestire un ruolo fondamentale nella filiera agro-alimentare italiana, in modo particolare nelle regioni meridionali. In queste ultime si concentra il 79,5% della superficie e circa il 90% della produzione olivicola nazionale che, nel 2009, è stata stimata dall'Istat pari a oltre 36 milioni di quintali di olive (34 milioni di quintali sono quelle raccolte). Secondo un'indagine Istat [51] sono circa 776 mila le aziende che coltivano olivi, mentre la superficie totale, nel 2010, ammontava ad oltre 1.183.000 ettari.



Figure 3-2: Olivo e relative potature

I sottoprodotti della filiera olivicola-olearia sono costituiti essenzialmente dai residui di potatura e svellimento degli alberi di olivo (Fig.3.2), per quanto concerne la fase agricola, e dalle sanse, vergini o esauste, dal nocciolino di sansa ed acque di vegetazione per la fase della trasformazione.

In media, da una pianta di olivo adulto, vengono asportati da 10 a 30 Kg di ramaglia all'anno a seconda della struttura e dimensione degli alberi. Il periodo in cui i residui si rendono disponibili va da gennaio ad aprile e gli interventi sono praticati con cadenze diverse, da una volta all'anno ad una volta ogni 3-4 anni, a seconda della varietà, dei parametri ambientali e del livello di specializzazione dell'impianto. La quantità di sottoprodotto effettivamente disponibile per usi energetici è condizionata, però, sia da fattori operativi, come modalità e tempi di recupero, sia dalla quantità di sottoprodotto impiegata per usi diversi. Nella quasi totalità dei casi, contestualmente alla potatura, viene effettuata una selezione del materiale, con la separazione dei rami con diametro maggiore di qualche centimetro, che vengono utilizzati come legna da ardere poiché spuntano prezzi di vendita interessanti (150-200 €/t). La restante porzione, costituita per lo più da frasca, viene generalmente accumulata manualmente o meccanicamente, in spazi isolati o ai margini del campo, e bruciata; raramente viene trinciata ed interrata. Sono stati condotti diversi studi al fine di determinare le caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche di tali sottoprodotti, valutarne le quantità e gli attuali utilizzi, determinare le modalità ottimali di raccolta, imballatura, essiccazione e/o pretrattamento [52].

Le principali caratteristiche dei residui di potatura rilevanti per il loro utilizzo energetico sono il potere calorifico inferiore (PCI), l'umidità e la pezzatura. Sia l'umidità che la pezzatura sono influenzate dalle modalità di raccolta e trattamento del residuo, mentre il PCI, per un dato contenuto di umidità, dipende essenzialmente dalle caratteristiche chimico-fisiche, ovvero dal rapporto C/N, contenuto in lignina (PCI di circa 25 MJ/kg) e in cellulosa (PCI di circa 16.7 MJ/kg), e dalla percentuale di frasca. I residui di potatura degli uliveti sono caratterizzati da un PCI medio di circa 4200 kcal/kg SS. La tabella di seguito (Tabella 1) riporta i valori medi dei parametri chimico-fisici caratteristici di questo materiale residuale. Il contenuto di umidità al momento del recupero dipende da numerosi fattori, quali: età della pianta, epoca e modalità di raccolta, tempo di permanenza in campo e relative condizioni ambientali, modalità di stoccaggio del materiale, modalità di recupero del sottoprodotto (imballatura, cippatura, conservazione in cumuli)[53].

Tabella 3.1: Caratteristiche chimico-fisiche dei residui di potatura d'olivo [39].

Caratteristiche	Frasca	Legna
Quantità di residuo tal quale/100kg di olive trasformate in olio (kg)	65	15
Umidità alla raccolta (% su SS)	52	37
Umidità alla raccolta (% su Tal Quale)	34.3	27.7
Quantità di residuo secco/100kg di olive trasformate in olio (kg)	31.2	9.4
Rapporto C/N (% sul secco)	33	128.2
Ceneri (% peso/ peso su SS)	-	1.5-3
Potere Calorifico Inferiore (kcal/kg SS)	-	4200

3.1.3 Il cardo

Il cardo (*Cynara Cardunculus*) è una specie erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Asteraceae o Compositae, originaria delle regioni Mediterranee, nelle quali si è ampiamente diffusa come pianta selvatica e come specie coltivata (Fig.3.3).

La moderna tassonomia suddivide la specie *Cynara* in due sottospecie secondo una caratterizzazione geografica: la sottospecie *favescens* che si estende tra Macronesia, Portogallo e il Mediterraneo nord-occidentale; la sottospecie *cardunculus* presente nelle aree del Mediterraneo centrale e nord-orientale. Nella specie *Cardunculus* sono stati identificati, con l'aiuto di marcatori molecolari, tre diversi taxa:

- *C. Cardunculus* var. *sylvestris* Lam (cardo selvatico)
- *C. Cardunculus* var. *altilis* DC (cardo coltivato)
- *C. Cardunculus* var. *scolymus* L Hegi (carciofo)

In base a studi citogenetici e isoenzimatici è stato dimostrato che il *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* è progenitore sia del carciofo, sia del cardo coltivato.



Figure 3-3: Cardo (*Cynara cardunculus*)

Il cardo è una pianta erbacea perenne in natura, annuale in coltura. La semina avviene in autunno, la plantula germoglia subito e durante l'inverno si presenta come pianta "a rosetta" per la presenza di un fusto molto accorciato (3-4 cm) ed un numero elevato di foglie (oltre 40) picciolate, larghe e con numerose spine. In questo stadio il cardo ha la massima resistenza al freddo. La pianta fiorisce in giugno: i fiori, ermafroditi, tubulosi, caratteristici delle Asteraceae, sono riuniti in una infiorescenza a capolino detta anche calatide; a completa maturità raggiungono anche oltre gli 8 mm e presentano un caratteristico colore violetto-azzurro di varia tonalità.

Il cardo essicca nei mesi di agosto e settembre, mesi in cui avviene la raccolta, che deve essere effettuata prima della fuoriuscita dei semi dai capolini. In autunno dagli organi sotterranei si sviluppa una rosetta di nuove foglie che rimane vitale durante l'inverno e che nell'estate successiva darà origine agli scapi floreali che riprendono il ciclo. La pianta è poco esigente in elementi nutritivi ed estremamente resistente alla siccità grazie all'apparato radicale fittonante che può raggiungere profondità elevate (fino a 2,5 m); le radici infatti si ingrossano progressivamente durante la crescita, mantengono una funzione assorbente durante tutti il periodo delle piogge invernali assumendo la funzione di riserva oltre che di sostegno. Tradizionalmente coltivato come pianta ortiva per la produzione dei germogli laterali eduli (carducci o gobbi), il cardo è caratterizzato da una crescita vigorosa, si pensi che una sola pianta può raggiungere un'altezza di circa 2 metri e coprire un'area del diametro di 1,5 metri; proprio per questo motivo è una pianta interessante come biomassa a scopi energetici. Inoltre essendo una pianta robusta e spinosa è considerata infestante, perché invade facilmente i pascoli erbosi riducendone la fruibilità da parte di bovini, ovini e caprini.

In questi ultimi anni sono stati molteplici gli studi tecnici mirati alla valutazione tecnica ed economica di filiere agroenergetiche basate sulla valorizzazione energetica del cardo. La pianta di *Cynara Cardunculus* si inserisce infatti perfettamente nel concetto di bioraffineria descritto precedentemente: la biomassa di cardo può avere diverse applicazioni industriali tra cui l'utilizzo come combustibile solido, l'estrazione di olio dai semi, la produzione di fibra per l'industria cartaria o come materia prima da cui ricavare composti chimici e farmaceutici [54, 55].

Le enormi potenzialità di *Cynara Cardunculus* a fini energetici hanno suscitato enorme interesse all'interno della CE che ha promosso uno specifico studio *BIOCARD Global process to improve Cynara cardunculus exploitation for energy productions*[56]. Il progetto è stato promosso nell'ambito del 6° Programma quadro dell'Unione Europea e ha visto la partecipazione di Istituti di ricerca quali l'Università di Madrid, di Bologna e di Dublino, il CRA-ING (gruppo Panacea) ed altri. Il progetto si pone diversi obiettivi tra cui quelli dell'aumento della produttività della pianta ai fini energetici (combustione, produzione di biodiesel) oltre che sviluppare modelli logistici per ottimizzare la raccolta, lo stoccaggio ed il pretrattamento del materiale di partenza. Nell'ambito del progetto Biocard, il CRA-ING (*Unità di ricerca per l'ingegneria agraria*) ha sviluppato un prototipo di testata per mietitrebbiatrice per effettuare in un'unica passata la raccolta del seme e la messa in andana della biomassa lignocellulosica che sarà successivamente raccolta e imballata, dato che la raccolta degli acheni di cardo risulta uno degli step più complicati e costosi dell'intero processo produttivo [57]. In tal modo le diverse componenti della pianta potranno andare incontro ai diversi trattamenti. Il progetto si pone inoltre l'obiettivo di effettuare una valutazione tecnica ed economica della filiera sviluppata.

I risultati mostrano l'efficienza di questa biomassa in termini di rendimento; essendo una coltura poliennale, il cardo permette di ammortizzare la spesa per la preparazione del letto di semina in più anni, produce consistenti quantitativi di biomassa lignocellulosica. Inoltre, a differenza delle altre colture oleaginose, può essere coltivato anche in terreni meno fertili e nelle zone dotate di scarse precipitazioni. Ciò potrebbe favorirne un interesse da parte dei coltivatori del Sud Italia in modo da avvicinare sempre più al raggiungimento degli obiettivi del Pacchetto 20-20-20 in Italia limitando le importazioni di oli dall'estero.

L'utilizzo del cardo a scopi energetici è stata confermata, sia come combustibile solido, sia come materiale di partenza per la produzione di biocombustibili. Per combustione diretta delle piante di *Cynara cardunculus* si può ottenere energia su larga scala, per la produzione di elettricità o di calore da sfruttare negli impianti di riscaldamento. Studi effettuati nell'ambito del Progetto Biocard (Tab. 3.2) mettono in evidenza le caratteristiche chimico-fisiche del cardo e ne sottolineano l'attitudine ad essere utilizzato come combustibile, il relativo contenuto in ceneri basso fondenti impone però il vincolo di non superare in combustione i 750° C o di utilizzarlo in miscela con biomasse arboree.

Table 3-2: Caratteristiche chimico-fisiche del cardo

Biomassa Lignocellulosica per la combustione	
Produzione annua biomassa (t/ha)	12-13
Umidità alla Raccolta (%)	10-15
Massa Volumica (kg/m ³)	150-250
Potere Calorifico (Mj/kg s.s)	15-16
Ceneri (%)	5-10
Potassio (%)	2-2,5
Cloro (%)	0,3-1,7

L'olio estratto dal seme può anch'esso essere destinato alla produzione di biocarburanti, e contemporaneamente il pannello di spremitura di scarto può essere indirizzato all'industria mangimistica o per la produzione di biogas [58]. Lo studio della composizione chimica degli acidi grassi ha permesso di mettere in evidenza l'attitudine di questo prodotto ad essere impiegato come biodiesel [59]. I primi risultati del progetto Biocard riguardo alla produzione di biodiesel hanno mostrato risultati incoraggianti (Tab. 3.3) in quanto il biodiesel prodotto da semi di cardo ha qualità molto simili ai parametri dello standard EN 14214, lo standard europeo che definisce le specifiche e i metodi per testare il FAME (Fatty acid methyl ester) ovvero il Biodiesel prodotto con l'uso del metanolo.

Table 3-3: Caratteristiche dell'olio di cardo in rapporto con lo standard EN 14214

Biodiesel Transesterificato con:			
Proprietà	Etanolo	Metanolo	EN-14214
Densità a 15°C (g/cm ³)	0,8794	0,889	0,86-0,9
Viscosità a 40°C (mm ² /s)	4,479	5,101	3,5-5
Temperatura di Infiammabilità (°C)	184	182	>101
Temperatura di Intorbidamento (°C)	-5	-4	-
Tempo di Intasamento a freddo dei Filtri (°C)	-10	-10	<-10
Numero di Cetano	66	59	>51
Carbonio residuo (% m/m)	0,28	0,36	<0,3
Indice di iodio	109	117	<120-140
Fosforo (mg/kg)	<5	<5	<10
Zolfo (% m/m)	<0,02	<0,02	<0,02

Un'ulteriore utilizzo della componente lignocellulosica, costituito dalla parte aerea della pianta, in combustibile liquido, consiste nella sua trasformazione biochimica.

La biomassa legnosa di *Cynara* ha una composizione simile a quella delle altre biomasse erbacee: come le altre colture energetiche ha poca lignina un buon contenuto di contenuto di cellulosa (circa 33%) e di emicellulosa (circa il 20%), che ne sottolineano l'alto valore come biomassa di partenza per una successiva conversione biochimica [60, 61]. La componente lignocellulosica in alcune specie di cardo, che può arrivare ad ergersi fino a 2 metri da terra, può rappresentare una fonte consistente di materia prima da processare nelle sugar platforms per l'ottenimento di bioetanolo e biochemicals.

OVERVIEW DEL LAVORO

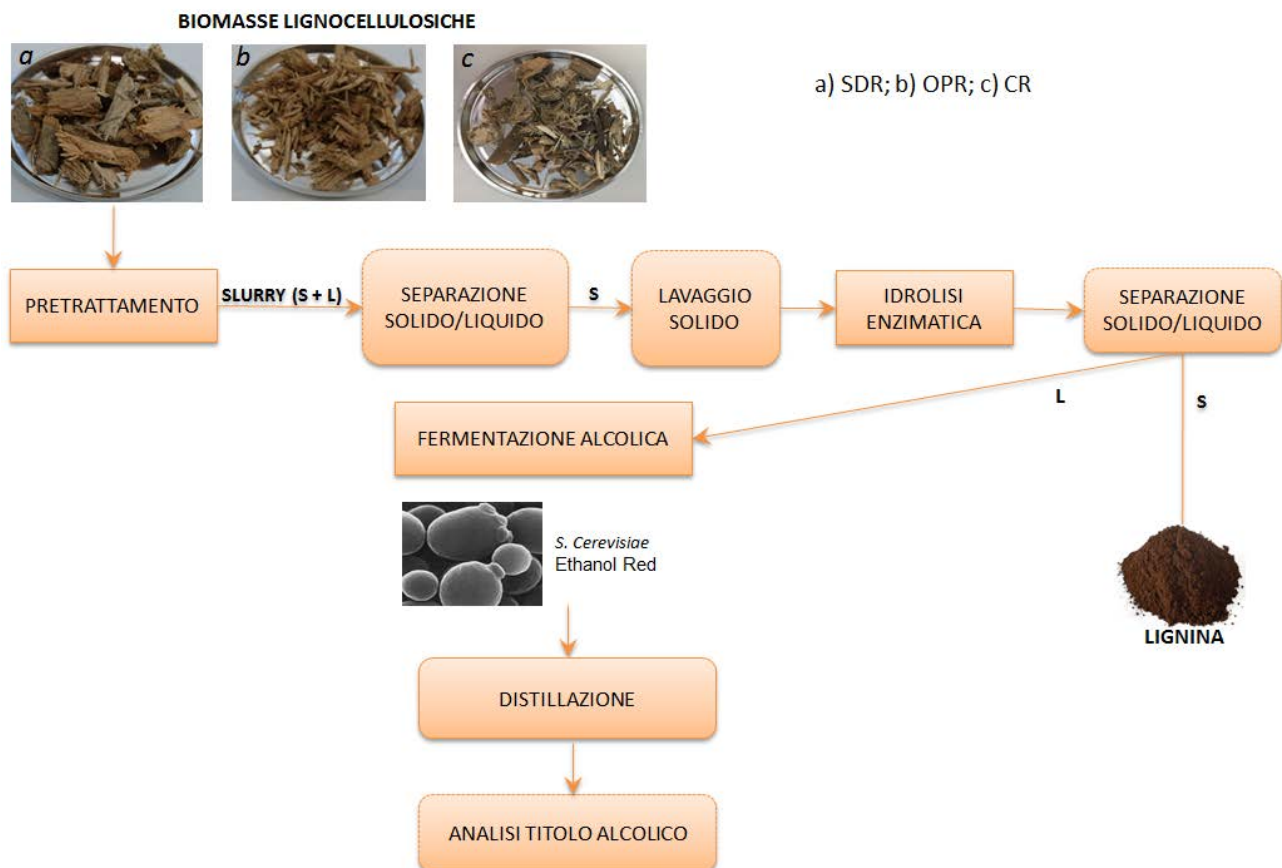
SPERIMENTAZIONE BIOCARBURANTI

Lo scopo del lavoro di tesi è la valorizzazione di biomasse lignocellulosiche residuali, pertanto largamente disponibili e sostenibili, per la produzione di etanolo e lipidi per un loro eventuale utilizzo come biocarburanti di seconda generazione.

Il lavoro ha previsto l'analisi delle tre biomasse di partenza (biomasse spiaggiate, potature di olivo e cardo) valutando la loro composizione chimica. Il materiale di partenza ha subito un pretrattamento di steam explosion a due diversi valori di severità (LogR_0) seguito da idrolisi enzimatica al fine ottenere carboidrati direttamente fermentabili da microrganismi nella fase finale.

In una prima fase operativa le biomasse lignocellulosiche idrolizzate sono state utilizzate per la produzione di bioetanolo di seconda generazione mediante l'utilizzo del lievito *S. cerevisiae* in un processo SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation).

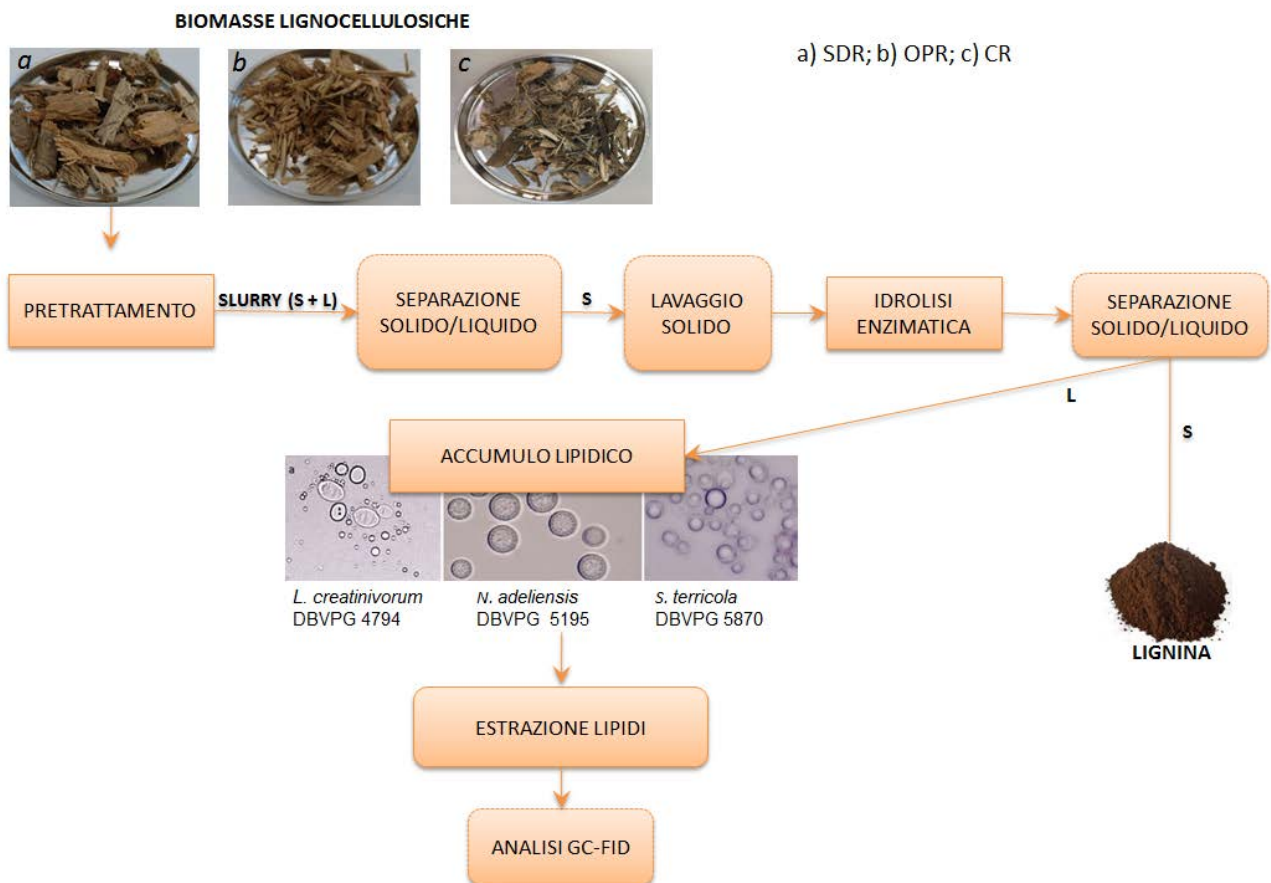
Produzione Etanolo



La seconda fase della sperimentazione è stata volta all'utilizzo delle stesse biomasse pretrattate ed idrolizzate per prove di accumulo lipidico per mezzo di lieviti oleaginosi. Sono stati testati i ceppi *Leucosporidium creatinivorum* DBVPG 4794, *Naganisha adeliensis* DBVPG 5195 and *Solicoccozyma terricola* DBVPG 5870, conservati presso la Industrial Yeast Collection DBVPG, www.dbvpg.unipg.it.

In un primo momento sono state effettuate prove di accumulo in beuta utilizzando i tre diversi ceppi a diverse condizioni di temperatura (20-25°C). La valutazione delle resi in termini di lipidi prodotti e loro composizione percentuale ha portato alla selezione di un lievito (*Leucosporidium creatinivorum*) che è stato utilizzato per prove di fermentazione su bioreattore per valutare lo scaling up del processo. Il profilo lipidico degli oli prodotti è stato valutato in quanto elemento essenziale per stabilire i potenziali utilizzi del prodotto finale. La composizione in acidi grassi ha infatti un significativo impatto sulle performance del biodiesel o sugli altri eventuali oleochemicals d'interesse.

Produzione Lipidi



Capitolo 4 : MATERIALI E METODI SPERIMENTALI

In questa sezione verranno descritti materiali e reagenti utilizzati nella sperimentazione relativa alla produzione di biocarburanti a partire da biomasse lignocellulosiche prese in esame nonché la strumentazione ed i metodi analitici utilizzati.

4.1 MATERIALI

4.1.1 Reagenti

I reagenti utilizzati nel corso della sperimentazione sono:

- Solventi organici (Etanolo/Metanolo/Cloroformio/Esano con purezza $\geq 99\%$)
- Acido acetico, acido succinico e acido L-lattico (purezza $\geq 99\%$)
- Acido solforico al 72%
- Furfurale, HMF, Acido Levulinico e Acido Formico (purezza $\geq 99\%$)
- Glicerolo e xilitolo (purezza $\geq 99\%$)
- D-cellobiosio, D-glucosio, D-xilosio, D-galattosio, D-mannosio, L-arabinosio (purezza $\geq 99\%$)
- Standard FAME Mix C8-C24 Supelco
- Estratto di lievito
- Enzima il Cellic™ Ctec2 fornito da Novozymes (Danimarca)

Come solvente è stata utilizzata acqua deionizzata. Tutti i reagenti, dove non specificato diversamente, sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich.

4.1.2 Biomasse di partenza

Le biomasse sperimentate in questo lavoro di tesi sono biomasse lignocellulosiche residuali:

- a) Biomasse spiaggiate (BS - Figura 4.1a) provenienti dl litorale abruzzese (Giulianova) raccolte nel mese di dicembre dopo una mareggiata;
- b) Potature di olivo (OL - Figura 4.1b) provenienti dalla provincia di Perugia;
- c) Cardo selvatico (CA - Figura 4.1c), proveniente da un campo sperimentale del CRB “Centro Ricerca Biomasse” sito a Casalina (Perugia) e raccolte dopo la fase di fioritura nel mese di Settembre.



Figure 4-1: Biomasse di partenza chiappate. Da sinistra biomasse spiaggiate (a), potature d’olivo (b) e cardo (c)

Le biomasse sono state seccate a 40°C, quartate e ridotte in scaglie con dimensioni variabili da alcuni millimetri ad un paio di centimetri attraverso cippatura.

4.1.3 Lieviti

Per quanto riguarda la fermentazione alcolica, il lievito utilizzato è un ceppo di *S. Cerevisiae*, dal nome commerciale "Ethanol Red" prodotto dall'azienda Fermentis, commercializzato specificatamente per la produzione di bioetanolo poiché in grado di raggiungere alte rese.

Per la produzione di lipidi, trattandosi di una fase ancora sperimentale e non già commercializzata, sono stati testati 3 ceppi di lievito conservati presso la Industrial Yeasts Collection DBVPG del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia.

I lieviti oggetto di studio sono stati:

1. *Leucosporidium creatinivorum* (DBVPG 4794) isolato da sedimenti super glaciali del ghiacciaio Forni, (Ortles Cevedale group, Alpi italiane, Sondrio, Italia);
2. *Naganishia adeliensis* (DBVPG 5195) sedimenti super glaciali del ghiacciaio del Calderone, (Gran Sasso, Abruzzo, Italia);
3. *Solicoccozyma terricola* (DBVPG 5870) sedimenti superglaciali del ghiacciaio del Miage (Molte Bianco, Alpi italiane).

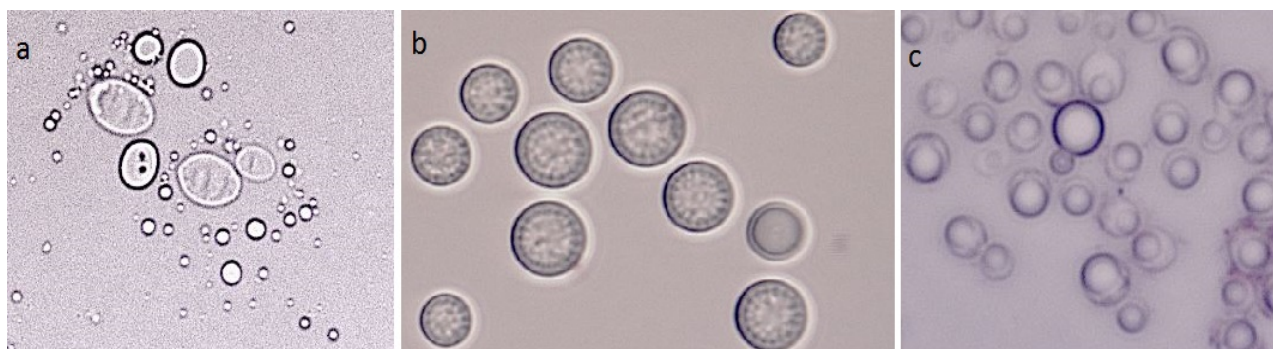


Figure 4-2: fotografie al microscopio dei tre ceppi fungini a) *Leucosporidium creatinivorum* (DBVPG 4794) b) *Naganishia adeliensis* (DBVPG 5195) c) *Solicoccozyma terricola* (DBVPG 5870)

I 3 ceppi appartengono al phylum dei basidiomiceti (presentano un micelio settato, riproduzione asessuata e sessuata con produzione di basidiospore tutti i ceppi sono psicotolleranti (sono in grado di crescere a 0 °C ma hanno una temperatura ottimale di crescita tra i 20 e i 30 °C), con un optimum di crescita a 20 °C.

La scelta di *L. creatinivorum* (DBVPG 4794), *N. adeliensis* (DBVPG 5195) e *S. terricola* (DBVPG 5870) è stata fatta sulla base dei risultati ottenuti da un precedente screening di circa 700 ceppi condotto da Filippucci et al [62]. Questo studio ha evidenziato che i tre ceppi sopramenzionati presentano la migliore capacità di produzione e accumulo di lipidi all'interno di vescicole citoplasmatiche.

4.2 APPARATO PROTOTIPALE

L'apparato prototipale utilizzato per la produzione di bioetanolo da biomasse lignocellulosiche è situato presso i laboratori del CRB dell'Università degli Studi di Perugia; è stato realizzato in collaborazione con la società Chemtex Italia S.r.l., detentrica esclusiva della tecnologia "Proesa" e dei brevetti ad essa correlati per la produzione di bioetanolo da filiera lignocellulosica con pretrattamento della matrice attraverso azione meccanica combinata con vapore (steam explosion).

4.2.1 Reattore di Steam Explosion

La biomassa viene pretrattata nel reattore di Steam Explosion (Fig. 4.3 sx), al fine di disorganizzare la struttura della parete cellulare e separare la cellulosa e l'emicellulosa dalla lignina.

L'unità di Steam-Explosion è essenzialmente costituita da un reattore da 11 L di volume, un ciclone di espansione da 650 L, una vasca di carico per immissione della biomassa, ed un quadro di controllo/comando dotato di apposito pannello touch-screen. La temperatura viene controllata tramite una valvola automatica comandata da un controllore collegato ad un trasmettitore installato nel reattore. Le condizioni di pressione e temperatura operative nel reattore sono indicate e registrate nel pannello di controllo. La dipendenza della pressione del vapore saturo dalla temperatura è data dalla relazione di Clausius-Clapeyron.

Il vapore utilizzato per il pretrattamento e la successiva fase di Steam-Explosion è generato in un produttore di vapore di tipo Kettle (Fig. 4.3 dx) avente una potenza pari a 50 kW. La regolazione ed il funzionamento sono garantiti da un trasmettitore di pressione, un trasmettitore di temperatura, due pressostati, due livellostati, una valvola di scarico di fondo automatica, una valvola di sicurezza, un manometro ed un trasmettitore di livello che interviene sulla pompa di alimento dell'acqua demineralizzata.



Figure 4-3: Reattore si Steam explosion (sx) e generatore di vapore esterno (dx)

4.2.2 Reattori di idrolisi e fermentazione

La componente solida dell'esplosivo viene lavata per allontanare eventuali inibitori ed è sottoposta alle successive fasi di idrolisi e fermentazione.

L'unità operativa di idrolisi e fermentazione prevede due Bioreattori Biostat A+ della Sartorius della capacità di 5 litri. Il vessel di lavoro (Fig. 4.4) prevede un recipiente in vetro borosilicato pirex a singola parete con fondo concavo arrotondato, un piatto di testa in AISI 316L come del resto tutte le parti in contatto con il processo, un supporto per il recipiente di coltura in AISI 304, dei filtri 0.2 μ per la linea gas e per la linea d'uscita dell'aria esausta, un tubo di raccolta aggiustabile in altezza, delle porte d'inoculo per il prelievo eventuale o per la somministrazione; una porta d'aggiunta 4-vie, dei condensatori esausti, un

senso di temperatura, un elettrodo per il pH, un elettrodo per pO_2 , una sonda per la schiuma, , un tubo di aerazione con sparger ad anello, un dito freddo con connettore rapido, un albero di agitazione con tenuta meccanica singola, due turbine Rushton, un campionatore manuale pescante.

Nella sezione di idrolisi enzimatica e fermentazione, si è provveduto a connettere i reattori alle utilities richieste per garantirne un corretto funzionamento. Il pH è stato mantenuto stabile mediante aggiunta automatica di acido (H_2SO_4 2M) o base (KOH 2M) , la temperatura è regolata mediante una termocamicia elettro-riscaldata che provvede a riscaldare il cilindro di reazione dell'esterno verso l'interno, e da un tubo collegato all'acqua di rete (mediante intorno ai 11-12°C), che provvede al raffreddamento del mezzo di reazione qualora la temperatura superi il valore soglia impostato. La pressione parziale di O_2 è stata gestita tramite un flussimetro posto sul sistema Sartorius. Il gas necessario alla reazione è flussato nel mezzo tramite sparger ad anello posizionato immediatamente sotto la girante. Tutto il sistema Sartorius, è gestito tramite software (pc-panel μ DCU).

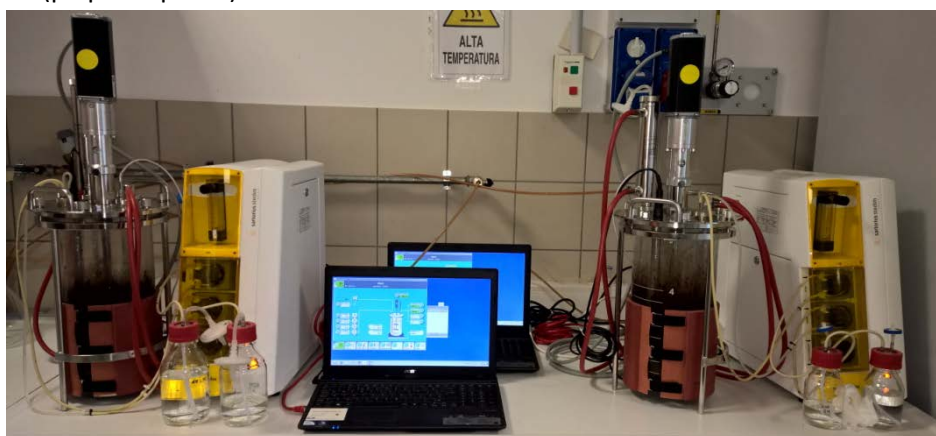


Figure 4-4: Bioreattori Sartorius Biostat A

4.3 STRUMENTAZIONE DI ANALISI CHIMICA

4.3.1 TGA e CHN (*Analisi immediata ed analisi elementare*)

Per le analisi immediate che hanno consentito di determinare il contenuto di Umidità (U), Sostanza Secca (SS), Sostanze Volatili (SV) e Ceneri (Ash) è stato impiegato l'analizzatore Termogravimetrico TGA-701 LECO (Fig.4.5b). La precisione è $\pm 0.02\%$ RSD (Relative Standard Deviation) per 1 gr. di campione inerte. La normativa è: UNI EN 14774-2:2010; UNI EN 15148:2010; UNI EN 14775:2010. Le misure sono state effettuate, in base a quanto prescritto dalle normative sopra richiamate, nel seguente modo:

- *impostazione della misura*: mediante il software di gestione dello strumento sono stati impostati il metodo di analisi, il nome del campione ed il numero di crogioli impiegati per il caricamento dello strumento;
- *preparazione del campione*: il campione di biomassa è stato immesso in appositi crogioli ceramici, preventivamente posizionati sul carosello dello strumento;
- *determinazione del contenuto di umidità*: lo strumento in automatico ha effettuato il riscaldamento del campione fino a 105 °C in atmosfera di azoto e la contemporanea pesatura fino a quando la perdita di massa non è risultata trascurabile.
- *determinazione del contenuto di sostanze volatili*: lo strumento, a partire da 105 °C, ha incrementato la temperatura secondo un andamento a rampa prestabilito (heating rate: 40

°C/min) fino al valore massimo di 950 °C, mantenendo la temperatura massima per 7 minuti;

- *determinazione del contenuto di ceneri*: lo strumento, a partire da 950 °C, ha raffreddato il campione con una rampa prestabilita (heating rate – 50 °C/min) fino alla temperatura di 400 °C; ha poi eseguito il riscaldamento del campione fino a 550°C in atmosfera di aria, fino a quando la perdita di massa non è risultata trascurabile;
- *elaborazione dei risultati*: lo strumento fornisce il valore del contenuto di Umidità, Sostanze Volatili e Ceneri e calcola per differenza il valore del Carbonio Fisso. I risultati sono su tal quale (tq) e su base secca (SS).

Per quanto concerne l'analisi elementare, ovvero la determinazione del contenuto di Carbonio, Idrogeno ed Azoto, è stato impiegato l'Analizzatore Elementare Truspec CHN LECO (Fig.4.5b). Le misure sono state effettuate, in base a quanto prescritto dalla normativa di riferimento, ovvero la ASTM D 5373 e UNI EN 15104:

- *preparazione del campione*: il campione di biomassa è stato posto in una apposita sfoglietta di stagno, preventivamente posizionata sul piatto della bilancia di precisione (risoluzione 10^{-5} g); è stato pesato il campione; infine la sfoglietta è stata chiusa e posizionata nell'autocampionatore dello strumento;
- *impostazione della misura*: mediante il software di gestione dello strumento sono stati impostati il metodo di analisi, il nome del campione ed il suo peso e si è poi lanciata l'analisi;
- *risultato dell'analisi*: al termine della misura lo strumento ha fornito il valore del contenuto di Carbonio, Idrogeno e Azoto sul tal quale;
- *ripetizione delle misure*: sono state eseguite tre ripetizioni;
- *elaborazione dei risultati*: lo strumento fornisce in automatico il valore del contenuto di Carbonio, Idrogeno e Azoto su base secca.

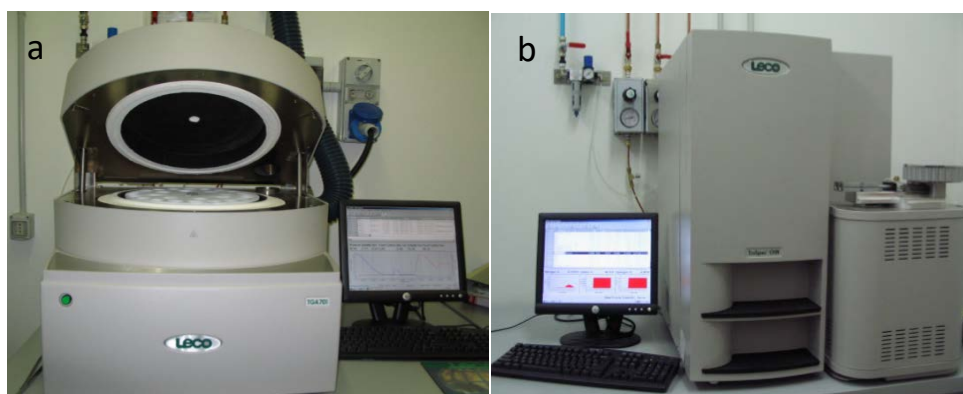


Figure 4-5: Analizzatori TGA (a) e CHN (b)

4.3.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Per caratterizzare i campioni di biomasse nelle varie fasi del processo è stato impiegato l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) della Thermo Scientific modello *Ultimate 3000* (Figura 4.6) con autocampionatore e rilevatore ad indice di rifrazione.

L'HPLC è una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente

sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

La separazione dei componenti avviene mediante interazioni che si creano fra i costituenti della miscela e le due fasi. Le interazioni possono essere di tipo elettrostatico, dipolo-dipolo, forze di Van Der Waals oppure tramite un meccanismo di scambio ionico.



Figure 4-6: HPLC Ultimate Thermo con autocampionatore

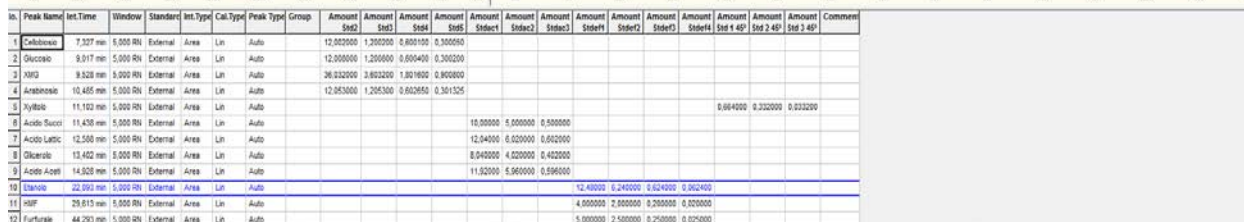
Nell'HPLC la forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna è rappresentata dalla pressione (50-150 atm) applicata da una pompa in testa alla colonna, che costringe la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria. Il rivelatore utilizzato è ad indice di rifrazione; misura la differenza nell'indice di rifrazione tra la cella del campione e una cella di riferimento che generalmente contiene soltanto l'eluente. Quando l'eluente contenente l'analita entra nella cella del campione, il raggio viene deflesso e inviato al fotodiodo producendo il segnale in uscita differente rispetto a quello prodotto dal solo eluente. Questo tipo di rivelatore è di tipo universale, cioè risponde a tutti i composti e si utilizza per analiti che non assorbono in UV. Il rivelatore è collegato a un computer che tramite un software permette la registrazione del cromatogramma. Il software utilizzato identifica e quantifica i composti corrispondenti ai picchi del cromatogramma facendo riferimento a curve di calibrazione standard, nel nostro caso preparate a partire da varie diluizioni di soluzioni contenenti zuccheri esosi e pentosi.

➤ Condizioni di lavoro dell'analisi HPLC

<i>Colonna utilizzata</i>	BIORAD AMINEX HPX-87H
<i>Fase mobile</i>	Soluzione di acido solforico 0.005 M in acqua HPLC
<i>Flusso [mL/min]</i>	0.6
<i>Temperatura colonna [°C]</i>	50
<i>Temperatura rivelatore [°C]</i>	50
<i>Volume iniettato [μL]</i>	20
<i>Tempo di analisi [min]</i>	50

Nota: La colonna 87H non riesce a separare tre picchi (xilosio, mannosio, galattosio) in quanto i tempi di eluizione sono molto vicini tra loro. Si osserverà un unico picco che sarà indicato come XMG.

Come standard sono state utilizzate soluzioni a diverse concentrazioni di carboidrati (glucosio, mannosio, galattosio, xilosio, arabinosio e cellobiosio) di prodotti di degradazione e secondari (Xylitolo, Acido Succinico, Acido L-Lattico, Glicerolo, Acido Acetico, HMF, Furfurale, Acido Levulinico e Acido Formico) ed etanolo. Si è deciso di eseguire una calibrazione a quattro/cinque punti, i valori di riferimento per gli standard sono dettati dal protocollo di lavoro NREL. In figura 4.7 è riportata, a titolo di esempio, la curva di calibrazione ottenuta per l'etanolo: a sinistra nell'immagine si osserva il cromatogramma relativo ad un campione, il segnale è registrato in μRIU in funzione della concentrazione espressa in mg/mL . A destra si osserva la retta di calibrazione. Il software calcola e genera la curva di calibrazione interpolando la posizione dei punti noti; in tal modo sarà in grado di fornire la concentrazioni in mg/mL di campioni incogniti.



Anche in questo caso, le analisi dei campioni sono state precedute dall'analisi di uno standard contenente un mix di esteri metilici, (FAME Mix C8-C24 - Supelco), in modo da individuare i tempi di ritenzione dei picchi relativi a ciascuno di essi.



Figure 4-8: GC Varian 3300

In figura 4.9 è riportato il cromatogramma relativo allo standard con la separazione dei 14 diversi esteri, presenti nel FAME Mix, in ordine di eluizione:

caprilico (C8:0), caprico (C 10:0), laurico (C 12:0), miristico (C 14:0), palmitico (C 16:0), palmitoleico (C 16:1), stearico (C 18:0), oleico (C 18:1), linoleico (C 18:2), arachidico (C 20:0), linolenico (C 18:3), beenato (C 22:0), eurico (C 22:1), lignocericico (C 24:0).

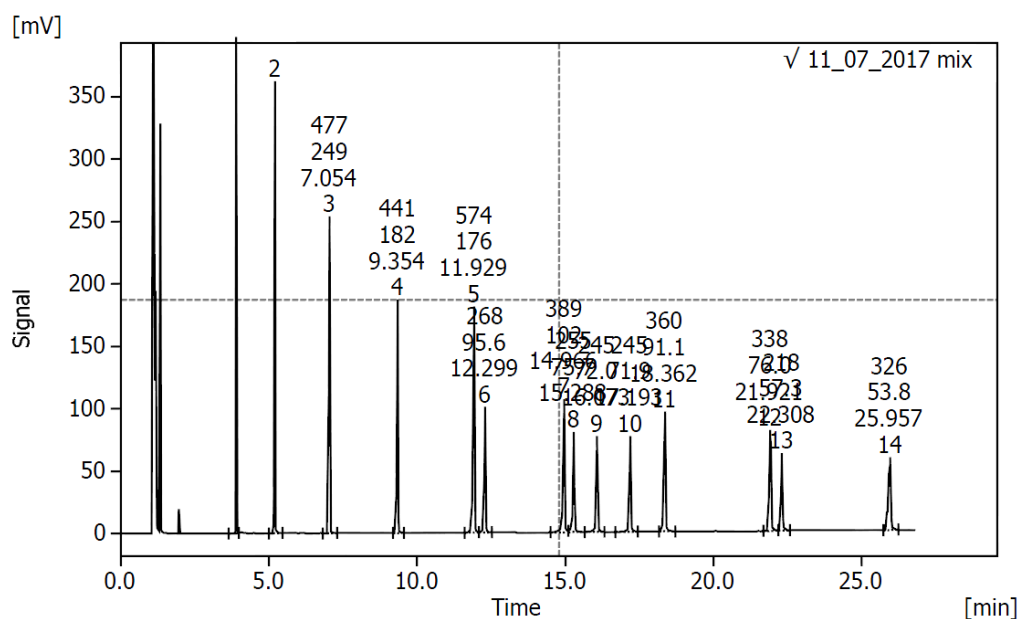


Figure 4-9: Cromatogramma di eluizione degli esteri metilici presenti nel mix standard

Le componenti sono state separate su colonna capillare, TraceGOLD™ TG-WaxMS GC Columns, (ThermoFisher) lunga 30m con diametro interno di 0.25 mm e con spessore del film pari a 0.25µm.

Le condizioni di analisi sono state le seguenti:

Temperatura iniettore: 250°C

Temperature detector: 260°C

Rampa colonna: da 60°C a 140°C (4°C/min) - da 160°C a 140°C (6°C/min) - da 160°C a 190°C (8°C/min) - da 190°C a 240°C (4°C/min)

Gas carrier: elio

4.4 METODI ANALITICI

I paragrafi successivi descrivono le procedure analitiche condotte su diversi campioni di biomassa lignocellulosica al fine di valutare le potenzialità in termini di rilascio di zuccheri monomerici durante l'idrolisi enzimatica e la resa finale in etanolo o acidi grassi alle diverse condizioni di lavoro.

4.4.1 Caratterizzazione Biomassa Tal Quale

Come prima cosa è stata caratterizzata la biomassa tal quale per valutarne la composizione molecolare. I campioni sono stati sottoposti ad essiccazione in camera climatica (40 °C per 24-48 ore) ed in seguito a macinazione mediante un mulino centrifugo al fine di rendere la biomassa più omogenea ed accessibile ai solventi, in quanto si ottengono granuli della stessa dimensione ($\approx 250\mu\text{m}$). Sono stati rimossi gli estrattivi presenti all'interno del campione di cardo, seguendo la procedura NREL 42619 [63, 64], tramite l'utilizzo del Soxhlet (Fig. 4.10sx) fornito dalla ditta Steroglass. In seguito il solvente utilizzato per l'estrazione viene fatto evaporare tramite Rotavapor (Buchi) mostrato in figura 4.10dx. Questa fase è necessaria per valutare la quantità di molecole non strutturali presenti all'interno della biomassa; inoltre gli estrattivi sono specie chimiche che potrebbero destabilizzare le varie fasi, danneggiare la colonna HPLC e quindi influenzare la riuscita dell'analisi. Come da protocollo, l'estrazione con Soxhlet è stata ripetuta due volte per il campione tal quale, una volta inserendo nel pallone di estrazione acqua e un'altra volta etanolo puro, in modo da separare specie aventi diversa polarità. Tramite evaporazione con Rotavapor del solvente è possibile valutare la quantità di estrattivi per il campione di cardo tal quale, usando la seguente formula (1):

$$\%_{\text{estrattivi}} = \frac{(\text{Peso}_{\text{pallone più estrattivi}} - \text{Peso}_{\text{pallone}})}{\text{Peso campione t. q. (ss)}} \cdot 100 \quad (1)$$



Figure 4-10: Apparato Soxhlet (sx) e Rotavapor (dx)

Il campione senza estrattivi, essiccato, è andato infine incontro ad idrolisi acida, secondo procedura NREL 42618 [63] al fine di valutarne la composizione. L'idrolisi di entrambi i campioni senza estrattivi è stata effettuata in triplo. L'idrolisi acida prevede l'utilizzo di acido solforico H_2SO_4 al 72% (3ml) su campioni del peso di 300 ± 10 mg di biomassa secca. La procedura di idrolisi acida prevede le seguenti fasi:

- vengono pesati 300 ± 10 mg di ogni campione, ognuno dei quali deve avere un'umidità relativa inferiore al 10%, (ciò viene garantito dalla loro conservazione in essiccatore a gel di silice nel

periodo che va dalla macinazione al loro impiego nell'idrolisi acida); il campione viene poi inserito in vials di vetro e si aggiunge l'acido solforico al 72%;

- I contenitori vengono posizionati all'interno di un bagno termostato, la cui temperatura è mantenuta costante e pari a 32°C sotto agitazione costante;
- Trascorsi i 60 minuti prefissati, si toglie il recipiente dal bagno d'acqua e si diluiscono le soluzioni con acqua deionizzata fino a raggiungere una concentrazione finale di acido pari al 4%, aggiungendo 84.00 ± 0.04 g di acqua deionizzata per campione;
- Il campione viene autoclavato a 121 °C per altri 60 min, in modo da continuare l'idrolisi acida a temperature maggiori.

I campioni autoclavati vengono filtrati utilizzando una pompa da vuoto e dei crogioli filtranti per separare la parte solida da quella liquida. La parte solida contenente la lignina, che è insolubile in ambiente acido, rimane all'interno dei crogioli. I crogioli subiscono trattamento in muffola a 105°C per 4 ore e poi pesati. Di seguito sono riportate le formule 2 e 3 attraverso le quali è stato possibile calcolare la percentuale di lignina, presente nei campioni di partenza:

$$\%_{lignina} = \frac{(Peso_{crogiolo+AIL} - Peso_{crogiolo})}{massa\ secca\ con\ estrattivi} \cdot 1000 \quad (2)$$

$$massa\ secca\ con\ estrattivi = \frac{massa\ secca\ senza\ estrattivi}{(1 - \%_{estrattivi}/100)} \quad (3)$$

con AIL = lignina insolubile in acido

Per la determinazione delle ceneri è stata seguita la procedura NREL 42622 [65]: i crogioli contenenti la componente insolubile subiscono un trattamento in muffola a 575°C per almeno un'ora; vengono poi riportati ad una temperatura di 105°C, messi in essiccatore e pesati al fine di valutare il peso degli stessi più le eventuali ceneri presenti.

Il liquido di idrolisi sarà investigato mediante HPLC al fine di quantificare le componenti della biomassa tal quale.

4.4.2 Steam Explosion e Caratterizzazione Esplosiva

Sono state applicate varie condizioni di pretrattamento per diverse temperature e tempi di reazione. La severità del trattamento è quantificata mediante un parametro semiempirico R_0 , che mette in relazione il tempo (t) e le temperature (T) del trattamento secondo l'equazione 4:

$$R_0 = t \cdot e^{[(T-100)/14.75]} \quad (4)$$

Nella fase sperimentale si utilizzerà come parametro il logaritmo di questo valore ($\log R_0$), in modo tale da linearizzare l'equazione di lavoro.

A partire dai tre diversi campioni di biomassa cippata, sono state condotte 2 esplosioni a 2 diversi valori di R_0 , le condizioni sono riassunte in tabella 4.1:

Table 4-1: Condizioni di steam explosion

Campione	Peso (g)	LogR ₀	Umidità %	Temperatura (°C)	Tempo (min)
BS11	1000	4.05	13.30	190	25
BS12	1000	4.64	13.30	210	25
OL03	1000	4.24	11.71	190	40
OL12	1000	4.64	11.71	210	25
CA01	1000	3,90	12,69	200	8
CA02	1000	4,28	12,69	210	11

Le componenti solide derivanti dalle esplosioni sono state lavate a 50°C per 30 minuti poi pressate e quantificate in peso mentre il liquido di pretrattamento è stato filtrato sottovuoto con carta da filtro 73 gr/m², il suo volume è stato quantificato ed il peso del residuo di filtrazione sommato alla componente solida recuperata.

I residui solidi derivanti dall'esplosione (che chiameremo esplosi) ottenuti a due diversi valori di LogR₀ sono dunque stati caratterizzati così da avere informazioni sulla composizione in cellulosa emicellulosa e lignina dopo il trattamento.

Per caratterizzare la composizione dell'esplosivo e del filtrato è stata seguita anche in questo caso la metodica NREL [63] applicata alla caratterizzazione della biomassa. L'idrolisi acida dei campioni avviene dopo essiccazione e macinazione tramite mulino della biomassa esplosa.

L'idrolisi di ogni campione è stata effettuata in triplo; ogni serie di idrolisi è stata accompagnata da valutazione delle perdite mediante l'inserimento di un campione di riferimento (SRS, Standard Recovery Solution) a concentrazione nota che permette di valutare le perdite dovute alla fase di idrolisi e la successiva correzione dei dati ottenuti.

Per i campioni che hanno subito il pretrattamento di Steam Explosion non è necessaria l'estrazione con soxhlet in quanto il vapore stesso ha effettuato questa operazione.

La composizione dei liquidi è stata invece valutata secondo metodica NREL 42623 [66] che prevede anche in questo caso idrolisi acida utilizzando acido solforico H₂SO₄ al 72% e valutando tramite HPLC le componenti risultanti dal processo. L'idrolisi acida dei liquidi prevede l'aggiunta di 349 µl a 10 ml di soluzione e successiva autoclave per 60 minuti a 121°C.

Anche in questo caso ogni serie di idrolisi acida è stata eseguita con uno standard di riferimento (SRS) in modo da poter valutare le perdite dovute al processo.

4.4.3 Idrolisi enzimatica

Il solido esplosivo è stato sottoposto all'azione enzimatica a pH 5 ad una temperatura di 50°C e 300 rpm all'interno dei reattori Sartorius. Il cocktail enzimatico utilizzato per la fase di idrolisi è il Cellic™ Ctec2 della ditta Novozymes (Danimarca). Nella tabella 4.2 sono riportate le condizioni di idrolisi.

Il valore di riempimento, pari al 15%, è stato scelto in modo tale da poter processare una quantità relativamente alta di materiale, andando a condizioni più simili possibile a quelle di un impianto industriale. Non ci si è spinti oltre in quanto all'interno del bioreattore potrebbero esserci problemi di mescolamento che andrebbero a rallentare il processo di idrolisi. Il rapporto grammi di enzima/grammi di cellulosa pari al 15% è invece inferiore a quello indicato nella scheda tecnica di Ctec2 ma è stato dimostrato, in seguito a prove effettuate all'interno del laboratorio, essere sufficiente a garantire la scissione di quasi tutta la cellulosa accessibile.

Table 4-2: Condizioni sperimentali di idrolisi. (La durata delle prove è variata a seconda del tipo di processo: 4 ore per le SSF e 96 per l'accumulo lipidico)

Campione	Riempimento Reattore (g)	Materiale secco caricato (%)	Enzima (%)	Durata prova (h)
BS11	1500	15	15	4/96
BS12	1500	15	15	4/96
OL03	1500	15	15	4/96
OL12	1500	15	15	4/96
CA01	1500	15	15	4/96
CA02	1500	15	15	4/96

Per quanto riguarda i tempi di trattamento, nel caso della fermentazione alcolica l'idrolisi è portata avanti per 4 ore mentre per le prove di accumulo per 96 ore. Ciò in quanto la fermentazione è stata svolta in modalità SSF (idrolisi e fermentazione simultanee).

Sono stati effettuati prelievi giornalieri dell'idrolizzato ed analisi HPLC, al fine di monitorare il processo valutando il rilascio di glucosio e degli zuccheri xilosio, mannosio e galattosio.

4.4.4 Fermentazione alcolica

E' stata inoculata una quantità di *Saccharomyces* in funzione del riempimento del reattore insieme ad una quantità proporzionale di urea come fonte di azoto per il metabolismo del lievito. Le formule utilizzate, fornite dalla ditta, sono le seguenti (5 e 6):

$$g \text{ Lievito} = 0.7 * \frac{\text{riempimento reattore}(g)}{1000} \quad (5)$$

$$g \text{ Urea} = 10 * \frac{\text{riempimento reattore}(g)}{1.3} / 1000 \quad (6)$$

Per un riempimento di 3100 g del reattore sono stati inoculati 2.17 grammi di lievito reidratato in 21.70 g di acqua deionizzata e 23.8 g di urea.

La scheda tecnica del *Ethanol Red* indica come temperature ottimali per il processo di fermentazione valori compresi tra 32°C e 38°C. La fermentazione è stata effettuata a 32°C nel processo di produzione di etanolo tramite SHF, mentre nella SSF si è innalzata la temperatura a 37° C, in entrambi per 48 ore. Il pH è mantenuto a valori di 5,0±0,1 mediante aggiunta di acido/base. Anche durante la fermentazione sono stati effettuati prelievi a 24, 48h, 72 e 96 h che sono stati poi analizzati per il loro contenuto mediante HPLC. In tal modo si è potuto monitorare l'andamento delle reazioni, in particolare la quantità di glucosio consumato e quella di etanolo prodotto.

4.4.5 Produzione biolipidi

➤ Preparazione terreno colturale da biomassa

Le prove per la valutazione dell'accumulo dei lipidi da parte dei tre ceppi sono state condotte su un terreno costituito dall'idrolizzato di BS, OL e CA regolato ad un pH 5.5.

Nel terreno è stato creato un rapporto sbilanciato tra la fonte di carbonio (C) e la fonte di azoto (N) (C/N circa 40), mediante l'aggiunta di N sotto forma di estratto di lievito. Il rapporto sbilanciato C/N permette l'accumulo di lipidi, limitando la crescita dei ceppi alla sola concentrazione di N, favorendo l'accumulo di lipidi con il C rimanente. Dopo aver aggiustato il pH ed il rapporto C/N il terreno viene sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 121 °C.

La quantità totale di carbonio presente nel terreno di coltura sterilizzato è stata valutata mediante analisi HPLC del campione.

➤ Preparazione preinoculo/inoculo

I tre ceppi utilizzati per le prove di accumulo sono stati conservati a -80°C e, prima del loro utilizzo, è stato necessario rinfrescarli per 48 ore su terreno solido YPD (20 g/l glucosio, 10 g/l estratto di lievito, 10 g/l peptone e 20 g/l agar) con pH 6.0. Tale step è servito ad ottenere cellule di partenza aventi lo stesso periodo di crescita evitando così colture vecchie ormai in senescenza.

Per ogni condizione sperimentale da testare, prima di poter avviare la reazione fermentativa vera e propria, i lieviti rinfrescati sono stati trasferiti dalla coltura su piastra YPD ad un terreno liquido di preinoculo composto per il 50% da terreno YPD e per il restante 50% da idrolizzato di cardo (pH 5.5 e C/N circa 40). Il preinoculo viene fatto crescere 24h per consentire ai lieviti di adattarsi al terreno che verrà utilizzato per il test di accumulo lipidico in modo tale da produrre una buona quantità di biomassa da poter poi utilizzare per effettuare l'inoculo.

➤ Preparazione preinoculo

Ogni specifico preinoculo viene preparato in falcon sterili da 50 ml mediante l'aggiunta di 5 ml (50%) di YPD e 5 ml (50%) di idrolizzato di ognuna delle tre biomasse per un volume totale di 10 ml (v/v=5/1). Il preinoculo è stato effettuato per ciascun ceppo prelevando un'aliquota della biomassa cresciuta nelle piastre YPD dopo 48h di crescita. Il preinoculo è stato incubato per 24 ore sia a 20° che a 25°C, inclinato di 60° in agitazione (160 rpm) con il tappo leggermente svitato in modo da creare un ambiente ossigenato fondamentale per il metabolismo dei lieviti.

➤ Prove di accumulo lipidico in beuta da 100 ml

Per valutare la capacità dei lieviti di accumulare lipidi da terreno idrolizzato, sono state condotte prove in beute da 100 ml sterili (Fig 4.11).

I ceppi sono stati inoculati in 20 ml di terreno sterile corrispondenti ai campioni idrolizzati delle tre biomasse (BS11, BS12, OL03, OL12, CA01 e CA02) alle temperature di crescita di 20°C e 25°C in agitazione costante di 160 rpm.

L'inoculo viene effettuato in modo da avere una OD₆₀₀ al tempo zero pari a 0.1 nell'inoculo prelevando un volume di preinoculo calcolato come in equazione 7:

$$V \text{ da prelevare} = \frac{V \text{ finale terreno}}{\left(\frac{OD_{600} \text{ preinoculo}}{0.1} \right)} \quad (7)$$

L'inoculo è stato monitorato tramite lettura della OD₆₀₀ e controllo della concentrazione di glucosio e xilosio per mezzo di analisi HPLC.



Figure 4-11: Cinetiche di accumulo lipidico in beuta

➤ Allestimento culture in reattore automatizzato

Il ceppo *L. creatinivorum* DBVPG 4794 è stato selezionato sulla base alle migliori rese ottenute in beuta per scalare il processo su reattore automatizzato da 5 litri.

Tutti i parametri del mezzo di coltura sono stati controllati tramite software. In particolare si è lavorato con un'agitazione di 150-160 rpm, pH 5.50, temperatura pari a 20°C e pressione parziale di ossigeno pO_2 intorno all'80% con un flusso costante di 3.5 l/min, condizioni ottimali per la crescita e l'accumulo di lipidi da parte del lievito selezionato. Il processo è stato monitorato con prelievi effettuati ogni 24 h per valutare il consumo di zuccheri mediante analisi HPLC e la crescita di biomassa mediante lettura dell'OD600. Le cinetiche sono state interrotte al termine completo delle fonti di carbonio; in seguito si è passati alla fase di quantificazione della biomassa prodotta e dei lipidi accumulati.

➤ Quantificazione della biomassa prodotta

Per la quantificazione della biomassa prodotta, si è prelevato 1 ml di coltura, mettendolo in un eppendorf da 1.5 ml precedentemente portata a secco in stufa a 105°C per 24 h e pesata. La coltura è stata lavata con 5 ml di acqua distillata, e dopo aver allontanato il surnatante, la biomassa è stata posta in stufa a 105°C per una notte e successivamente pesata per la quantificazione.

➤ Estrazione dei lipidi

Il protocollo di estrazione dei lipidi utilizzato fa riferimento al protocollo di Li-Xia et al [67] al quale sono state apportate alcune modifiche.

Il protocollo prevede il prelievo di 10 ml di campione e loro successiva centrifugazione (5000xg per 10 min.) in modo da allontanare il pellet cellulare dalla fase liquida. Una volta separate la fase cellulare dal liquido si passa all'idrolisi cellulare con aggiunta di 10 ml di HCl 4M incubando a 60° C (in bagnetto termico termostato) per 2 ore. Al termine della reazione, sono aggiunti 15 ml del solvente d'estrazione (cloroformio/metanolo 2:1 V/V) e fatti reagire per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione a 160 rpm. Dopo l'incubazione, si è passati alla separazione della fase organica da quella acquosa mediante centrifugazione (Fig. 4.12). Dopo aver recuperato la fase organica in vial di vetro, è stato insufflato gas di N_2 per favorire l'evaporazione del solvente residuo e portare a secco il materiale lipidico.

A questo punto si è passati a quantificazione gravimetrica dell'estratto.



Figure 4-12: Separazione delle tre fasi ottenute dalla lisi cellulare (in basso la fase organica contenente i lipidi).

4.4.6 Esterificazione degli acidi grassi

Gli oli ottenuti sono stati sottoposti a esterificazione utilizzando il protocollo proposto da Aued-Pimentel et. al [68] con alcune modifiche.

Il campione da esterificare (100 mg circa) è stato dissolto in 4 ml di esano puro (>99%) in vial di vetro. Sono stati poi aggiunti 0.16 ml di una soluzione metanolica di KOH (2 mol L⁻¹) ; la soluzione è stata vortexata per circa 30 secondi. Sono stati inseriti 1.6 ml di soluzione satura di NaCl per favorire la separazione delle fasi. Il campione è stato centrifugato per eliminare eventuali residui ed impurità. Un aliquota di 1 µl della fase organica è andata incontro ad analisi GC-FID.

Per la quantificazione relativa degli esteri metilici all'interno del campione è stata utilizzata una tecnica normalizzazione interna tramite l'utilizzo della miscela di standard FAME Mix C8-C24 Supelco.

Per ogni campione è stato infine calcolato l'indice di insaturazione UI secondo la formula (8) di Watson:

$$UI = [\% \text{ monoenes} + 2(\% \text{ dienes}) + 3(\% \text{ trienes})] / 100 \quad (8)$$

Capitolo 5 : RISULTATI

5.1 CARATTERIZZAZIONE BIOMASSE

Le tre biomasse sperimentate, biomasse spiaggiate, potature d'olivo e cardo hanno subito lo stesso tipo di processo per poter essere caratterizzate prima del loro utilizzo.

Dopo essere state seccate a 40° per una settimana, sono state ridotte in chip di 2-3 cm (Figure 5.1 a, b e c). Per ovviare al problema di disomogeneità dei campioni di partenza esse hanno subito il processo di quartatura ed una aliquota rappresentativa è andata incontro alle analisi di caratterizzazione.

Sui tre campioni sono state effettuate misure del contenuto di sostanze volatili, umidità, ceneri ed analisi CHN e, secondo le procedure NREL, è stata valutata la loro composizione in termini di cellulosa, emicellulosa e lignina.

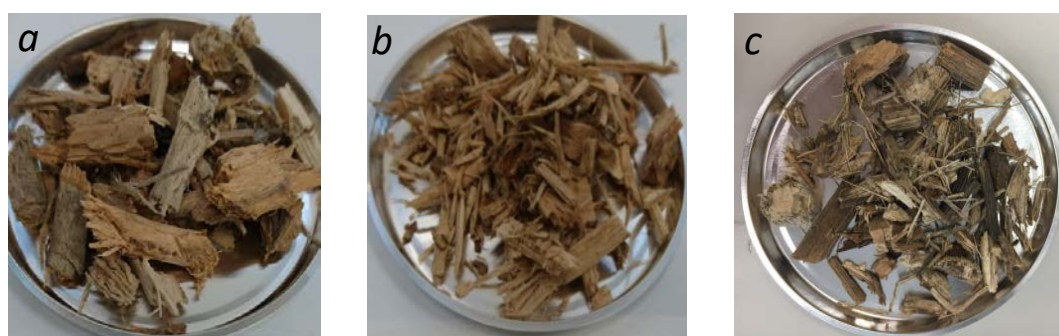


Figure 5-1: Biomasse spiaggiate (a) - Potature di olivo (b) - Cardo (c)

I risultati delle analisi TGA e CHN sono riportati in tabella 5.1:

Table 5-1: Risultati analisi TGA e CHN

Tipo di analisi	Unità di misura	BS	OL	CA
Umidità	% wb	7.61	5.77	8.48
Ceneri	% db	4.43	1.38	1.57
Sostanze volatili	% db	77.51	79.25	76.67
Carbonio fisso	% db	20.05	19.38	8.28
Carbonio	% db	46.03	56.80	43.33
Azoto	% db	0.34	0.28	0.63
Idrogeno	% db	6.69	6.81	6.45

Tali valori risultano in linea con quelli relativi alle biomasse legnose, caratterizzate da contenuti di carbonio intorno al 50%, contenuti di azoto compresi fra 0,1-1% ed elevati contenuti di ossigeno [69]. Il diverso contenuto in ceneri tra le varie biomasse è chiaramente legato alla loro natura e ad eventuali contaminazioni della biomassa stessa.

Per quanto riguarda la composizione chimica, i risultati sono mostrati di seguito (Tab. 5.2 e Fig. 5.2).

Table 5-2: Risultati caratterizzazione secondo NREL

Componente	Unità di misura	BS	OL	CA
Estrattivi	% db	6.19 ± 0.15	14.49 ± 0.06	14.25±0.16
Cellulosa	% db	31.43 ± 0.59	30.16 ± 0.15	29.03±0.36
Emicellulosa	% db	14.91 ± 0.23	16.68 ± 0.10	13.82±0.15
Lignina	% db	27.77 ± 1.53	21.02 ± 1.39	22.45±1.34
Acetili	% db	4.27 ± 0.04	4.51 ± 0.04	4.15±0.05
Pectine	% db	1.13 ± 0.00	1.35 ± 0.03	3.19±0.03
Ceneri	% db	4.86 ± 0.35	1.30 ± 0.07	1.29±0.07
Altro	% db	9.43	10.48	11.82

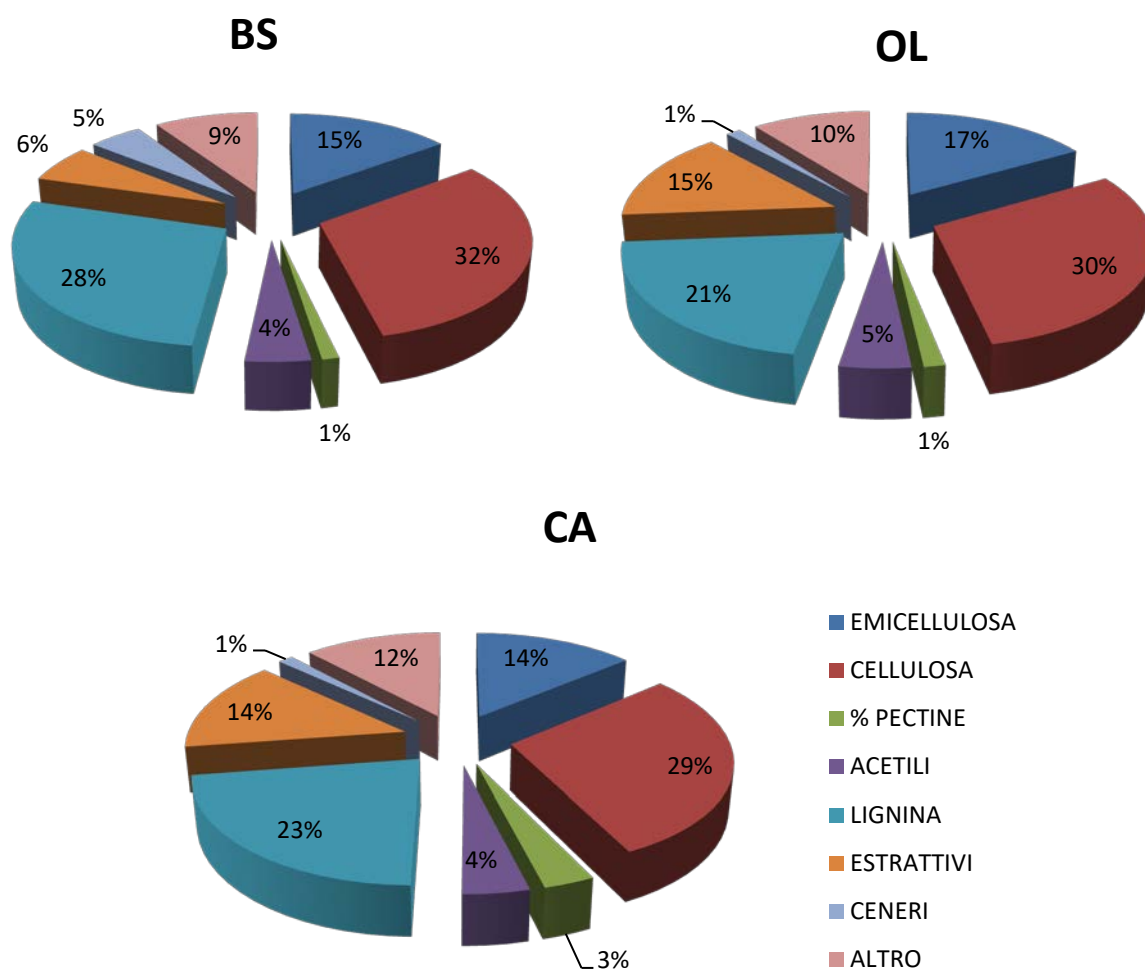


Figure 5-2: Confronto tra la composizione delle tre biomasse

Come si può osservare dai grafici, le biomasse sperimentate mostrano una composizione chimica simile tra loro.

I valori di **cellulosa**, componente di interesse in questa sperimentazione in quanto fermentabile da parte dei microrganismi utilizzati, vanno dal un minimo di 29 ad un massimo del 31%. Tali valori risultano di poco

inferiori a quelli riscontrati in letteratura per altre biomasse lignocellulosiche, quali pino e canna palustre [70-72] che presentano un contenuto di cellulosa tra il 35 ed il 38%.

Per quanto riguarda le biomasse di olivo e cardo, questo può essere dovuto al fatto che sono state processate dopo qualche mese dalla raccolta. Il cardo ha mostrato infatti una quantità di cellulosa leggermente più bassa rispetto ai dati riscontrati in letteratura [60] mentre per le BS ci si aspetterebbe che possano aver subito una parziale decomposizione della materia organica in seguito all'esposizione prolungata delle stesse all'azione degli agenti meteorologici e a quella dei microrganismi.

L'**emicellulosa**, altro polimero d'interesse in quanto costituito per più dell'80% da xilosio, presenta valori compresi tra 14 e 17%, il valore maggiore si ritrova nelle potature d'olivo, ottenendo valori molto simili a quelli riscontrati in letteratura [73].

L'altro polimero strutturale di questo tipo di biomasse è la **lignina**, i cui valori si attestano tra il 21 ed il 28%. Le biomasse spiaggiate, sono quelle che presentano la percentuale di lignina più alta ma anche le deviazioni standard maggiori. Questo fa pensare al fatto che il materiale di partenza, proprio a causa della sua provenienza, sia sicuramente disomogeneo e contenente differenti tipi di materiale legnoso. Sulle biomasse di cardo ed olivo si riscontra invece un contenuto di lignina relativamente più basso. Tale parametro è molto importante nell'ottimizzazione dei processi di produzione di bioetanolo e biolipidi, sia per l'aumentata quantità di cellulosa contenuta nella matrice lignocellulosica esplosa, sia perché la lignina stessa è un potenziale inibitore della fermentazione e dell'idrolisi enzimatica, il minor contenuto permette di effettuare idrolisi enzimatiche a maggior contenuto di solido.

E' inoltre presumibile che una biomassa contenente una minor quantità di lignina e con una più alto contenuto di gruppi acetilici, come nel caso delle potature di olivo, possa subire un pretrattamento in maniera più efficiente anche in condizioni meno aggressive limitando la formazione di altri potenziali inibitori (HMF, furfurale, acidi organici). Infatti durante la steam explosion dai gruppi acetilici si forma acido acetico, che libera ioni H^+ , i quali catalizzano ulteriormente la reazione di autoidrolisi dell'emicellulosa [74]. Una menzione particolare va fatta riguardo al contenuto di estrattivi in particolare nelle potature d'olivo. In genere questa biomassa presenta un valore di estrattivi leggermente più alto rispetto ad altre biomasse (tra il 14 e il 30%) [75] grazie alla presenza di glucani non strutturali come oleuropeina, un glicoside presente principalmente nelle foglie dell'olivo [76]. La presenza di estrattivi potrebbe anche incidere sulla fase idrolisi enzimatica dato che alcune componenti possono formare degli aggregati che possono ostacolare l'accessibilità degli enzimi al polimero di cellulosa [77].

Le potature di olivo sono inoltre quelle che presentano il maggior contenuto in pectine (3%) eteropolisaccaridi composti dall'unione di differenti monosaccaridi tra cui acido galatturonico.

La percentuale di ceneri è significativa solo nel campione di biomasse spiaggiate, con un valore di circa il 5%, imputabile principalmente alla contaminazione del campione sia prima che durante la raccolta dovuto alla presenza di sabbia e sali; le ceneri verranno comunque parzialmente rimosse dopo il pretrattamento con vapore.

La percentuale di "Altro" relativa a tutte quelle componenti non identificate nel campione di riferimento si attesta intorno al 9-12% su tutte le biomasse. Il valore più alto riscontrato nel cardo può essere imputabile alla sua natura erbacea (maggior contenuto di tessuti e vivi e minor grado di lignificazione).

5.2 RISULTATI STEAM EXPLOSION E CARATTERIZZAZIONE WIS E LF

Le tre biomasse con un contenuto medio di umidità di circa il 10%, dopo essere state cippate, sono state pretrattate mediante steam explosion (SE). Per ognuna di esse due diversi valori di $\text{Log}R_0$ sono stati testati (Capitolo 4, Tab. 4.1); tali valori sono stati selezionati in seguito ad un precedente screening svolto all'interno dei Laboratori Biocarburanti & Biochemicals su 13 diverse condizioni di steam explosion.

Le condizioni di lavoro selezionate consentivano di ottenere buone rese di idrolisi enzimatica (superiore al 50%) ed una non totale degradazione della componente emicellulosica, quindi con un buon recupero di xilosio. Alle condizioni di severità selezionate la biomassa risultava inoltre meno recalcitrante al processo di idrolisi e fermentazione dato che non si era osservata un'eccessiva degradazione ad inibitori delle componenti cellulosica ed emicellulosica [78].

Va inoltre considerato che nella selezione dei diversi valori di severità per le tre biomasse si è tenuto conto del fatto che gli esplosi dovessero presentare una composizione quanto più confrontabile tra loro.

Dopo il pretrattamento, lo slurry (solido + liquido) in uscita dal reattore (Fig 5.3) è stato separato nelle sue due componenti mediante un setaccio metallico con dei pori delle dimensioni di 1 mm. Il solido dopo essere stato pressato, è stato lavato come descritto nel Capitolo 4, paragrafo 4.2.



Figure 5-3: Slurry (solido + liquido) in uscita dall'impianto di pretrattamento e separazione delle due fasi mediante griglia

Dopo i lavaggi, l'esplosivo solido (WIS) è stato pressato con un torchio (Fig. 5.4a) in modo tale che la pressatura finale fosse la stessa per tutti i campioni, ovvero con un valore di umidità compreso tra il 65-75%. La frazione liquida (LF), contenente anche tutti i liquidi dei lavaggi, è stata filtrata con carta da filtro 73 gr/m² (Fig. 5.4b), in modo da separare la componente solida più fina (dimensioni minori di 1 mm) da quella liquida in cui sono disciolti i monomeri e gli oligomeri dell'emicellulosa e tutti i potenziali inibitori generati durante il pretrattamento. Sono stati poi caratterizzati l'esplosivo solido lavato e il liquido filtrato.

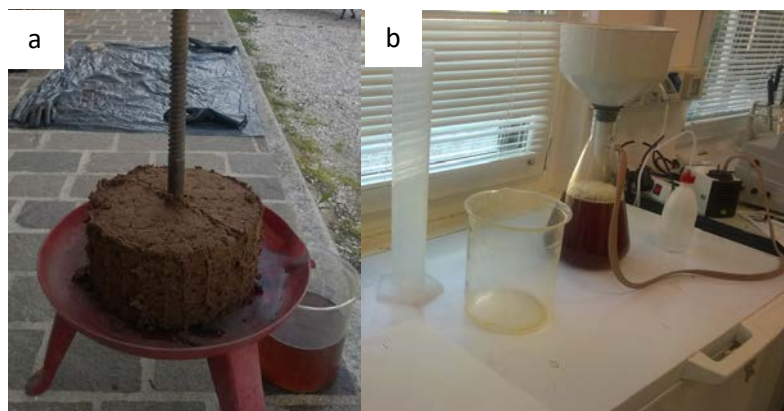


Figure 5-4: Torchio per la pressatura della frazione solida (a) e filtraggio della frazione liquida mediante carta da filtro (b).

Il recupero di materiale solido dopo steam explosion (WIS_r) è stato quantificato per valutare l'efficienza del pretrattamento. Le rese di SE sono state espresse secondo la formula 9:

$$WIS_r (\%) = \frac{g \text{ solido esploso recuperato dry basis}}{\text{peso biomassa t.q.dry basis}} 100 \quad (9)$$

La componente solida recuperata e lavata è stata poi sottoposta a caratterizzazione secondo le procedure NREL per poterne valutare la composizione solo in termini di emicellulosa, cellulosa e lignina. Tale analisi è resa necessaria per la valutazione successiva della resa di idrolisi enzimatica e fermentazione che sono a loro volta correlate al grado destrutturazione della biomassa.

I risultati relativi alle rese in massa (WIS_r) ed alla composizione dei WIS sono riportati in Tabella 5.3:

Table 5-3: Recupero e caratterizzazione del WIS ai due diversi valori di $\text{Log}R_0$

	$\text{Log } R_0$	WIS_r	% H	% C	% L
BS11	4.05	77.06%	5.80	44.30	44.02
BS12	4.64	69.09%	0.82	46.81	47.07
OL03	4.05	59.84%	4.85	48.98	38.89
OL12	4.64	54.57%	3.07	44.74	44.26
CA01	3.85	64.78%	6.08	47.71	34.48
CA02	4.28	61.35%	1.01	47.91	39.01

Di seguito i dati esposti in Tabella relativi al recupero di materiale solido sono stati raffigurati per favorirne una più immediata comprensione.

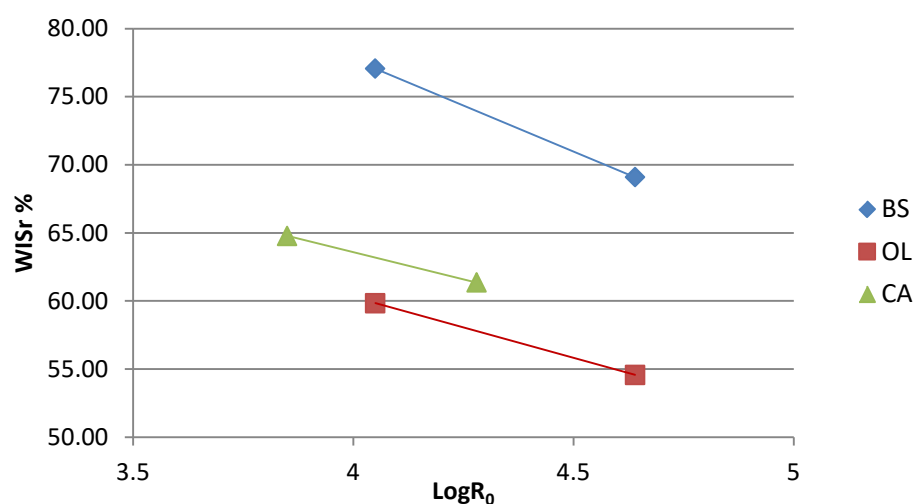


Figure 5-5: Confronto tra le rese di recupero di solido dopo SE ai diversi valori di severità ($\text{Log}R_0$)

In figura 5.5 sono messe in evidenza le rese (WIS_r %) ottenute in funzione del $\text{Log}R_0$ per tutte le e tre le biomasse pretrattate. In tutti e tre i casi si osserva un andamento lineare decrescente all'aumentare del parametro di severità, causato principalmente da due eventi. Innanzitutto il fatto che a severità maggiori si può manifestare una minor recupero in massa in quanto gran parte della biomassa si presenta in forma melmosa rendendone difficile il recupero. Inoltre trattamenti più gravosi fanno sì che una maggiore quantità di materiale solubilizza e/o passa in fase gassosa. Il minor recupero sta ad indicare che le condizioni iniziano ad essere troppo spinte e c'è una percentuale elevata di perdite dovuta probabilmente

ad una degradazione della cellulosa ad inibitori (HMF, acido levulinico, acido formico)[79]. Di contro un pretrattamento più blando con rese di recupero superiori al tempo stesso una minore accessibilità della componente cellulosica all'attacco enzimatico [80].

I dati in tabella 5.3 relativi alla composizione caratteristica degli esplosi, dipendente dal grado di severità utilizzato nella fase di SE sono stati riportati su grafico (Fig. 5.6). L'analisi della composizione dei WIS in tabella mostra come il grado di severità del pretrattamento influisca sulla composizione della biomassa esplosa.

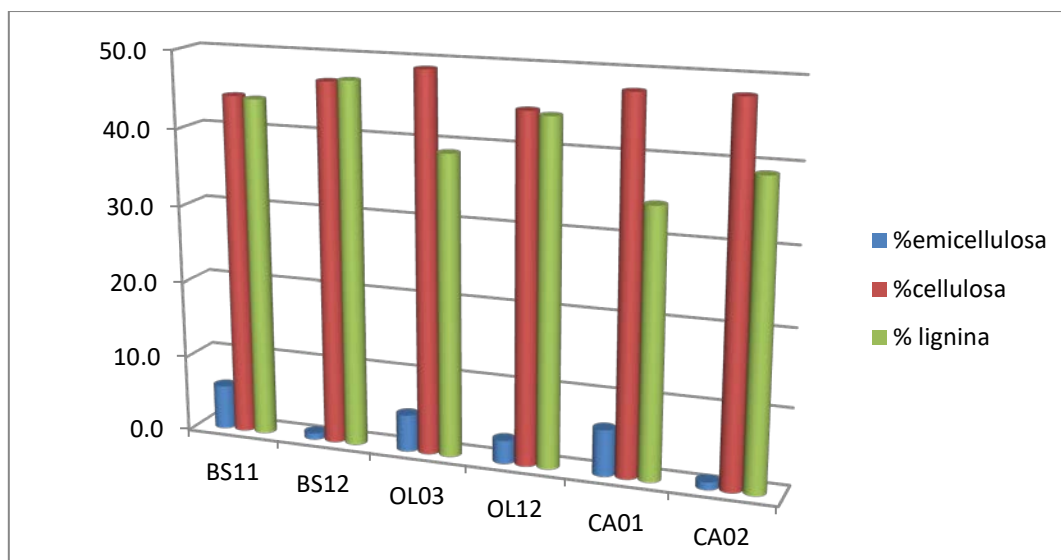


Figure 5-6: Composizione % dei WIS

L'arricchimento in cellulosa dei WIS (rosso) aumenta con l'aumentare del $\text{Log} R_0$ sia nelle BS che nel CA, mentre nell'olivo si assiste ad un leggero abbassamento di questa percentuale. Al contrario il contenuto in emicellulosa (blu) diminuisce sempre a dimostrazione del fatto che, a maggiori di severità del pretrattamento, tale componente è facilmente idrolizzata dai vapori caldi [80]. La percentuale di lignina, non venendo intaccata dal pretrattamento, ha un andamento crescente all'aumentare dell' R_0 in relazione al diminuire delle percentuali delle altre componenti caratterizzate. I risultati ottenuti si sono mostrati paragonabili a quelli di letteratura sia per l'olivo [81] che per il cardo [70].

Anche tutte le frazioni liquide (LF) ottenute dopo i pretrattamenti delle diverse biomasse, sono state analizzate in termini di carboidrati derivanti principalmente dall'emicellulosa idrolizzata. Le percentuali di cellulosa nel liquido non sono infatti riportate in quanto sempre inferiori all'1%. La percentuale di emicellulosa recuperata nelle LF, nel WIS e il suo recupero totale dopo il pretrattamento steam explosion sono mostrati in Tabella 5.4.

Table 5-4: Recupero di emicellulosa nella frazione liquida (H_r LF), nel WIS (H_r WIS) e totale

Sample	Log R_0	% H_r LF	% H_r WIS	Total H_r %
BS11	4.05	14.79	29.95	44.76
BS12	4.64	5.27	3.82	9.09
OL03	4.05	19.65	17.38	37.03
OL12	4.64	8.09	10.06	18.15
CA01	3.85	12.64	24.87	37.51
CA02	4.28	1.22	3.93	5.15

I risultati ottenuti mostrano che la percentuale di emicellulosa presente nel WIS diminuisce notevolmente con l'aumento del fattore di severità, così come ci si aspetterebbe.

La bassa percentuale della componente emicellulosica anche nella LF dei campioni pretrattati in maniera più severa suggerisce inoltre che gli zuccheri rilasciati durante il pretrattamento vengono probabilmente degradati a sostanze inibenti (furfurali, 5-HMF, acido levulinico e acido formico). Maggiore è la severità del pretrattamento minore è il recupero di emicellulosa che probabilmente si sarà andata a formare i composti di degradazione (inibitori). Gli inibitori nei liquidi sono stati quantificati mediante analisi HPLC ed i risultati sono mostrati in figura 5.7.

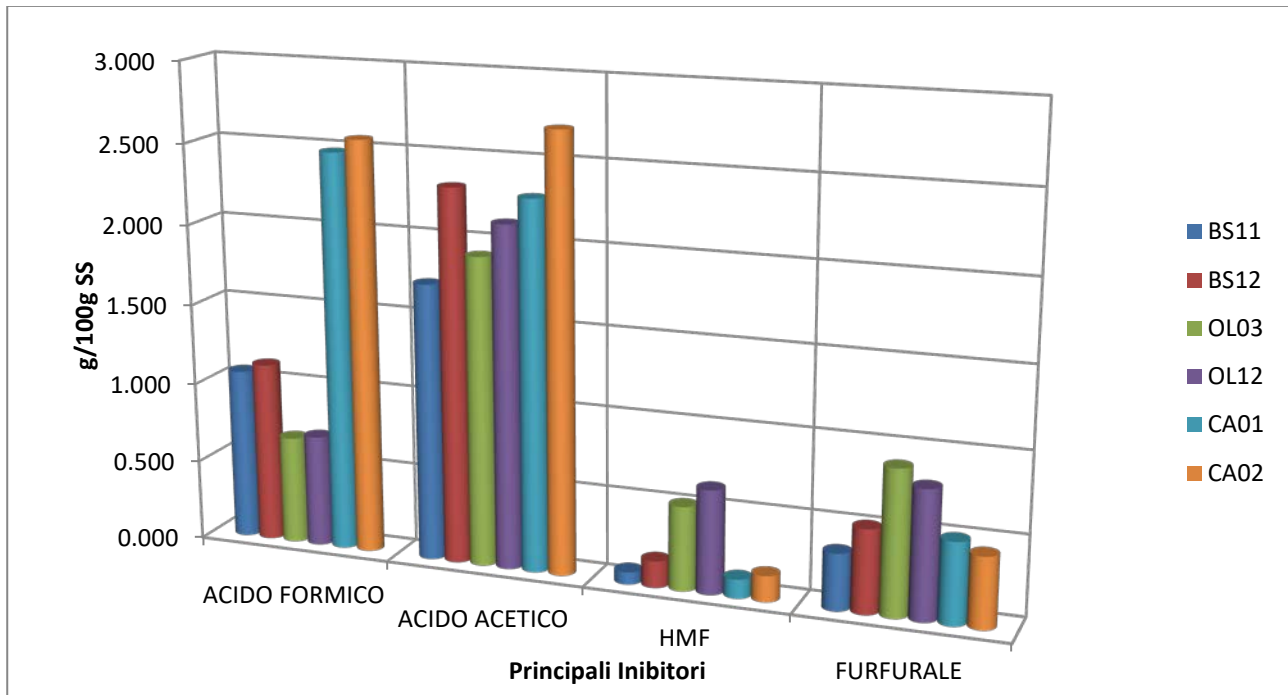


Figure 5-7: Principali inibitori contenuti nelle LF di tutti i campioni espressi in g/100g di sostanza secca

Come si può osservare la quantità di acido acetico che si forma in seguito al pretrattamento aumenta sempre con l'aumentare della severità dello stesso in quanto viene liberato un maggior numero di gruppi acetilici. Il furfurale e l'HMF invece presentano un andamento più variabile in quanto vanno entrambi incontro a conversione in acido formico, la cui quantità aumenta infatti leggermente all'aumentare del LogR_0 . Inoltre il furfurale, così come l'acido formico, tra gli inibitori derivanti dagli zuccheri è quello a maggior volatilità [82]. L'HMF, nonostante vada in parte incontro a trasformazione in acido levulinico, non mostra andamento decrescente all'aumentare del LogR_0 , al contrario può aumentare leggermente. Ciò è presumibilmente dovuto al fatto che la sua formazione è dovuta alla degradazione di tre zuccheri, mannosio, galattosio e glucosio (Fig. 2.6).

Lo studio e la quantificazione degli inibitori nella frazione liquida è utile per poter l'eventuale utilizzo dell'intero slurry (solido + liquido) valutare in sperimentazioni successive. Ciò permetterebbe di evitare la fase di separazione e permettendo anche l'utilizzo degli zuccheri derivanti dalla solubilizzazione dell'emicellulosa.

5.3 IDROLISI ENZIMATICA

La fase di idrolisi enzimatica è stata effettuata sui solidi pretrattati per ottenere carboidrati in forma monomerica direttamente fermentabili dai microrganismi.

Va ricordato che i campioni che hanno subito la fase di idrolisi per una durata 96 ore sono quelli che sono poi andati incontro alle prove di accumulo lipidico, come descritto nel Capitolo 4, sez. 4.3.

Le idrolisi, effettuate a 50°C e con un carico di solido del 15% sono state monitorate con prelievi a 24-48-72-96h. I prelievi sono stati analizzati tramite HPLC in modo da valutare la quantità di glucosio formato durante la prova.

In figura 5.8, a titolo di esempio, è mostrata la sovrapposizione tra i cromatogrammi relativi ad un unico idrolizzato nei diversi tempi di prelievo, l'andamento mostrato è relativo al campione BS11 ma è risultato essere il medesimo in tutti i campioni. Si può osservare come la concentrazione di glucosio aumenti col tempo, anche il picco relativo agli altri zuccheri XMG (xiliosio, mannosio, galattosio) aumenta col tempo il che indica che il cocktail Ctec2 sta idrolizzando anche l'emicellulosa, confermato anche dalla presenza di arabinosio nel cromatogramma. L'acido acetico si forma in seguito all'idrolisi enzimatica dei gruppi acetilici e la sua concentrazione a 48 h (< 1 g/L) è molto inferiore rispetto alla sua soglia di inibizione, questo perché la maggior parte degli acetili sono rimossi con il pretrattamento.

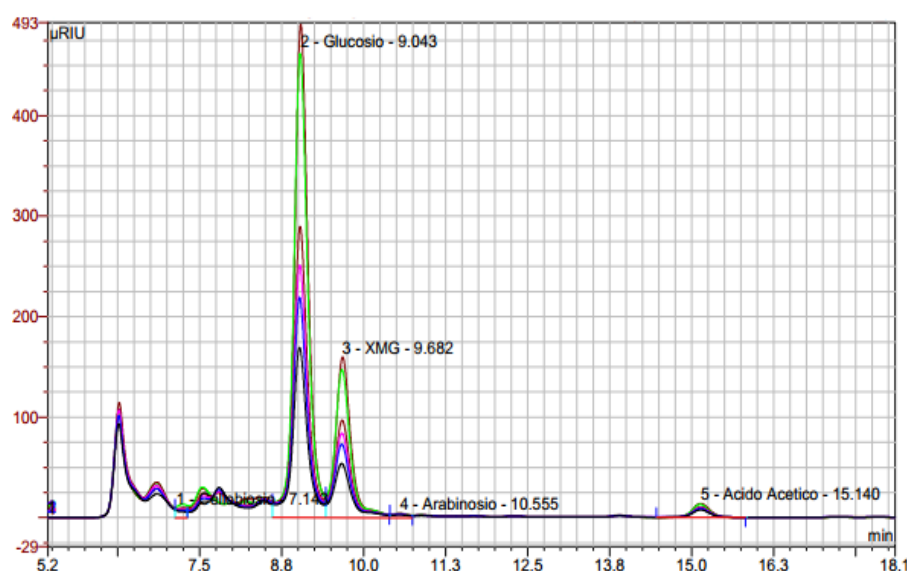


Figure 5-8: Sovrapposizione di cromatogrammi di idrolisi enzimatica relativi ad uno stesso campione (BS12) a tempi diversi.

In figura 5.9 è mostrato l'aumento della concentrazione di glucosio nel tempo di idrolisi, per tutti i sei campioni pretrattati.

I risultati hanno mostrato che entro le prime 48 ore quasi tutta la cellulosa viene idrolizzata, l'idrolisi nelle ore successive prosegue ma la velocità di produzione di glucosio è molto più bassa, in quanto circa il 95% della cellulosa è convertita nelle prime 24 ore, mentre nelle ultime ore la produzione tende allo zero. Lavorando in eccesso di enzima la velocità della reazione enzimatica risulta molto elevata nelle prime fasi dove vi è anche un'elevata concentrazione di substrato mentre cala drasticamente al diminuire del substrato accessibile (andamento tipico spiegato dall'equazione della cinetica enzimatica di Michaelis-Menten).

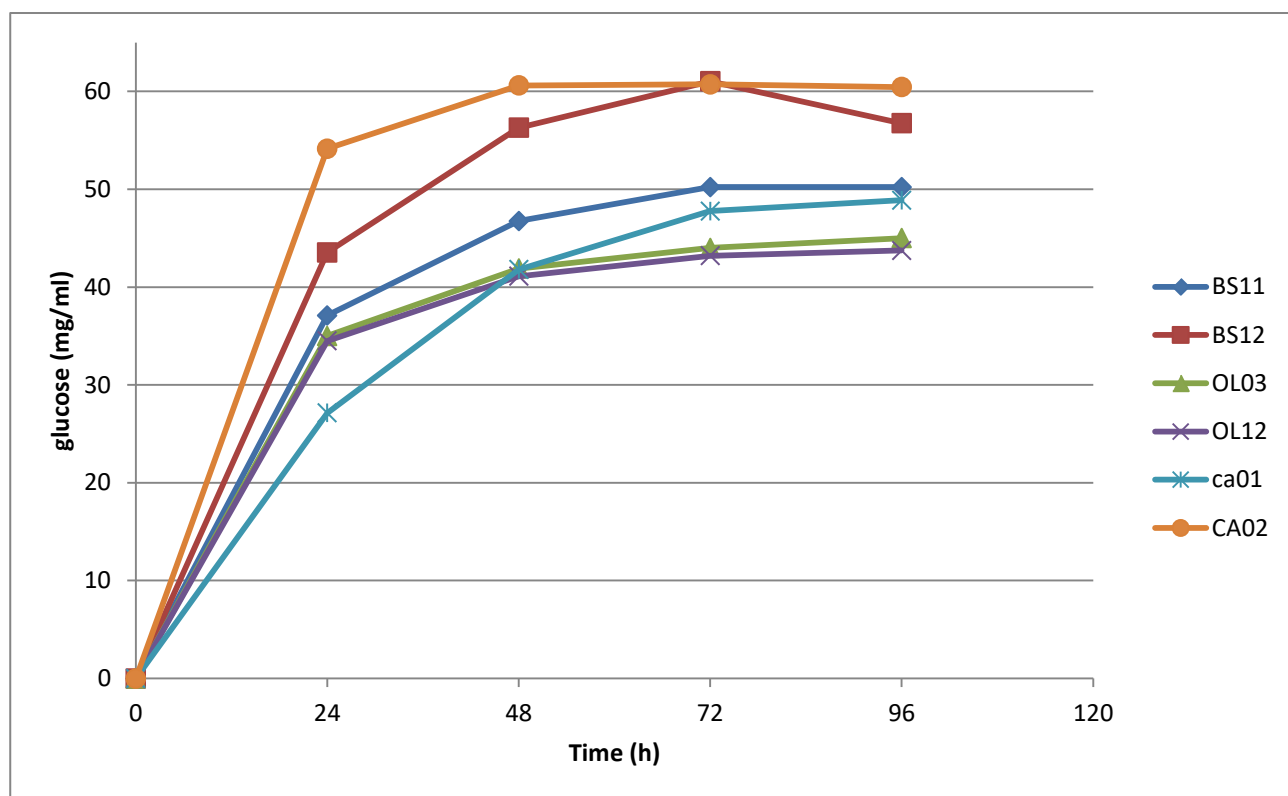


Figure 5-9: Andamento della concentrazione di glucosio nel tempo nei 6 campioni

In figura si può anche osservare che il processo di idrolisi risulta sempre più efficiente nei campioni pretrattati a $\text{Log} R_0$ più elevati il che è in perfetto accordo col fatto che la biomassa è stata destrutturata in modo efficace e dunque la cellulosa è più facilmente accessibile agli enzimi.

Sono state calcolate, per tutte le prove, le rese di idrolisi di cellulosa ed emicellulosa convertite in zuccheri semplici che indicano quanto materiale è stato idrolizzato rispetto a quello in input nel reattore di idrolisi. Le condizioni di lavoro e le rese finali sono riportate in Tabella 5.5.

Table 5-5: Condizioni di idrolisi e rese di conversione di cellulosa ed emicellulosa

Sample	Log R_0	ED (%)	Resa idrolisi cellulosa convertita (%)	Resa idrolisi emicellulosa convertita (%)
BS11	4.05	15	54.98%	36.07%
BS12	4.64	15	63.24%	74.31%
OL03	4.05	15	44.55%	38.86%
OL12	4.64	15	55.23%	66.59%
CA01	3.85	15	49.69%	44.88%
CA02	4.28	15	67.65%	69.12%

Buoni valori di rese sono stati raggiunti infatti sia dal cardo (CA02) che dal campione di biomasse spiaggiate pretrattati in maniera più severa (BS12): circa il 60% di cellulosa in input nel reattore dopo 96 ore era convertita in glucosio. Rese meno performanti si sono osservate nel caso delle potature d'olivo. Tali risultati risultano in accordo con i dati di letteratura secondo cui queste biomasse necessitano di alte temperature ($>200^\circ\text{C}$) in fase di pretrattamento con steam explosion. Cara et al. hanno dimostrato infatti che a basse temperature la rese di idrolisi non aumentavano rispetto a quelle del materiale di partenza non pretrattato;

inoltre nel caso dell'olivo per massimizzare la produzione di glucosio si preferisce eseguire, prima dell'idrolisi enzimatica, una fase di delignificazione della biomassa [83].

In ogni caso i campioni pretrattati a condizioni più gravose hanno ottenuto sempre rese maggiori, a dimostrazione della maggiore accessibilità degli enzimi alla componente zuccherina. Ciononostante non si osservano mai rese al di sopra del 68%, valore leggermente più basso rispetto a quelli ottenuti con altri tipi di biomasse lignocellulosiche .

5.4 PROVE DI PRODUZIONE DI BIOETANOLO IN SSF

I sei campioni pretrattati, che non sono andati incontro ad idrolisi enzimatica per 96 ore, sono stati invece sottoposti ad una SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Il processo prevede per le prime 4 ore idrolisi enzimatica pura svolta a 50°C mediante utilizzo del Cocktail Ctec, seguita da inoculo del lievito (*S. cerevisiae*) e SSF a 37°C per 92 ore.

La SSF è stata eseguita in bioreattori Sartorius da 5 litri, utilizzando un rapporto solido/liquido del 15% ed un dosaggio enzimatico del 15%. L'efficienza dell'intero processo di produzione di bioetanolo è stata valutata dapprima come resa globale di etanolo (g etanolo/ 100 g di cellulosa caricata nel bioreattore) e poi espressa come valore percentuale rispetto al massimo teorico raggiungibile secondo l'equazione 10:

$$[EtOH_y\% = \frac{EtOH}{WIS_l * \%C * 0.5661} 10^4] \quad (10)$$

Dove 0.5661 rappresenta la massima quantità di grammi di etanolo teoricamente ottenibile da un grammo di cellulosa.

L'overall yield (OY), intesa come grammi di etanolo ottenuto per 100 grammi di biomasse spiaggiate su base secca (RM) andate incontro all'intero processo di produzione di etanolo (steam explosion e SSF) è stata calcolata secondo l'equazione 11 :

$$[OY = \frac{EtOH}{WIS_r} \frac{WIS_r}{RM} 100] \quad (11)$$

Dove WISr è la quantità in grammi di biomasse spiaggiate recuperata dopo il pretrattamento di steam explosion.

La overall yield relativa (OY%), invece indica la overall yield (OY) ottenuta rispetto al massimo teorico ottenibile da 100 g di biomassa su base secca (RM) ed è stata calcolata secondo l'equazione 12:

$$[OY_{\%} = \frac{OY}{C_{RM\%} 0.5661} 100] \quad (12)$$

Dove $C_{RM\%}$ è la percentuale di cellulosa contenuta all'interno delle biomasse di partenza.

In Figura 5.10 è riportato il grafico dell'andamento del consumo di glucosio e la produzione di etanolo relativo alle sole biomasse spiaggiate (l'andamento è infatti il medesimo per tutti i campioni).

Come si può osservare 4 ore di idrolisi sono sufficienti per generare una quantità di glucosio libero fermentabile utilizzabile dai lieviti. Con l'inoculo dei microrganismi (alle 4h) si inizia ad osservare l'abbassamento della concentrazione di glucosio e il contestuale aumento di quella di etanolo.

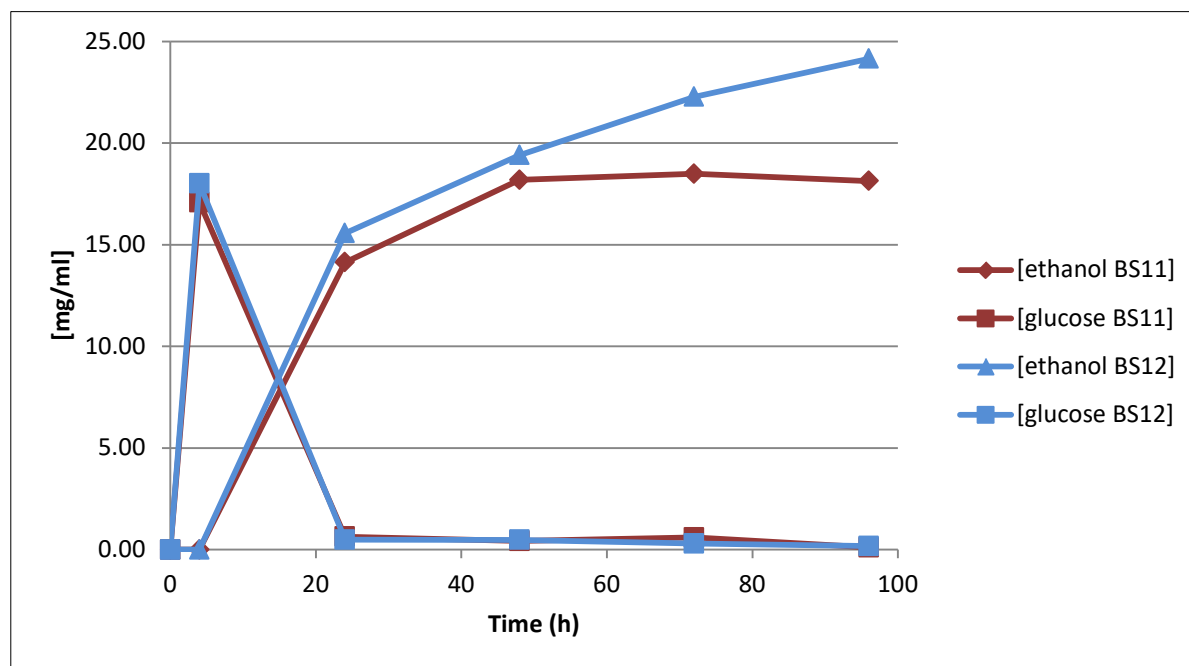


Figure 5-10: : Concentrazioni in mg/ml di glucosio ed etanolo nei campioni BS11(blu) e BS12 (rosso) nel tempo

Dal grafico dell'andamento si nota che la concentrazione di glucosio dopo le prime 24 ore risulta essere prossima allo zero, mentre la concentrazione di etanolo continua a crescere. Ciò è indice del fatto che la rimozione del glucosio dalla soluzione, mediante fermentazione ad opera del lievito, porta ad una diminuzione di inibizione da prodotto favorendo l'attività enzimatica.

In tabella 5.6 sono invece riportati i valori ottenuti per tutti i campioni utilizzati.

Table 5-6: Rese del processo di SSF a 96 ore.

Sample	EtOHy%	OY(g/100g)	OY%
BS11	22.03	7.52	42.28
BS12	27.77	8.98	50.48
OL03	28.01	8.21	48.09
OL12	37.99	9.27	54.33
CA01	40.34	13.29	49.06
CA02	44.99	13.64	50.30

Le rese sono riportate in termini di grammi di etanolo per 100 grammi di cellulosa caricati nel bioreattore e per 100 grammi di materiale di partenza (OY) dei campioni a 96 ore, mentre l'ultimo valore (OY%) riporta la percentuale di resa dei campioni rispetto alla massima produzione di etanolo teorica raggiungibile a partire da 100 grammi di biomassa di partenza.

Il miglior rendimento produttivo, rispetto al materiale in input, è stato raggiunto dai campioni di cardo che hanno prodotto circa 13g di etanolo su 100g di materiale di partenza corrispondenti a circa il 50% di resa sul massimo teorico raggiungibile.

L'olivo ha mostrato rese simili a quelle delle biomasse spiaggiate i cui valori restano al di sotto di quelle ottenute per il cardo; il motivo principale può essere legato alla grade quantità di polifenoli presenti nella biomassa di olivo i quali possono influire negativamente sulla fermentazione da parte del lievito [84].

L'importanza del calcolo del termine OY può dare una idea sulla reale valorizzazione di un prodotto di scarto. Prendendo come esempio il campione BS12, si può affermare che a partire da 100 grammi di materiale di scarto è stato possibile produrre 8,98 grammi di etanolo. Questo valore non è molto elevato se confrontato con i grammi ogni 100 grammi di materiale di partenza ottenuti dalle altre biomasse dedicate. È importante però ricordare che queste biomasse, sono considerate dei rifiuti da smaltire, perciò la produzione di etanolo o lipidi a partire da esse consente in qualche modo di valorizzare dei prodotti considerati degli scarti.

Inoltre, essendo ancora in una fase preliminare, tali valori sono da considerarsi promettenti, in quanto le rese potranno migliorare ottimizzando ulteriormente le condizioni di lavoro.

5.5 PROVE DI PRODUZIONE LIPIDI

I sei idrolizzati derivanti da idrolisi enzimatica (96h) delle biomasse testate sono andate incontro alle prove di accumulo lipidico da parte dei microrganismi selezionati. Le prime prove svolte in beuta hanno visto l'utilizzo di tre diversi ceppi microbici; il più prestante di essi è stato poi utilizzato per lo scaling up del processo su bioreattore.

5.5.1 Cinetiche in beuta

Le fermentazioni in beuta sono state condotte su piccoli volumi per individuare quale dei tre ceppi precedentemente selezionati, *L. creatinivorum* (DBVPG 4794), *N. adeliensis* (DBVPG 5195) e *S. terricola* (DBVPG 5870), producesse maggiori quantità di lipidi con buone rese di conversione ed in quali condizioni.

Le prove sono state condotte per ognuno dei sei substrati a due diverse temperature (20-25°C) fino al consumo totale della fonte di carbonio. La concentrazione di carboidrati, intesa come somma di zuccheri C5 e C6 utilizzabili per la fermentazione, per i sei substrati di partenza è mostrata in tabella 5.7.

Table 5-7: concentrazioni in g/L di fonti di C nei campioni idrolizzati

Terreno	[C] g/l
BS11	50.8
BS12	50.0
OL03	44.3
OL12	40.4
CA01	44.5
CA02	53.2

Tutti i substrati sono stati arricchiti di azoto utilizzando Yeast Extract (OXOID) per raggiungere un rapporto C/N pari a 40 [85]. Come già descritto lo sbilanciamento C/N è necessario per attivare la via metabolica di biosintesi degli acidi grassi da parte dei lieviti. Al termine della fermentazione sono stati quantificati i seguenti parametri:

1. Biomassa microbica prodotta (g/L)
2. Totale dei lipidi accumulati (g/L)
3. Percentuale di accumulo di lipidi (%lipidi/PS)
4. Produttività giornaliera di lipidi (lipidi prodotti/giorni)
5. Efficienza di conversione di carboidrati in lipidi (%lipidi/[C]).

Va considerato che trattandosi di un terreno complesso, non specifico per l'accumulo lipidico [62], si possono verificare dei problemi di crescita ai ceppi testati che necessiteranno di una fase di adattamento allo stesso.

I primi risultati presi in considerazione sono quindi quelli riguardanti la capacità di ognuno dei ceppi a crescere sui substrati forniti alle diverse temperature. Di ognuno dei ceppi cresciuti è stata monitorata la biomassa prodotta tramite lettura della densità ottica a partire dall'inoculo iniziale con OD₆₀₀ di 0.1 fino al termine della fermentazione.

Table 5-8: Rese di biomassa prodotta per ogni ceppo utilizzato utilizzando i diversi substrati di crescita alle diverse temperature

Biomassa prodotta						
	5870 <i>S. terricola</i>		5195 <i>N. adeliensis</i>		4794 <i>L. creatinivorum</i>	
	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
BS11	-	-	12.4 ± 0.1	14.5 ± 0.5	16.7 ± 0.2	-
BS12	18.5 ± 0.8	14.4 ± 0.6	12.5 ± 0.5	14.4 ± 0.6	17.9 ± 0.1	-
OL03	15.5 ± 0.1	-	12.7 ± 0.3	18.3 ± 0.3	19.2 ± 0.6	14.6 ± 0.3
OL12	-	-	11.3 ± 0.1	12.5 ± 0	-	-
CA01	-	-	14.1 ± 0.5	13.9 ± 0.3	20.6 ± 0.6	14.7 ± 0.2
CA02	-	-	15.5 ± 0.7	13.5 ± 0.4	24.6 ± 0.5	-

Come si può osservare il ceppo *N. adeliensis* DBVPG 5195 è stato quello che meglio ha risposto all'adattamento in un terreno complesso, crescendo con tutti i substrati e ad entrambe le temperature testate. Il ceppo *S. terricola* DBVPG 5870 ha mostrato maggiori difficoltà a crescere negli idrolizzati lignocellulosici mentre l'*L. creatinivorum* DBVPG 4794 sebbene con minor costanza è quello che ha dato le rese maggiori in termini di biomassa prodotta in particolare alla temperatura di 20°C.

Al termine della fermentazione, ovvero al consumo totale di tutte le fonti di carbonio è stata effettuata l'estrazione lipidica e la relativa quantificazione gravimetrica delle rese.

Il primo parametro riportato in tabella 5.9 riguarda la resa (g/L) di lipidi ottenuti in ciascuna prova.

Table 5-9: Rese in termini di g/L di prodotto ottenuto dai tre ceppi alle diverse temperature

g/L lipidi prodotti						
	5870 <i>S. terricola</i>		5195 <i>N. adeliensis</i>		4794 <i>L. creatinivorum</i>	
	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
BS11	-	-	7.1 ± 0.5	8.2 ± 0.7	9.2 ± 0.4	-
BS12	9.9 ± 0.1	7.8 ± 0.6	6.7 ± 0	8.5 ± 1.1	9.8 ± 0.5	-
OL03	8.6 ± 0	-	6.3 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.4	5.9 ± 0
OL12	-	-	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.1	-	-
CA01	-	-	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.4	10.4 ± 0.2	5.3 ± 0.1
CA02	-	-	7.0 ± 0.9	7.2 ± 0	10.8 ± 0.6	-

La tabella conferma quanto discusso sopra riguardo alla capacità dei tre ceppi di crescere e accumulare lipidi sulle diverse matrici in esame. Il ceppo *N. adeliensis* è risultato il più versatile poiché in grado di crescere e accumulare lipidi in tutti i substrati ed a tutte condizioni testate.

Ciononostante le rese in g/L più elevate sono state ottenute dal ceppo *L. creatinivorum* 4794 ed utilizzando come substrato i campioni pretrattati con un grado di severità maggiore probabilmente a causa della diversa concentrazione zuccherina (Tab. 5.7).

Il secondo parametro preso in considerazione è quello relativo alle produttività di ogni cinetica. Per calcolare tale parametro si devono tenere in considerazione i tempi impiegati dai microrganismi per il totale consumo della fonte di carbonio che sono riportati in Tabella 5.10.

Table 5-10: Durata in giorni delle fermentazioni in beuta a 20 e 25°C

	Durata cinetiche (gg)					
	5870 <i>S. terricola</i>		5195 <i>N. adeliensis</i>		4794 <i>L. creatinivorum</i>	
	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
BS11	-	-	6	16	9	-
BS12	6	16	6	16	8	-
OL03	11	-	11	8	15	20
OL12	-	-	13	11	-	-
CA01	-	-	6	6	8	14
CA02	-	-	6	7	10	-

In tabella 5.11 sono stati riportati dunque i risultati sulla produttività intesa come g lipidi prodotti/giorni di fermentazione, sui 6 diversi substrati.

Table 5-11: Produttività giornaliera di lipidi dei tre ceppi alle diverse temperature

	g lipidi prodotti/durata cinetiche (giorni)					
	5870 <i>S. terricola</i>		5195 <i>N. adeliensis</i>		4794 <i>L. creatinivorum</i>	
	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
BS11	-	-	1.17 ± 0.07	0.51 ± 0.03	1.03 ± 0.05	-
BS12	1.63 ± 0.05	0.49 ± 0.03	1.1 ± 0.00	0.53 ± 0.05	1.23 ± 0.06	-
OL03	0.74 ± 0.00	-	0.57 ± 0.01	0.74 ± 0.02	0.35 ± 0.10	0.27 ± 0.00
OL12	-	-	0.38 ± 0.01	0.51 ± 0.01	-	-
CA01	-	-	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.07	1.30 ± 0.02	0.38 ± 0.01
CA02	-	-	1.17 ± 0.15	1.04 ± 0.01	1.08 ± 0.05	-

Anche in questo caso, come commentato in precedenza, la differenza in produttività, quindi nella durata delle cinetiche tra i substrati pretrattati a valori diversi di LogR₀, può essere imputabile principalmente alla diversa concentrazione zuccherina (Tab. 5.7). Inoltre va considerata, nei campioni pretrattati a condizioni più severe, l'eventuale presenza di concentrazioni più alte di inibitori, che rendono il terreno più complesso e contribuiscono ad allungare la fase di adattamento dei microrganismi.

Si può osservare come i microrganismi in alcuni casi riescano a crescere ed accumulare anche a temperature differenti dal loro optimum (20° C). Infatti, nonostante in alcuni casi nelle prove a 25°C, i lieviti non sono riusciti a consumare le fonti di C o lo fanno in tempi molto più lunghi (vedi ad esempio il ceppo *L. creatinivorum*), in altri casi si è osservata una buona replicabilità delle prove e maggior costanza nella durata delle cinetiche ad entrambe le temperature di lavoro. E' questo il caso del lievito *N. adeliensis* che su determinati substrati, tra cui il cardo e l'olivo, ha impiegato gli stessi tempi di fermentazione portando a rese comparabili. Questo aspetto potrebbe risultare rilevante ai fini di una possibile applicabilità industriale del processo; infatti la possibilità di crescere a 25° C in modo costante potrebbe rappresentare un vantaggio produttivo riducendo il problema legato ai costi di raffreddamento.

In tabella 5.12 e 5.13 sono invece riportati i risultati relativi alla percentuale di accumulo intesa come %lipidi/PS (lipidi prodotti/peso secco della biomassa), e l'efficienza di conversione di carboidrati in lipidi (%lipidi/[C]). I tre ceppi hanno mostrato percentuali di accumulo lipidico su peso secco piuttosto variabili (da 32.24 a 59.13%). Infatti, ad eccezione del ceppo *S. terricola* che ha mostrato una certa ripetibilità del dato riuscendo a crescere solo in alcuni idrolizzati ed accumulando circa il 50% di lipidi su peso secco, gli altri due ceppi hanno mostrato una grande variabilità in base al tipo di substrato ed alle condizioni di crescita (T°C).

Table 5-12: Percentuale di accumulo lipidico per i diversi substrati idrolizzati

	%lipidi/PS					
	5870 <i>S. terricola</i>		5195 <i>N. adeliensis</i>		4794 <i>L. creatinivorum</i>	
	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
BS11	-	-	56.63 ± 3.97	56.7 ± 2.76	55.1 ± 2.65	-
BS12	54.58 ± 2.01	54.1 ± 3.52	53.24 ± 1.75	59.13 ± 4.88	54.88 ± 2.9	-
OL03	52.55 ± 0.35	-	49.38 ± 0.20	32.24 ± 0.30	51.6 ± 2.5	40.19 ± 0.86
OL12	-	-	44.38 ± 0.61	44.6 ± 1.10	-	-
CA01	-	-	43.24 ± 0.14	43.61 ± 2.21	49.93 ± 0.02	36.29 ± 0.36
CA02	-	-	45.05 ± 3.06	53.56 ± 1.33	43.80 ± 1.60	-

I valori massimi di %lipidi/PS ottenuti sono stati raggiunti da *N. adeliensis* che è stato in grado di accumulare con diversi substrati fino a quasi il 60% del suo peso secco. Ciononostante andando a confrontare questi valori con quelli della tabella 5.9 notiamo come ad una maggior valore di accumulo su peso secco non corrisponda sempre una maggiore resa (g/L) di lipidi prodotta. Basti notare come il ceppo più produttivo in termini di quantità ottenuta sia stato il *L. creatinivorum* su idrolizzato di cardo (10.8 g/L) con una percentuale di accumulo del 43%. A livello industriale, probabilmente, il valore considerato di maggior interesse sarà la quantità assoluta in g/L di lipidi prodotti da ogni ceppo e non la capacità di accumulo.

I valori di accumulo lipidico ottenuti dai ceppi testati permettono di confermare la loro condizione di lieviti oleaginosi in quanto viene sempre superato il valore soglia pari al 20 % (g lipidi/g biomassa) [86]. *S. cerevisiae* è una specie non oleaginosa che pertanto accumula una percentuale di lipidi inferiore al 20%, [87] mentre il comune modello di riferimento di lievito oleaginoso è *Yarrowia lipolytica*, che presenta una resa di accumulo di circa il 50% (%lipidi/PS) su idrolizzati lignocellulosici [88]. Per quanto riguarda gli idrolizzati derivanti dalle potature d'olivo, i risultati raggiunti sono stati sempre inferiori rispetto agli altri tipi di substrati, in particolare il valore della produttività è stato sempre inferiore a 0.75 g/(l*giorno) (Tab. 5.11). Questo è dovuto probabilmente alla presenza di alcuni composti fenolici nella biomassa di partenza che potrebbero inibire l'attività metabolica dei lieviti; alcuni studi hanno infatti individuato negli estratti di legno di olivo alcune molecole ad attività antimicrobica tra cui idrossitirosolo, tirosolo, cicoolivile, acido 7-deossiloganico ed oleuropeina [83, 89]. Le rese di produzione fino ad ora considerate sono chiaramente influenzate dalla quantità di zuccheri di partenza. Pertanto, al fine di normalizzare i dati ottenuti e poter confrontare i vari campioni tra loro, è stata calcolata l'efficienza di conversione di carboidrati in lipidi (Tab. 5.13).

Table 5-13: Efficienza di conversione di carboidrati in lipidi per tutti i campioni

	%lipidi/[C]					
	5870 <i>S. terricola</i>		5195 <i>N. adeliensis</i>		4794 <i>L. creatinivorum</i>	
	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
BS11	-	-	13.91 ± 0.81	16.14 ± 0.96	18.11 ± 0.58	-
BS12	19.73 ± 0.09	15.55 ± 0.94	13.3 ± 0.07	17.0 ± 1.52	19.67 ± 0.88	-
OL03	18.39 ± 0.01	-	14.15 ± 0.27	13.32 ± 0.34	15.38 ± 0.66	13.24 ± 0.01
OL12	-	-	12.12 ± 0.21	13.81 ± 0.25	-	-
CA01	-	-	13.65 ± 0.39	13.59 ± 0.93	23.40 ± 0.38	11.99 ± 0.28
CA02	-	-	13.18 ± 1.65	13.59 ± 0.07	20.22 ± 1.10	-

Osservando le rese di produzione in funzione della concentrazione di carbonio, si nota come il valore massimo raggiunto è stato di circa il 24% per il lievito *L. creatinivorum* utilizzando il cardo come substrato. Questo valore si avvicina al valore del massimo teorico che la letteratura risulta essere del 30 % [90]; infatti

il C presente nel mezzo culturale non viene utilizzato soltanto per la produzione di lipidi, ma anche per la normale biosintesi della cellula di lievito.

5.5.2 Profilo lipidico

Gli oli ottenuti, estratti come descritto nel Cap.4, par. 4.6, sono andati incontro ad analisi gas cromatografica per valutarne il profilo in acidi grassi. Il profilo lipidico degli oli ottenuti nel processo di accumulo è essenziale da valutare per i potenziali utilizzi del prodotto stesso. Infatti, come descritto nella sezione Biodiesel 1.2.3 (Tabella 1.3), la composizione in acidi grassi ha un significativo impatto sulle performance del biodiesel o sugli altri eventuali oleochemicals d'interesse. L'analisi gas cromatografica degli oli estratti è stata eseguita previa transesterificazione degli stessi in ambiente basico. I risultati delle sono mostrati in tabella 5.14 dove sono stati riportati solo gli acidi grassi presenti per una percentuale superiore al 1%. In tutte le prove, gli acidi grassi maggiormente presenti sono risultati il palmitico (C16:0), lo stearico (C18:0), l'oleico (C18:1), il linoleico (C 18:2) ed il linolenico (C 18:3). Con percentuali comprese tra 0.1 e 1%, è stata riscontrata la presenza di caprilico (C10:0), laurico (C12:0), miristico(C14:0), palmitoleico (C16:1), arachidico (C20:0), beenico (C22:0), eurico (C22:1) e lignocericico (C:24).

Table 5-14: Principali acidi grassi riscontrate sui diversi campioni idrolizzato (sono riportati solo i valori > 1%)

Substrato	T°C	C14:0 (%) MIRISTICO	C16:0 (%) PALMITICO	C18:0 (%) STEARICO	C18:1 (%) OLEICO	C18:2 (%) LINOLEICO	C18:3 (%) LINOLENICO
BS11							
4794	20	0	17.77±0.38	3.71±0.58	65.7±1.91	8.3±1.09	2.48±0.14
5195	20	0	26.18±0.87	12.65±1.26	51.83±2.20	9.17±0.11	0
	25	0	24.07±4.38	7.52±1.43	59.42±5.85	8.62±0.07	0
BS12							
4794	20	0.99±0.02	18.04±2.06	3.09±0.32	68.87±2.14	8.19±0.37	0
5195	20	0.18±0.1	11.29±1.94	7.98±1.03	74.13±2.5	4.84±2.0	0
	25	0.21±0.02	6.62±0.6	8.71±0.83	77.61±1.9	6.54±3.31	1.1±0
5870	20	0.2±0.1	23.63±2.40	11.3±1.51	58.6±0.67	3.39±0.57	0.25±0.04
	25	1.09±0.06	29.47±3.92	24.03±1.0	41.12±3.19	3.44±0.14	0.17±0.04
OL03							
4794	20	1.57±0.31	14.76±3.54	4.81±0.55	70.98±5.92	3.65±0.38	2.96±1.24
	25	3.16±0.89	15.74±0.01	8.92±0.55	62.38±2.31	5.66±0.12	1.49±0.17
5195	20	1.69±0.47	15.85±0.44	8.67±0.38	65.23±1.74	5.42±0.21	1.3±0.03
	25	1.98±0.93	13.76±0.7	7.75±0.5	70.29±2.81	3.25±0.18	1.03±0.05
5870	20	1.03±0.1	24.13±0.81	18.7±0.56	51.80±0.5	2.41±0.21	0.90±0.17
OL12							
5195	20	2.71±0.94	14.66±0.38	7.47±0.18	66.92±1.42	4.43±0.24	1.3±0.15
	25	2.11±0.96	11.60±0.77	5.37±0.37	76.53±2.47	2.21±0.21	0.64±0.04
CA01							
4794	20	1.04±0.07	19.14±0.33	3.12±0.02	65.25±0.26	6.50±0.06	2.82±0.01
	25	0.18±0.01	15.75±0.69	6.60±0.61	67.78±0.73	7.62±0.46	0.40±0.07
5195	20	0.20±0.09	13.51±0.43	7.57±0.37	71.50±1.00	4.90±0.49	0.08±0.08
	25	0.15±0.02	13.21±0.06	9.62±0.10	72.14±0.15	3.04±0.03	0.06±0.01
CA02							
4794	20	0.92±0.07	17.96±0.56	2.62±0.11	67.16±0.45	6.96±0.17	2.50±0.12
	20	0.16±0.03	12.50±0.77	7.57±1.07	74.79±0.86	3.24±1.18	0.06±0.06
5195	25	0.23±0.05	14.91±1.27	11.88±0.11	69.33±1.49	2.11±0.07	0
	25	0.21%	15.78%	6.06%	68.01%	8.10%	0.25%

L'oleico (18:1) è l'acido grasso maggiormente presente e la sua presenza nei diversi campioni prodotti varia tra il 41 ed il 76%, in accordo con i dati di letteratura che confermano l'oleico come il principale prodotto del metabolismo di lieviti oleaginosi (40-80% degli acidi grassi prodotti) che crescono in terreni sintetici o su idrolizzati lignocellulosici [25, 62].

In Tabella 5.15 sono riportati invece i valori percentuali di acidi grassi insaturi (%UFA) e saturi (%SFA) ed i diversi indici di insaturazione (UI). Il più alto valore di UI (pari a circa 0.9) è stato riscontrato in *N. adeliensis* su BS12 a 25 °C mentre *S. terricola* ha mostrato il più bassi valori di UI, a causa dell'alta produzione di acido stearico e palmitico (sia su terreno BS12 che su OL06).

Il ceppo *L. creatinivorum* DBVPG 4794 in tutte le prove ha raggiunto una percentuale di acidi grassi insaturi piuttosto alta e mai inferiore al 75%, dimostrandosi un buon candidato per la produzione di bio-oli con un buon grado d'insaturazione. L'interesse verso ceppi che producono acidi grassi insaturi con alte rese è dovuto principalmente alla loro attitudine ad essere utilizzati per la produzione di biopolimeri dato che i doppi legami sono siti di polimerizzazione.

Table 5-15: %UFAs (acidi grassi insaturi), % SFA (acidi grassi saturi) e UI (indice di insaturazione)

Substrato	T°C	% UFA	% SFA	UI
BS11				
4794	20	76.48	21.48	0.8974
5195	20	61	38.83	0.7017
	25	68.04	31.59	0.7666
BS12				
4794	20	77.04	22.12	0.8521
5195	20	78.97	19.45	0.8381
	25	85.25	15.54	0.9399
5870	20	62.24	35.13	0.6613
	25	44.73	54.59	0.4851
OL03				
4794	20	77.59	21.14	0.8716
	25	69.53	27.82	0.7817
5195	20	71.95	26.21	0.7997
	25	74.57	1.98	0.7988
5870	20	55.11	43.86	0.5932
OL12				
5195	20	72.65	24.84	0.7968
	25	79.38	19.08	0.8287
CA01				
4794	20	75.74	23.3	0.8788
	25	75.89	22.53	0.8431
5195	20	76.57	21.28	0.8163
	25	75.3	22.98	0.7846
CA02				
4794	20	77.69	21.5	0.8965
5195	20	78.09	20.23	0.8145
	25	71.44	27.02	0.7355
5870	25	76.36	22.05	0.8496

Per alcuni ceppi (*S. terricola* su BS12, *L. creatinivorum* su OL03, 4794 su CA01) si è osservato un significativo aumento del rapporto acidi grassi insaturi/saturi e dell'indice di insaturazione UI con il variare della

temperatura di lavoro da 25 a 20°C. Questo comportamento, confermato dalla letteratura, può essere spiegato da un cambiamento nel metabolismo lipidico dei microrganismi a temperature più basse, in particolare nei lieviti psicrofili e psicrotolleranti. Il fatto che tale trend non si osserva in tutte le prove può suggerire l'espressione di diversi tipi di enzimi desaturasi durante l'adattamento alle basse temperature da parte di alcuni microrganismi [91].

I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con i profili lipidici dei più comuni oli vegetali tra cui olio d'oliva e di mandorle riportati da Ramos et al. [92], i valori percentuali si sono confermati molto simili.

In figura 5.11 è riportato il confronto di alcuni degli oli prodotti, con il profilo di olio di oliva/mandorla i cui valori in termini di % di acidi grassi sono riportati come linea di base.

Nel riquadro A e B sono raffigurati i confronti tra l'olio prodotto da *N. adeliensis* (DBVPG 5195) a 20 e 25 °C cresciuti su BS12 con olio di oliva ed olio di mandorla rispettivamente. In C e D il confronto tra l'olio prodotto dallo stesso lievito cresciuto su OL12 e paragonato nuovamente a olio di oliva e mandorla. Come si può osservare solo piccole discrepanze sono state riscontrate.

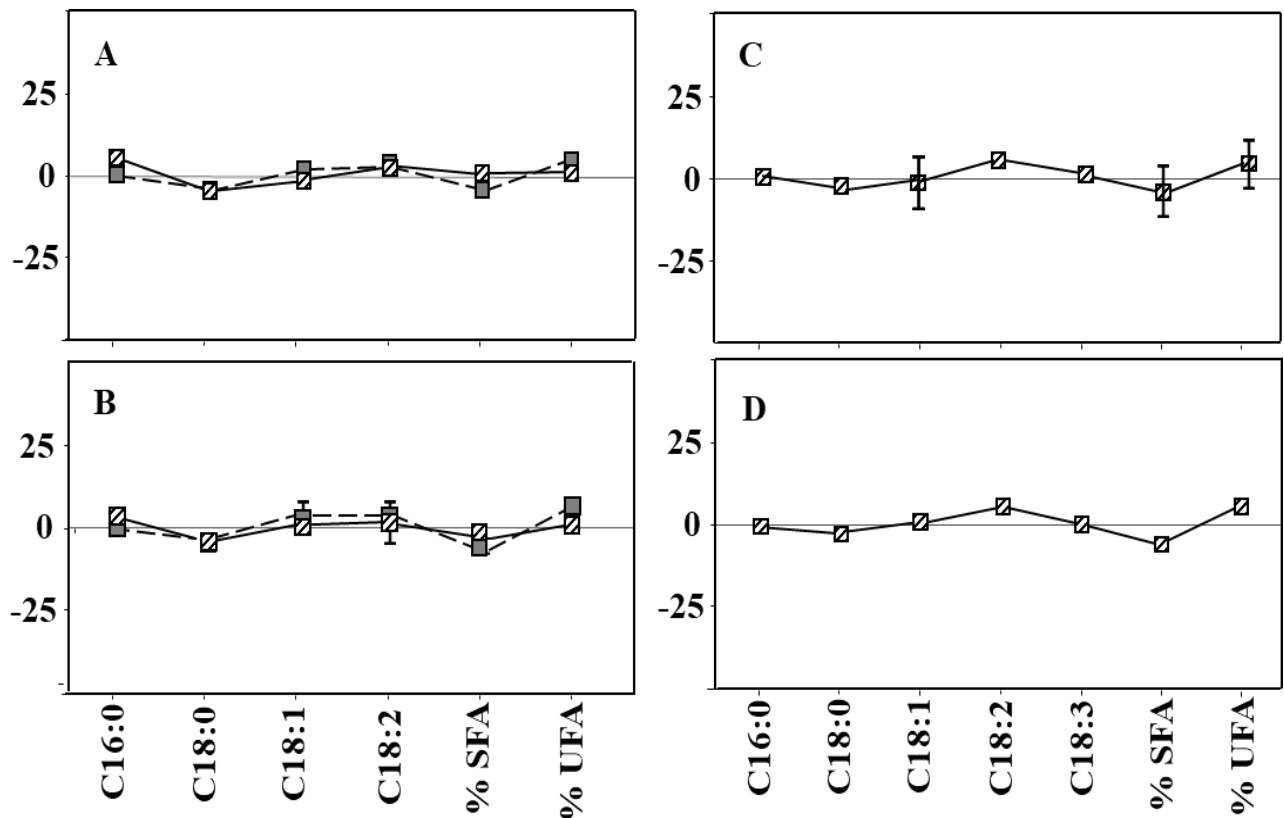


Figure 5-11: Confronto degli oli prodotti dai lieviti oleaginosi con olio di oliva e mandorla

Alla luce dei risultati ottenuti, la possibilità di utilizzare lipidi prodotti da lieviti oleaginosi come sostituti sostenibili degli oli vegetali appare un'opportunità sempre più realistica, anche in vista dell'aumento della richiesta di oleochemicals nel prossimo futuro, che potrebbe determinare una riduzione della disponibilità degli oli vegetali attualmente in uso e di conseguenza un loro aumento di prezzo [93].

5.5.3 Cinetiche in reattore da 5 litri

I due idrolizzati di cardo sono stati utilizzati come substrato per i test di fermentazioni su bioreattore da 5L utilizzando il ceppo *L. creatinivorum* alla temperatura di 20°C; i substrati, il ceppo e le condizioni di lavoro sono stati selezionati per aver fornito le migliori rese nelle prove in beuta.

I parametri di lavoro (pH, agitazione, pO_2) sono stati monitorati costantemente mentre la crescita della biomassa ed il consumo di carboidrati sono stati quantificati con prelievi giornalieri.

In figura 5.12 è mostrato il pannello di controllo della prova di fermentazione di CA1 nel tempo, dove si apprezza l'andamento costante di temperatura (verde), pH (azzurro) e agitazione (blu) e si evidenzia il consumo di ossigeno (rosso) da parte dei microrganismi nel corso della prova.

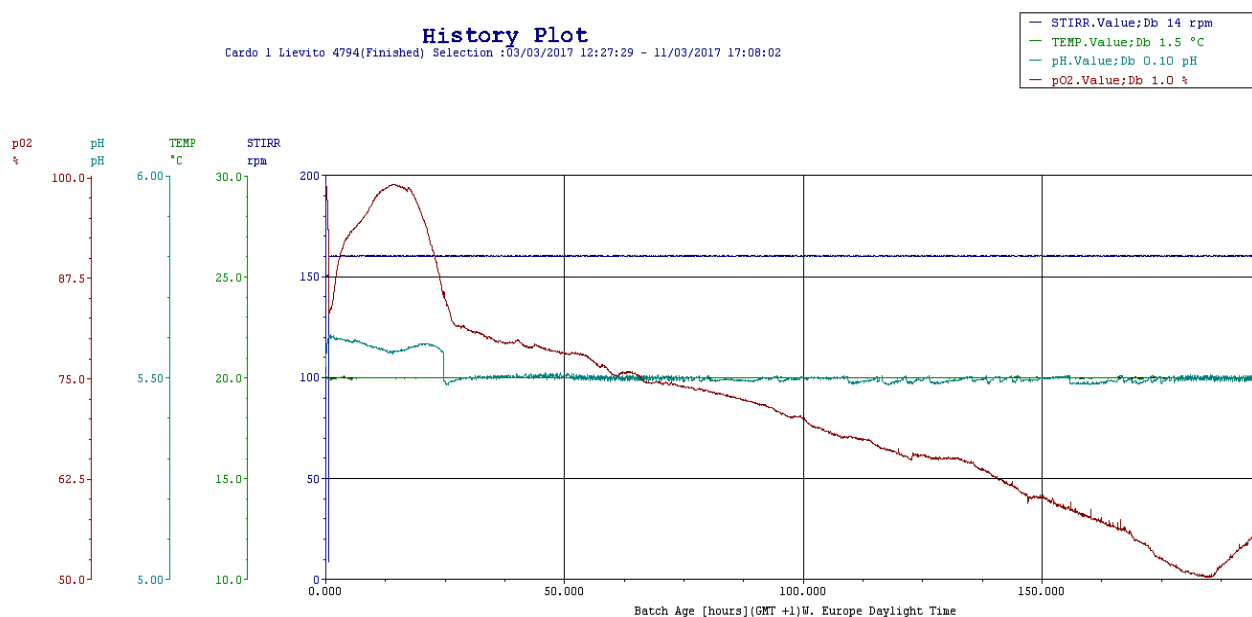


Figure 5-12: Andamento dei parametri monitorati (temperatura, pH, agitazione, pressione parziale di O_2)

La prova di fermentazione con il substrato CA01 è durata 196 ore mentre quella con il substrato CA02, 216 ore. Come già discusso nella sezione 5.5.1 (prove in beuta) la maggiore durata può essere imputata alla maggiore complessità del terreno di crescita ed alla maggiore concentrazione di carboidrati.

L'analisi dei prelievi giornalieri ha permesso di costruire le curve di crescita cellulare (OD) in funzione della concentrazione di C del ceppo *L. creatinivorum* DBVPG 4794 sui due idrolizzati di cardo.

In figura 5.13 è riportato l'andamento di crescita di *L. creatinivorum* su CA01; si può osservare come il campione nelle prime 24 ore successive all'inoculo (tempo 0) abbia una crescita moderata in quanto necessita della fase di adattamento al nuovo terreno colturale. Dalle 24 alle 120 ore si osserva invece la fase di crescita esponenziale dovuta al consumo di N e di C derivante dal glucosio, lasciando inalterata la concentrazione di XG. Dalle 120 alle 144 ore il ceppo inizia ad accumulare lipidi, questo si può osservare dal rallentamento della crescita accompagnata da una nuova fase di consumo di glucosio nel mezzo, contemporaneamente inizia la sintesi di enzimi che serviranno a metabolizzare l'XG.

Dalle 144 alle 192 ore di reazione il glucosio nel mezzo viene totalmente consumato, ed il ceppo inizia ad utilizzare l'XG; si nota infatti come il non appena il ceppo inizia a consumare l'XG proceda con una seconda, seppur contenuta, crescita esponenziale.

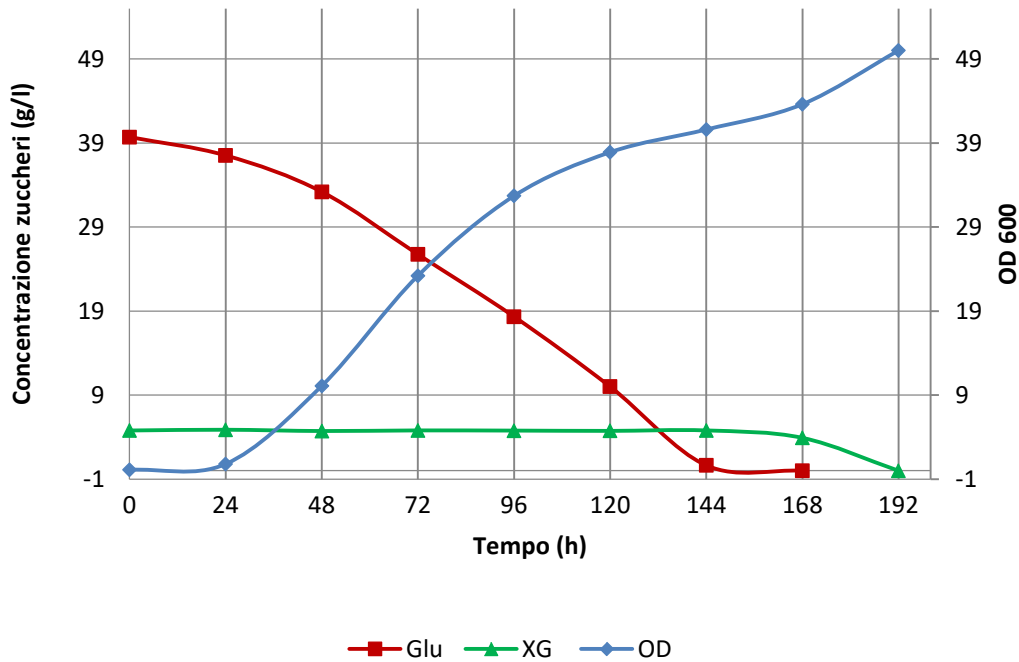


Figure 5-13: Andamento di crescita del ceppo 4794 sul substrato CA01 in funzione dei giorni e della concentrazione di C disponibile

Questa tipologia di crescita è detta diauxica, che prevede l'utilizzo del glucosio come primo zucchero impiegato nella fermentazione. All'esaurimento del glucosio nel terreno di coltura, il lievito inizia infatti a produrre gli enzimi necessari alla metabolizzazione degli altri zuccheri eventualmente presenti [94].

Nel ceppo *L. creatinivorum* DBVPG 4794, la seconda fase esponenziale non è molto accentuata, in quanto la concentrazione di XG nel mezzo non è paragonabile a quella del glucosio, inoltre essendo cresciuti su un terreno sbilanciato, al momento della metabolizzazione dell'XG l'N necessario per sostenere una seconda fase esponenziale non è presente in concentrazione sufficiente.

Nella figura 5.14, dove è mostrato il consumo di carboidrati nel tempo, si apprezza come il picco del glucosio scenda ad ogni prelievo mentre il picco dell'XG resta costante fino alle 120 ore di fermentazione.

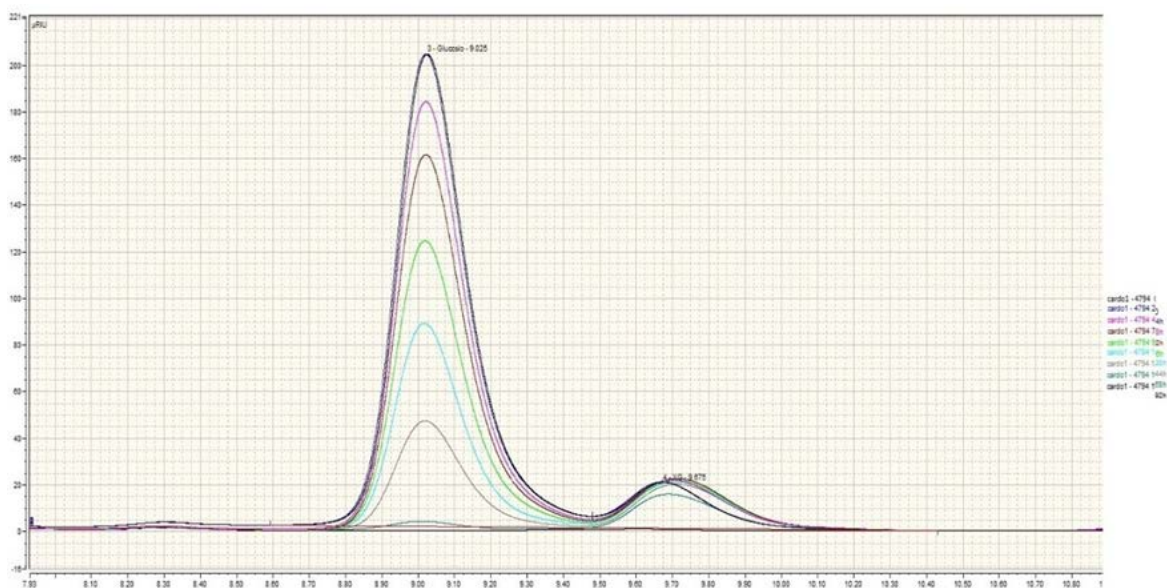


Figure 5-14: Sovrapposizione dei cromatogrammi che mostrano il consumo di carboidrati nel tempo con prelievi effettuati ogni 24 h.

Per la fermentazione del ceppo *L. creatinivorum* DBVPG 4794 sul terreno CA02 (Fig. 5.14), si è ottenuto un andamento molto simile a quello riscontrato nel precedente campione.

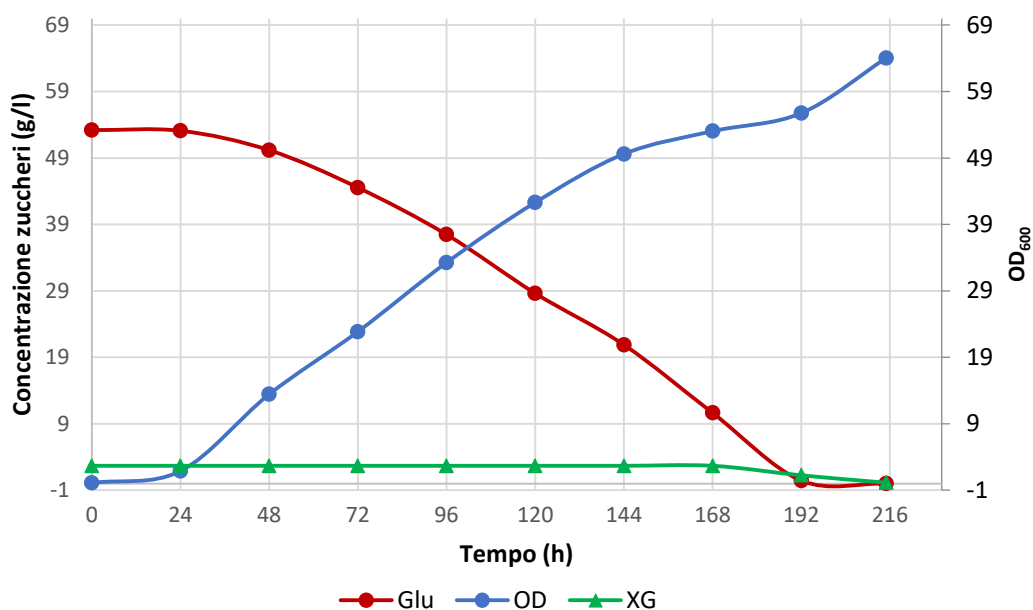


Figure 5-15: Andamento di crescita del ceppo 4794 sul substrato CA02 in funzione dei giorni e della concentrazione di C disponibile.

Anche in questo caso si nota il consumo preferenziale di glucosio nelle prime 168 ore di fermentazione, nello specifico abbiamo 0-24 adattamento al terreno colturale; 24-144 crescita esponenziale 144-168 inizio accumulo 168-192 sintesi degli enzimi per metabolizzare l'XG, 192-216 seconda fase di crescita esponenziale non accentuata per la modesta concentrazione di XG e N nel mezzo colturale.

Al termine delle fermentazioni ed in seguito all'estrazione dei lipidi sono stati determinati gli stessi parametri calcolati per le prove in beuta. I quattro valori ottenuti sulle prove in bioreattore (R) sono mostrati in tabella 5.16, confrontandoli con le rese delle prove in beuta (B):

Table 5-16: Confronto tra i risultati ottenuti nelle prove beuta (B) ed in reattore (R) con il ceppo 4794

	Resa lipidi (g/l)	Lipidi prodotti/C %	Produttività	Lipidi % (w/w)
4794 CA1 20° B	10,4100	21,78%	1,3013	49,93%
4794 CA2 20° B	10,7550	18,45%	1,0755	43,78%
4794 CA1 20° R	9,5067	21,36%	1,1883	50,39%
4794 CA2 20° R	12,34	23,20%	1,3711	54,17%

Osservando la resa in termini di concentrazione di lipidi per litro di terreno, con i due diversi substrati di partenza si nota come gli andamenti in beuta siano paragonabili tra loro (circa 10 g/L su entrambi i substrati), mentre gli andamenti in R presentino una netta variazione; nell'idrolizzato CA2 si sono ottenute infatti rese lipidiche superiori (12 g/L contro i 9 g/L in CA01).

Come commentato precedentemente però una maggior concentrazione lipidica in g/L nel campione 2 rispetto al CA01 è dovuta ad una quantità di substrato carbonioso maggiore. Pertanto per poter confrontare le rese di produzione, in modo tale da non considerare la differente concentrazione zuccherina

nel mezzo, è stata valutata l'efficienza di conversione di carboidrati in lipidi. Questo parametro, come già sottolineato precedentemente, consente un corretto confronto tra le varie prove indipendentemente dalle caratteristiche del substrato utilizzato. Notiamo come per il CA01 la produzione percentuale sia rimasta pressoché invariata passando dal 21,78% in B al 21,36% in R, mentre ha mostrato un leggero aumento in CA02 passando dal 18,48% in B al 23,20% in R.

Se si considera poi il parametro della produttività (g lipidi prodotti/giorni di fermentazione), si osserva come i valori non si discostino molto tra loro; per il terreno CA01 le prove in beuta hanno prodotto più rispetto alle prove in grande, mentre per il terreno CA02 le prove su bioreattore hanno prodotto più rispetto alle prove in beuta. In ogni caso va tenuta in considerazione che i lieviti, in quanto organismi viventi, sono soggetti a fenomeni di adattamento e mutazioni responsabili in alcuni casi di variabilità nei risultati.

Inoltre in tabella 5.15 sono riportati i valori l'accumulo lipidico intracellulare, che sono risultati paragonabili tra loro per l'idrolizzato di cardo pretratto a condizioni più blande CA1, ovvero 49,93% per la fermentazione in B e 50,39% per la fermentazione in R. Al contrario mentre per l'idrolizzato CA2 si è verificato un aumento netto della capacità accumulativa delle cellule, che è passato dal 43,78% al 54,17%.

Confrontando tutti e quattro i parametri per le due prove in R, si può notare come la resa totale, la produttività, l'accumulo, e la produttività percentuale, aumentino nel terreno CA02 derivante dal pretrattamento più severo. Questo comportamento, come già accennato, può essere causato dal diverso grado di destrutturazione del cardo in seguito alla steam, che a sua volta incide sulla quantità di C disponibile in forma di zuccheri semplici dopo la fase di idrolisi enzimatica.

Le piccole differenze di rese ottenute tra le prove in beuta (B) ed in bioreattore (R) dei vari terreni utilizzati, sono presumibilmente imputabili ai meccanismi di controllo attuati durante la fermentazione. Nel reattore vi è infatti un costante monitoraggio ad aggiustamento dei parametri pH, temperatura, agitazione ed areazione, parametri non controllabili nelle cinetiche in beuta.

L'immagine 5.15 è relativa all'olio ottenuto estratto dalla prova in Bioreattore di Cardo 1 con ceppo *L. creatinivorum*.



Figure 5-16: Campione di olio estratto dalla prova in Bioreattore prima (a) e dopo esterificazione (b)

Dopo la fase di estrazione dei lipidi dalle cellule di lievito, è stata eseguita anche in questo caso l'analisi gas cromatografica dei campioni per determinarne il profilo lipidico. I risultati medi ottenuti sono mostrati in Figura 5.17 ed in Tabella 5.17, dove sono riportati anche i valori percentuali degli acidi grassi ottenuti nella prove di fermentazione in beuta per poter effettuare un confronto.

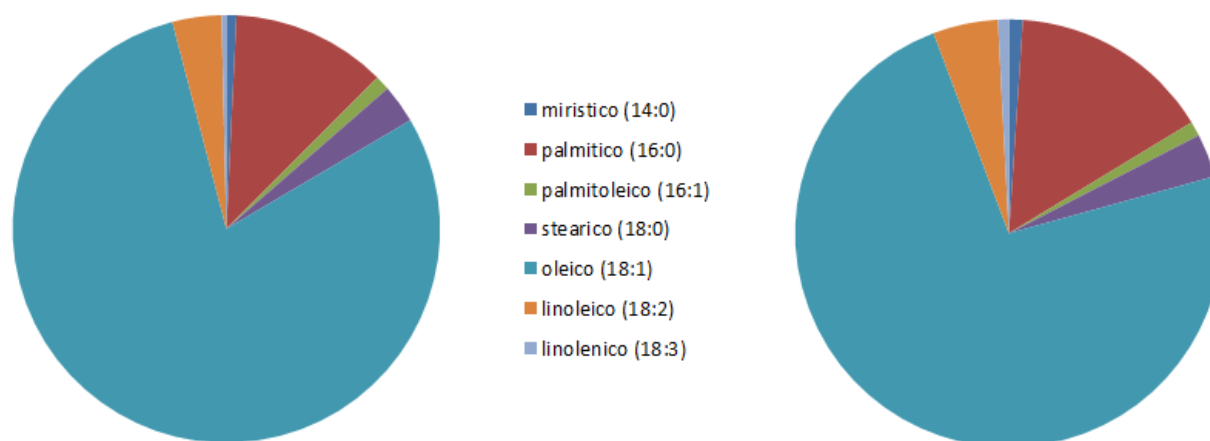


Figure 5-17: I principali acidi grassi riscontrati nelle prove effettuate nel bioreattore con CA01 (a) e CA02 (b)

L'acido oleico si conferma quello maggiormente presente con una percentuale che ha raggiunto, con CA02, quasi l'80% del totale. Tale valore è indice di buona qualità dell'olio nel caso si volesse utilizzare per la transesterificazione a biodiesel; il valore massimo ottenuto con lo stesso ceppo di lievito utilizzando un terreno sintetico era risultato essere pari a circa il 70% [62].

Table 5-17: Profilo lipidico dei lipidi ottenuti dalla biomassa di cardo su bioreattore (R) e relativo confronto con le prove in beuta (B)

<i>L. creatinivorum</i> 4794 – 20°C				
FAME	CA01 (R)	CA02 (R)	CA01 (B)	CA02 (B)
caprilico (8:0)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
caprico (10:0)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
laurico (12:0)	0.03%	0.03%	0.02%	0.04%
miristico (14:0)	1.04%	0.75%	1.04%	0.92%
palmitico (16:0)	15.16%	11.60%	19.14%	17.96%
palmitoleico (16:1)	1.10%	1.10%	1.17%	1.07%
stearico (18:0)	3.25%	2.88%	3.12%	2.62%
oleico (18:1)	72.98%	78.47%	65.25%	67.16%
linoleico (18:2)	4.88%	3.67%	6.50%	6.96%
arachidico (20:0)	0.81%	0.35%	2.82%	2.50%
linolenico (18:3)	0.34%	0.44%	0.49%	0.31%
beenato (22:0)	0.32%	0.46%	0.35%	0.32%
eurico (22:1)	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%
lignocerico (24:0)	0.09%	0.23%	0.11%	0.13%

Come si può osservare infatti, nelle prove su bioreattore, aumenta la percentuale di acido oleico che passa dal 65% a circa il 78% a discapito principalmente di palmitico e linoleico. Svolgere le prove di accumulo all'interno di un bioreattore permette di mantenere le condizioni ottimali di pH, temperatura e soprattutto areazione per tutta la durata della cinetica. Nelle prove in beuta, dove invece non avviene un continuo monitoraggio di questi parametri, si può verificare un innalzamento del pH nel terreno a seguito del metabolismo microbico e, soprattutto, una drastica diminuzione della pO_2 dopo le prime fasi metaboliche, che potrebbe contribuire a rallentare l'attività dei lieviti e modificare la loro produttività.

5.6 SINTESI DEI RISULTATI

In questo lavoro si è sperimentata l'attitudine di idrolizzati derivanti da biomasse lignocellulosiche a fungere da substrati per la produzione di molecole ad alto valore aggiunto all'interno di moderne bioraffinerie.

Le biomasse selezionate per la sperimentazione sono state biomasse spiaggiate, potature di olivo e cardo selvatico. Le prime due sono definite biomasse residuali con un'abbondante disponibilità annuale nel nostro paese che comportano costi di gestione e smaltimento da parte di comuni e produttori; il cardo invece è una pianta infestante che cresce con scarse necessità nutritive e di acqua ed in terreni non destinati all'agricoltura.

Tutte le biomasse hanno subito un processo di trasformazione che prevedeva pretrattamento, idrolisi enzimatica e fermentazione da parte di microrganismi al fine di ottenere etanolo e lipidi per l'eventuale produzione di biocarburanti.

La caratterizzazione iniziale delle biomasse di partenza ha permesso di conoscere la composizione di ognuna di esse per poter valutarne le percentuali di cellulosa, polimero del glucosio che fungerà da fonte di carbonio d'elezione per i microrganismi, ed emicellulosa fonte di zuccheri secondari tra cui xilosio. Inoltre l'analisi della composizione delle biomasse lignocellulosiche ha permesso di quantificare le percentuali delle componenti che potrebbero inibire i processi di trasformazione tra cui lignina ed estrattivi.

I valori di cellulosa, in tutti e tre i casi, si sono attestati intorno al 30%; valori simili o appena inferiori a quelli di altre biomasse lignocellulosiche già sperimentate nelle "sugar platforms".

Per quanto riguarda il **pretrattamento** è stata verificata la validità e la riproducibilità dell'equazione empirica che descrive il fattore di severità del pretrattamento (R_0) e sono state trovate le condizioni ideali di pretrattamento, volto ad incrementare la resa destrutturazione delle tre biomasse testate. I valori di severità selezionati, dopo un precedente screening, si sono dimostrati in grado di destrutturare la biomassa per favorirne un'adeguata accessibilità all'azione degli enzimi cellulolitici ed al contempo al recupero di una buona quantità di materiale (da un minimo di circa 55% ad un massimo del 77%).

Le rese di **idrolisi enzimatica**, intese come grammi di glucosio prodotto su cellulosa in input, si sono attestate tra il 45 ed il 67%. I valori maggiori si sono ottenuti per le biomasse trattate con valori di $\text{Log}R_0$ più alti. Si è confermato dunque come il grado di severità influenzi la fase di idrolisi rendendo le fibre più accessibili agli enzimi; ciononostante un pretrattamento troppo severo può causare un recupero inferiore di materiale solido nonché una perdita di componenti fermentabili che andranno a trasformarsi in molecole inibitorie. Inoltre lavorare a condizioni di Steam Explosion molto spinte causa un inevitabile aumento dei costi energetici di pretrattamento. Una ulteriore considerazione riguarda l'attuale costo degli enzimi che rappresenta uno step fortemente limitante per l'efficienza economica del processo. A tale scopo una buona soluzione è quella di adottare il cosiddetto schema CBP (Consolidated Bioprocessing) che si basa sull'efficace integrazione in un unico fermentatore dei processi biologici richiesti per la conversione del materiale lignocellulosico. Gli enzimi, anziché essere acquistati, possono infatti essere prodotti nel bioreattore da specifici microrganismi per poi essere utilizzati nelle fasi successive.

Riguardo alla **produzione di bioetanolo** a partire da biomasse lignocellulosiche, il cui processo è ormai maturo e consolidato, buoni risultati sono stati raggiunti per tutte le biomasse. L'utilizzo della SSF ha consentito di ridurre i tempi di trattamento da 96 a 48 ore, ottimizzando ancora il consumo energetico complessivo, i tempi di ottenimento dell'etanolo e di conseguenza i costi della fase di produzione.

I risultati migliori sono stati ottenuti dalla biomassa di cardo la quale ha permesso di ottenere rese superiori a 130 grammi circa di etanolo su Kg di materia prima pari a circa un 50% del massimo ottenibile. Buoni

valori sono stati raggiunti anche con le biomasse spiaggiate. Queste ultime sono classificate come rifiuti e che come tali vanno smaltiti, la produzione di 90 grammi di etanolo ogni Kg di biomasse spiaggiate può essere considerata un modo efficace di valorizzare questi residui lignocellulosici. I Comuni potrebbero potenzialmente ricavare 50-100 € ogni tonnellata di biomasse spiaggiate, riducendo così i costi di gestione legati a questi residui.

Per quanto riguarda le potature d'olivo la grande disponibilità di questa materia prima in un paese come l'Italia ne rende senz'altro interessante una valorizzazione energetica. In ogni caso la trasformazione biochimica di tale biomassa potrebbe risultare in alcuni casi problematica data l'alta concentrazione di polifenoli in tale biomasse che inibiscono l'attività dei microrganismi. Ciò è stato confermato dalle rese di produzione di bioetanolo ottenute (circa 8-9% su materiale in input), non paragonabili a quelle ottenibili da altre biomasse lignocellulosiche. Per ovviare a questo problema la biomassa può andare incontro a processi di detossificazione da sostanze inibenti al fine di migliorare le rese [84].

Per quanto riguarda la **produzione di lipidi** è stato dimostrato come dei tre ceppi precedentemente selezionati dallo studio di Filippucci et al [62], solo due hanno dimostrato capacità accumulative (20% lipidi su peso secco [86]), utilizzando terreni provenienti da biomasse lignocellulosiche pretrattate ed idrolizzate. Il ceppo *S. terricola* infatti non ha dimostrato capacità di crescere ed accumulare lipidi nei substrati testati se non in uno di essi. I due ceppi microbici che hanno dato le migliori prestazioni sono stati il *L. creatinivorum* DPVPG 4794 ed il *N. adeliensis*. Quest'ultimo è risultato essere il ceppo più versatile cioè in grado di crescere su tutti i substrati sia a 20 che a 25 °C, nonostante abbia mostrato rese di accumulo lipidico più basse di *L. creatinivorum* che ha accumulato nelle prove in beuta fino a circa 10 g/L di lipidi utilizzando idrolizzato di cardo. Il fatto che a tale valore è corrisposta una percentuale di accumulo su peso secco inferiore rispetto a valori raggiunti con *N. adeliensis* sta a significare che questo ceppo è stato in grado di accumulare più biomassa che al termine della cinetica si è tradotto comunque in un quantitativo maggiore del prodotto desiderato.

In base a questi risultati il ceppo *L. creatinivorum* è stato selezionato per effettuare prove di accumulo nel bioreattore da 5L a 20°. Le prove sono state effettuate a 20° C (optimum di crescita) utilizzando come substrato il cardo pretrattato ad entrambi i valori di LogR₀.

Dalle prove effettuate su bioreattore è risultato che il lievito ha ottenuto una produzione leggermente superiore rispetto alle prove in beuta, sia per il substrato CA01 che CA02. Si è passati infatti a rese percentuali di accumulo lipidico su peso secco di biomassa pari a 50,39% per il CA01 (contro il 49,93% delle prove in beuta), e al 54,17% del CA02 (contro il 43,78% delle prove in beuta). Questo potrebbe essere dovuto al maggior grado di controllo delle prove all'interno del bioreattore, dove tutti i parametri necessari a mantenere le condizioni di optimum per l'accumulo lipidico sono monitorati in continuo. Tali dati provano inoltre come il terreno prodotto dal pretrattamento più severo si sia rivelato più adatto in entrambi i casi a sostenere la crescita ed accumulo da parte dei ceppi microbici, potendo ricavare durante l'idrolisi enzimatica una quantità di zuccheri superiore rispetto al terreno derivante dal pretrattamento più blando. L'utilizzo del terreno ottenuto dal pretrattamento più severo ha permesso infatti una percentuale d'accumulo superiore rispetto alla prova in beuta, fornendo una resa di produzione lipidica pari a 12,34 g/l contro i 10,75 g/l delle prove in piccolo.

Inoltre i lieviti utilizzati hanno dimostrato capacità a crescere e accumulare lipidi su un terreno complesso dove oltre alla presenza di zuccheri sono presenti inibitori tra i quali acido acetico, furfurale ed HMF.

Altre considerazioni rilevanti riguardano l'analisi dei profili lipidici degli oli estratti dal metabolismo microbico sia in riferimento alle prove in beuta che a quelle su bioreattore. Come prima cosa si è confermata l'attitudine di questi lieviti a fornire un olio ricco in acido oleico al primo posto ed a seguire in acido palmitico, stearico e linoleico che sono gli esteri metilici più presenti nelle miscele di

transesterificazione [13]. Inoltre i profili lipidici delle prove effettuate su bioreattore si sono mostrate in grado di fornire profili lipidici ancor più ricchi in acido oleico a dimostrazione del fatto che le condizioni di crescita ed accumulo controllate (di temperatura, pH ed ossigenazione) permettono di mantenere a livello ottimale l'attività metabolica dei lieviti selezionati.

I lieviti hanno dimostrato pertanto di poter produrre lipidi con una composizione in termini di acidi grassi molto simile a quella dei più comuni oli vegetali, tra cui, come dimostrato in questo lavoro, anche a quello di olio di mandorle e d'oliva. A questo riguardo si potrebbe pensare di ottenere, dal metabolismo di questi lieviti, degli oli simili a quello di palma. A livello globale, l'olio di palma è l'olio vegetale più largamente utilizzato data la sua enorme versatilità. Esso è impiegato infatti nell'industria alimentare, in quella cosmetica, chimica per la produzione di lubrificanti, candele, dentifrici etc., oltre che come sostituto del gasolio [95]. Insieme alla crescente domanda stanno aumentando quindi anche le problematiche legate alla coltivazione estensiva della palma (deforestazione, perdita della biodiversità) [96]. In questo scenario, la possibilità di rimpiazzare l'olio di palma con lipidi prodotti da lieviti oleaginosi potrebbe essere visto come un modo per mitigare i problemi sopracitati.

La nota negativa riguarda il fatto che la produzione di Biodiesel attraverso l'utilizzo di microrganismi con i suoi elevati costi di produzione non è al momento una tecnologia matura per raggiungere il mercato. Infatti oltre al ceppo da utilizzare ed al processo di fermentazione anche altri fattori vanno considerati per una completa analisi dei costi tra cui il costo di ottenimento dell'idrolizzato (pretrattamento ed idrolisi enzimatica) ed il processo di transesterificazione dei triacilgliceroli per produrre biodiesel [25]. Le fasi di processamento della biomassa lignocellulosica stanno subendo riduzioni nei costi in quanto tecnologie ormai mature; ma affinché il processo possa essere considerato sostenibile, si deve pensare ad una valorizzazione di più coprodotti del metabolismo microbico, come vitamine, pigmenti o proteine.

SPERIMENTAZIONE BIOCHEMICALS:

ESTRAZIONE DI COLORANTI DA SPECIE VEGETALI AUTOCTONE

Capitolo 6 : BIOCHEMICALS

6.1 GREEN CHEMISTRY E BIOBASED PRODUCTS

L'espressione "green chemistry" fu introdotta nel 1991 da Paul T. Anastas (docente presso la Yale University e, dal 2009, direttore dell'Office of research and development della Environmental protection agency), il quale, insieme a John C. Warner, sintetizzò in 12 principi basilari l'impostazione della chimica verde. La Green Chemistry punta ad indirizzare l'attuale l'approccio all'industria chimica su percorsi innovativi e di sostenibilità. Lo sviluppo sostenibile, elemento essenziale per il progresso tecnologico nel nuovo secolo, impone infatti alle scienze chimiche di giocare un ruolo primario nella riconversione di vecchie tecnologie in nuovi processi puliti e nella progettazione di nuovi prodotti e nuovi processi eco-compatibili.

L'industria chimica, che ha avuto un ruolo centrale nell'economia mondiale per gran parte del XX sec si trova ora a dover gestire una enorme pressione nel dover convertire, in praticamente tutti gli aspetti, il suo modo di operare [97]. La maggior parte dei prodotti attualmente utilizzati nell'industria chimica sono infatti di origine fossile, derivanti dalla raffinazione di petrolio o gas naturale.

Negli ultimi anni si è assistito ad una vera e propria rivoluzione relativamente alla legislazione riguardante i processi di trasformazione chimica [98]. Questo è stato in parte una reazione al crescente numero di disastri ambientali come quello di Bhopal nel 1984 e, di conseguenza, all'enorme attenzione delle NGO³ e dei media su queste industrie ed i relativi impatti ambientali. Inoltre, maggiore attenzione è stata data al fatto che i processi di produzione comportano ingenti costi sia a livello energetico che di smaltimento, che incidono sul prezzo dei prodotti finali.

Si sta rafforzando la consapevolezza verso problematiche d'impatto ambientale e sulla salute umana legate all'industria manifatturiera ed allo stesso tempo all'incremento, da parte dei consumatori finali, alla ricerca di biomateriali in grado di offrire maggiori garanzie di salubrità rispetto a quelli di derivazione petrolchimica.

Ciò ha portato inevitabilmente alla ricerca, da parte del mondo scientifico, di nuove materie prime in alternativa alle fonti fossili, da utilizzare come fonti sostenibili ed a lungo-termine nell'industria chimica e di processi di trasformazione ed utilizzo meno impattanti.

Mentre nel settore delle bioenergie sono già presenti valide alternative alle risorse fossili (dal solare, all'eolico, all'idroelettrico), minori sono ad oggi gli avanzamenti nel campo della chimica per la rimpiazzo di prodotti di derivazione fossile con sostituti derivanti da fonti rinnovabili.

Le biomasse sono gli unici materiali ricchi in carbonio disponibili sulla Terra per la produzione di biochemicals [99]. La possibilità di utilizzare biomasse per produrre sostanze chimiche di base in parziale sostituzione delle tradizionali materie prime di origine fossile della petrolchimica, risulta un argomento molto stimolante nell'ambito della chimica verde sia per gli elevati e crescenti costi del petrolio, sia per le caratteristiche che le biomasse offrono in termini di ridotto impatto ambientale e nella semplificazione dei processi produttivi e nel rinvigorire le comunità rurali. Questa possibilità si aggiunge all'ormai consolidato ruolo della chimica nella produzione di biocarburanti e di biomateriali.

La composizione delle biomasse è meno omogenea rispetto al petrolio. Come accennato la quantità di componenti può cambiare a seconda del materiale di partenza e la composizione elementare è una miscela di C, H, and O (più altri componenti minori come N, S, ed alcuni composti minerali). Sono pertanto moltissimi i prodotti ottenibili all'interno delle moderne piattaforme definite bioraffinerie.

³ NGO= non-governmental organizations

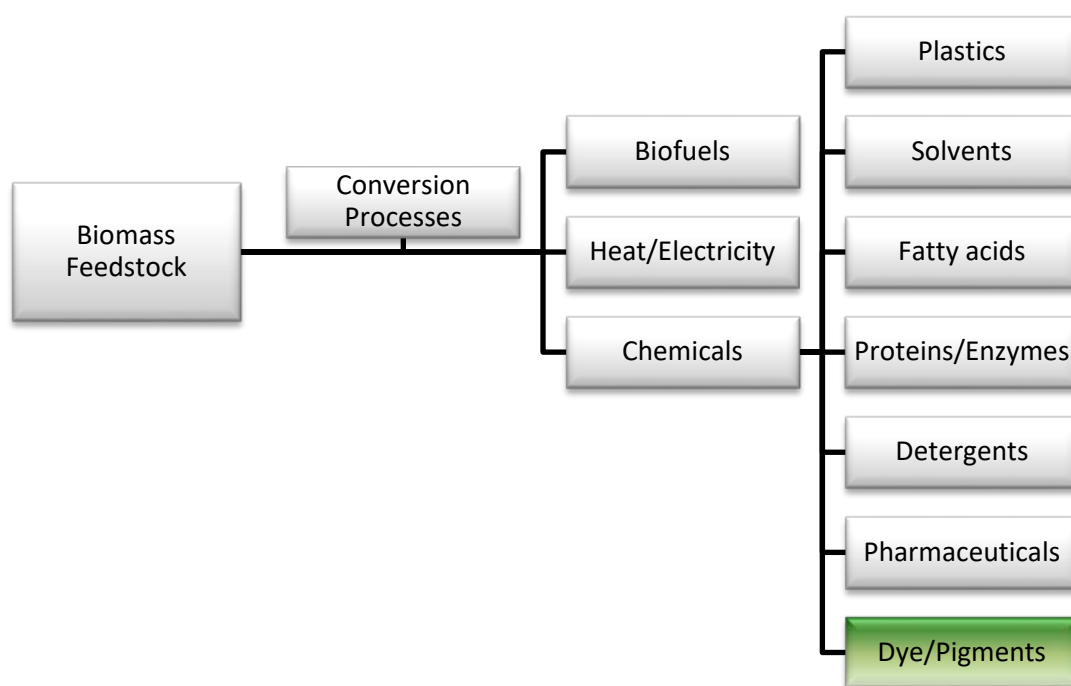


Figure 6-1: Bioraffineria integrata e prodotti ottenibili (tra cui pigmenti naturali)

Risulta essenziale utilizzare tecnologie di trasformazione green ed applicare i principi della green chemistry all'interno della bioraffineria stessa in modo tale da minimizzare l'impatto ambientale dei suoi prodotti. Ad esempio i prodotti chimici devono essere estratti utilizzando solventi green o tecniche poco impattanti ed i cosiddetti bulk materials (come cellulosa e lignina) devono essere frazionati per mezzo di processi di idrolisi, fermentazione etc.

Come mostrato in figura 6.1 tra i bioprodotto ottenibili ci sono anche coloranti e/o pigmenti di natura organica.

6.2 COLORANTI NATURALI

La profonda crisi che sta attraversando l'industria dei coloranti sintetici nei diversi settori d'impiego, ha portato alla riscoperta di sostituti naturali in grado di minimizzare l'impatto sulla salute e quello ambientale causato dal loro utilizzo.

Oggigiorno, un consumatore sempre più attento alle tematiche che conciliano salute ed ambiente è alla ricerca di prodotti naturali; i coloranti estratti dalle piante, grazie al loro vasto campo d'applicazione, dal settore alimentare a quello tessile, cosmetico e farmaceutico, possono interessare una buona fetta di mercato.

I coloranti naturali sono considerati eco-friendly in quanto rinnovabili e biodegradabili, "skin friendly" e in grado di dare maggiori sicurezze, in termini di salute, al consumatore finale [100].

Esistono più di 10000 colori disponibili in commercio e circa 700.000 tonnellate di coloranti sono prodotte ogni anno. Essi possono essere di diversa natura, acidi, basici, dispersi, azotati, antrachinonici o complessi metallici [101]

L'industria tessile è al primo posto per il consumo di coloranti; durante i processi di colorazione una buona percentuale di colorante (circa 10-15%), non legandosi al materiale da tingere, viene perso nelle acque di scarico causando un forte impatto ambientale. Gli effluenti delle industrie tessili portano quindi con se una

grande quantità di coloranti e di altri additivi utilizzati nelle fasi del processo di tintura che sono difficili da rimuovere con i trattamenti convenzionali delle acque e possono pertanto essere trasportati facilmente attraverso le fognature ed i fiumi grazie alla loro elevata solubilità in acqua. Inoltre queste sostanze possono andare incontro a degradazione formando prodotti altamente tossici o addirittura cancerogeni diventando un pericolo per gli organismi viventi. [102].

L'utilizzo di coloranti naturali, rispetto ai coloranti di sintesi, porta in sé diversi vantaggi. Tra questi troviamo la diminuzione delle risorse non rinnovabili (come petrolio e derivati) e l'eliminazione quasi completa della tossicità sia nella fase di produzione che in quella di vendita. Per quanto concerne la prima fase, i rischi per gli operatori nella movimentazione di quantitativi elevati di sostanze chimiche altamente tossiche, come ad esempio anilina ed ammoniaca, è totalmente ridotto. Mentre la seconda fase, quella di vendita, ha visto dei cambiamenti più che apprezzabili nella documentazione delle allergie, come la dermatite da contatto (DAC), una patologia caratterizzata da un processo infiammatorio che interessa la cute, determinata dall'azione per contatto di vari agenti ambientali tra cui i coloranti di sintesi.

Inoltre, considerando anche la crisi economica attraversata dai principali distretti industriali del tessile e dell'abbigliamento in Italia, unitamente alla necessità di fornire prodotti innovativi ed ecocompatibili, lo sviluppo di una filiera in grado di produrre pigmenti di origine vegetale ed altri prodotti ad alto valore aggiunto può essere vista anche come un'opportunità di sviluppo rurale. L'agricoltura infatti, assumerebbe in questo modo molteplici funzioni che vanno dalla salvaguardia delle caratteristiche e della tipicità di un determinato territorio e della sua comunità, alla tutela del paesaggio e dell'ambiente. Questo porterebbe anche a dei vantaggi agronomici attraverso la diversificazione delle produzioni e l'inserimento di colture caratterizzate da limitate esigenze colturali inseribili anche in sistemi di agricoltura biologica, portando dunque alla possibilità di sviluppo per le imprese.

Ci sono una serie di motivi per cui l'utilizzo di coloranti naturali è riservato solo a specifiche nicchie di mercato. Per prima cosa va considerato il fatto che la richiesta di colorante nelle industrie è altissima; più di 0.7 milioni di tonnellate di coloranti sintetici sono prodotti ogni anno in tutto il mondo [103]. Sopperire alle richieste di mercato con specie coloranti di origine vegetali è pertanto impensabile anche in virtù del fatto che i terreni disponibili devono essere destinati primariamente all'agricoltura food. Pensare quindi ad una vera e propria conversione da pigmenti di sintesi a coloranti naturali risulta pertanto non sostenibile. Inoltre a livello industriale risulta problematico il fatto di non poter assicurare lo stesso identico colore (o lotto) di anno in anno; il fatto che una specie colorante in quanto naturale, sia soggetta a stagionalità renderà da una parte il prodotto unico ma dall'altra difficilmente riottenibile in maniera identica. Il crescente interesse verso i coloranti naturali ha pertanto messo in evidenza nuove problematiche quali la massimizzazione delle rese del processo estrattivo, la riproducibilità del colore stesso, nonché i problemi legati alla gestione degli scarti. Le componenti della pianta non indirizzate all'estrazioni di pigmenti potrebbero infatti andare incontro a trasformazioni di tipo chimico al fine di ottenere prodotti ad alto valore aggiunto.

Si stima che, almeno in Europa, siano circa 100 le specie vegetali, presenti in quasi tutti gli ordini e in numerose famiglie botaniche in grado di fornire coloranti naturali [104]. Alcune di esse in particolare si distinguono per la buona adattabilità ad un ampio range di condizioni climatiche, elevate potenzialità produttive ed un più facile inserimento nei tradizionali ordinamenti colturali (Angelini, 2008; Vetter et al., 1999). Tra le specie di importanza storica troviamo l'indigofera (*Indigofera tinctoria* L.) e il guado (*Isatis tinctoria* L.) per il blu-indaco, la reseda (*Reseda luteola* L.), la ginestra dei tintori (*Genista tinctoria* L.), il cartamo (*Carthamus tinctorius* L.), la camomilla dei tintori (*Anthemis tinctoria* L.) per il colore giallo, lo Scotano (*Cotinus Coggygia* L.) per il giallo-bruno ed il marrone ed infine la robbia (*Rubia tinctorum* L.), in grado di fornire il rosso.

Le linee di sviluppo più recenti della Politica Agricola Comunitaria attribuiscono grande importanza alla reintroduzione di colture ritenute marginali, rispetto ai sistemi culturali ordinari, ed in grado di attivare filiere agroindustriali sostenibili nel settore della “chimica verde”. Grazie al vasto campo d'applicazione, dal settore alimentare all'industria dei polimeri, l'attivazione di filiere agro industriali nel settore dei pigmenti naturali potrebbe essere determinante per un aumento del reddito delle aziende agricole permettendo una loro ricollocazione ad un livello più elevato rispetto alle imprese tradizionali.

6.3 SPECIE VEGETALI DA GIALLO PER L'ESTRAZIONE DI COLORANTI

I colori da giallo hanno da sempre avuto una larga diffusione in quanto sono capaci di fornire intense e resistenti colorazioni con innumerevoli tonalità. Il colore giallo si può ottenere da più composti di diversa classe chimica e con diversa struttura e proprietà. Occorre quindi distinguere tra le piante che forniscono colorazioni in giallo grazie alla presenza dei carotenoidi, quelle che le forniscono tramite flavonoidi ed infine quelle che le forniscono tramite tannini.

Le piante da giallo che appartengono alla categoria dei carotenoidi forniscono dei colori molto vivaci che possiedono una forte capacità tintoriale anche se non sono stabili. La capacità colorante deriva appunto dalla presenza di carotenoidi (caroteni e xantofille), sono pigmenti liposolubili che determinano il colore, con molteplici sfumature dal giallo al rosso localizzati nei cromoplasti e, insieme alle clorofille, nei cloroplasti delle cellule vegetali.

I flavonoidi sono molecole largamente diffuse nel regno vegetale e sono localizzati nei fiori, nelle foglie, nei frutti, nelle radici, nelle cortecce delle piante. Si trovano all'interno dei vacuoli cellulari e vengono riconosciuti come i più diffusi antiossidanti naturali. Sono costituiti (Fig. 6.2) da 15 atomi di carbonio con due anelli aromatici A e B e un anello eterociclico C contenente ossigeno.

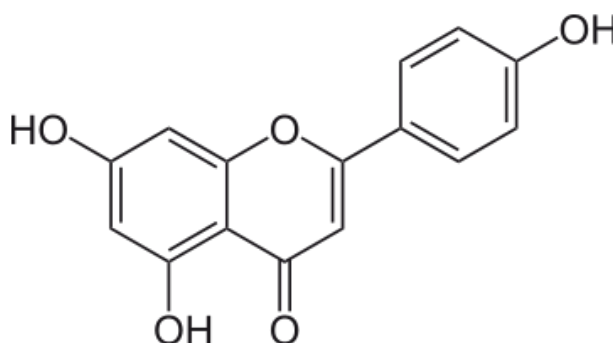


Figure 6-2: Struttura chimica di un flavonoide

I tannini sono dei composti presenti in tutte le piante in quantità diversa da specie a specie ma sono molto diffusi nelle cellule vegetali morte. Questi composti non sono un'ulteriore famiglia di composti fenolici, ma sono comunque una combinazione di vari tipi di queste sostanze fra loro. Dal punto di vista chimico, i tannini sono delle molecole relativamente voluminose che derivano appunto dalla polimerizzazione di molecole monomeriche contenenti funzioni fenoliche.

Il nome tannini venne introdotto dal XVIII secolo per indicare composti usati per la concia delle pelli degli animali. Vengono solitamente utilizzati come veri e propri mordenti delle fibre vegetali. Si distinguono in due gruppi principali: tannini condensati o catechinici e tannini idrolizzati o pirogallici. Questi ultimi si dividono in giallotannini, dalla cui idrolisi si ottiene zucchero e acido gallico, e ellagitannini, che danno zucchero, acido gallico e acido ellagico.

6.3.1 *Reseda luteola* L.



Figure 6-3: *Reseda luteola* L.

La reseda (Fig.6.3) è una pianta che cresce spontanea su sentieri, luoghi incolti, preferibilmente su terreni calcarei. Appartiene alla famiglia delle Resedaceae ed è una pianta a ciclo biennale o perenne. E' costituita da un fusto eretto, alto da 30 a 150 cm semplice e ramoso nella parte superiore. Le foglie si presentano a partire dal primo anno di vita della pianta e possono essere lineari, ondulate, picchiate e profondamente frastagliate e si possono presentare anche aderenti al terreno. I fiori sono di colore giallo con dei pedicelli e si presentano sotto la forma di capsule oblunghe. La pianta è diffusa in tutto il terreno italiano, originaria probabilmente dell'area Mediterranea, e in gran parte dell'Europa.

La pianta può essere coltivata in file distanti 15-30 cm. La semina può essere autunnale o primaverile e il momento ottimale per la raccolta dell'intera pianta è alla fine della fioritura, al secondo anno dell'impianto, quando i frutti sono giunti a maturazione e il pigmento è più abbondante. Il suo periodo di fioritura va da maggio a settembre.

L'utilizzo del pigmento delle Reseda è tra i più antichi e diffusi metodi di tintura in tutta Europa data la sua facilità di reperimento e la sua economicità. Si è da sempre rivelata come un'ottima rivale dei coloranti sintetici anche per la sua resa ed il suo colore giallo intenso.

La colorazione in giallo è conferita dalla luteolina, una molecola appartenente alla famiglia dei flavonoidi. La luteolina si trova sulla parte aerea della pianta di Reseda, può essere estratta dalle foglie, dallo stelo, dai fiori o dai frutti, non dalle radici. La luteolina (5,7,3',4' tetrahydroxyflavone), è un pigmento in grado di conferire come già detto una colorazione gialla intensa e brillante; è termostabile e pertanto utilizzata sin da tempi antichi per la tintura di lana e seta [105].

I tre principali flavonoidi della pianta ovvero luteolina, luteolina-7-glucoside e luteolina-3',7-diglucoside sono mostrati in Figura 6.4 [106].

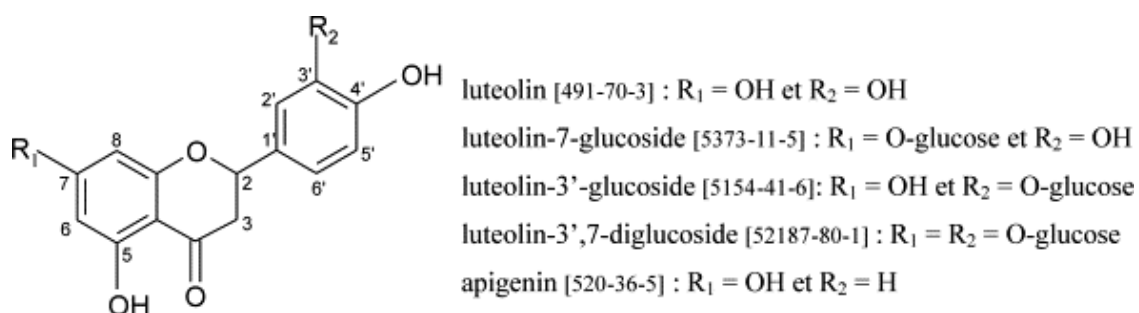


Figure 6-4: Struttura chimica della luteolina e suoi mono e diglicosidi identificati in *R. luteola*

6.3.2 *Cotinus Coggygria*



Figure 6-5: Foglie di *Cotinus Coggygria*

Il *Cotinus coggygria* è comunemente noto come “scotano”, “sommaco” o “albero della nebbia”. E’ una pianta originaria dell’Europa meridionale, Balcani, e Asia e la si può trovare in ogni tipo di terreno, ma predilige quelli calcarei e scoscesi. In Italia è diffuso nelle regioni centro-settentrionali in particolare nelle Marche, in Umbria e in Trentino. Preferisce il clima mediterraneo riuscendo a sopportare sia periodi torridi che molto freddi e riesce a crescere sino a 800 m s.l.m. di quota, purchè vengano rispettate le sue condizioni ottimali. E’ una pianta appartenente alla famiglia delle Anacardiaceae.

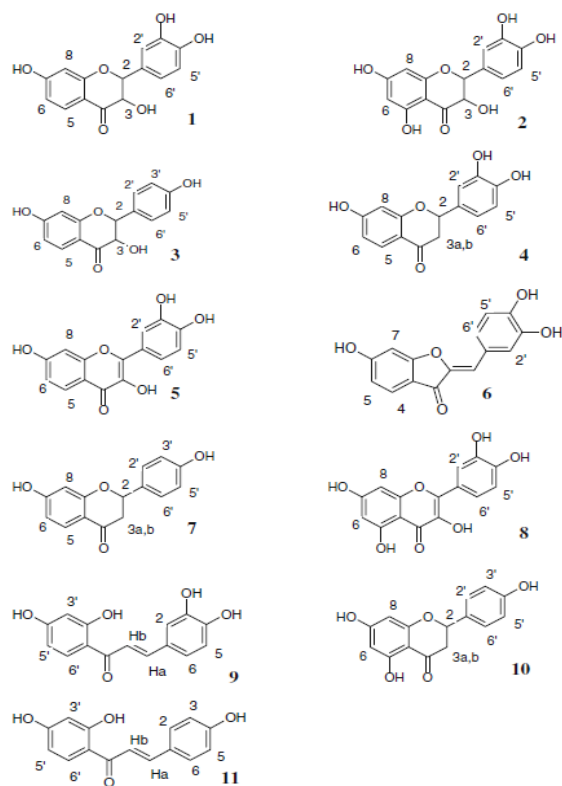
Solitamente si presenta come un grande arbusto che cresce spontaneo ai margini dei boschi, oppure in rari casi può crescere come un alberello. È un fusto eretto che si apre con tante ramificazioni con delle radici forti e profonde. Le foglie sono semplici di forma rotondeggiante e si inseriscono sui rami in modo alterno. I fiori sono di piccole dimensioni di colore giallo-verdastro che formano dei grappoli con moltissimi pedicelli lunghi e sottili. La fioritura è tra giugno e luglio. Il frutto è una drupa (frutto carnoso con un solo seme) semilegnosa di colore rossastro sostenuta da un peduncolo.

L’utilizzo di questa specie in tempi antichi era legato alle sue proprietà officinali in quanto l’infusione derivata dalle sue foglie veniva utilizzata come antisettico, antinfiammatorio, antiemorragico.

Foglie e rami venivano sfruttati per ottenere oli essenziali a base di terpeni impiegati nella preparazione di miscele profumate. Dalle radici, dalle foglie e dai rami giovani invece si otteneva una polvere utilizzata nella concia delle pelli e nella colorazione di tessuti che conferiva una tipica colorazione dal giallo al rosso [107]. Recenti studi hanno confermato inoltre la presenza di questa specie come colorante negli indumenti di epoca post-bizantina del periodo tra il XV ed il XVIII sec ed in quelli ecclesiastici italiani del XIII sec.

Dalla pianta si possono estrarre tre classi principali di composti [108]:

1. i tannini tra cui acido gallico e suoi derivati (metilgallato, pentagalloyl-glucosio), catechine e procianidine, con proprietà antiossidanti [109];
2. Oli essenziali principalmente composti da monoterpeni con potenti proprietà antibatteriche e antimicotiche.
3. Flavonoidi con proprietà antinfiammatorie ed antiossidanti; 11 molecole appartenenti a questa famiglia classificabili come coloranti naturali presenti nello scotano (Figura 6.6) [110].



	Nome comune	Nome	N	Nome comune	Nome
1	Fustin	3',4',7-trihydroxyflavanol	7	Liquiritigenin	4',7-dihydroxyflavanone
2	Taxifolin	3',4',5,7- tetrahydroxyflavonoid	8	Quercetin	3',4',5,7-tetrahydroxyflavanol
3	-	4',7-dihydroxyflavanol	9	Butein	Trans-2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone
4	Butin	3',4',7-trihydroxyflavanone	10	-	4',5,7-trihydroxyflavanone
5	Fisetin	3',4',7-trihydroxyflavanol	11	Isoliquiritigenin	Trans-2',4,4'-trihydroxychalcone
6	Sulfuretin	3',4',6- trihydroxyaurone			

 Figure 6-6: Molecole appartenenti alla famiglia dei flavonoidi in *Cotinus Coggyria*

6.4 OVERVIEW DEL LAVORO

SPERIMENTAZIONE BIOCHEMICALS

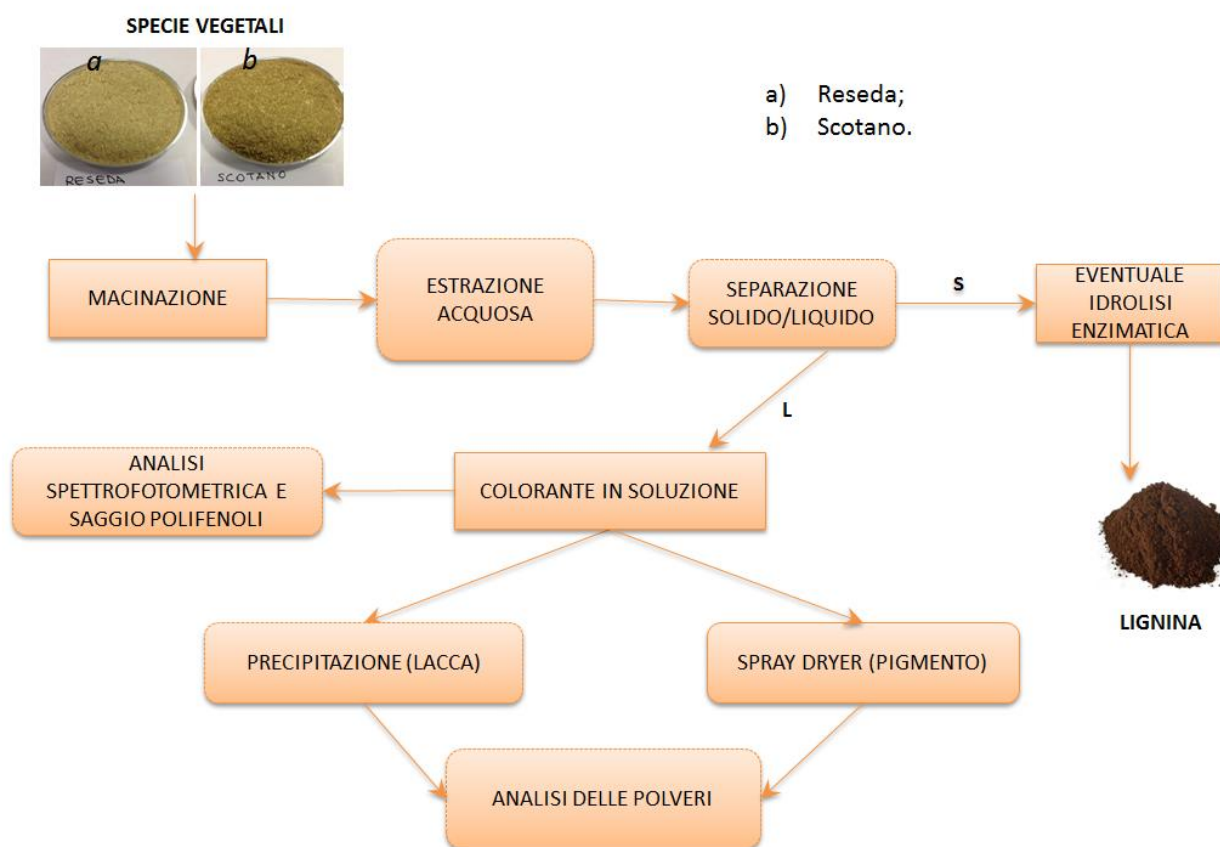
La sperimentazione ha riguardato l'estrazione di biocoloranti a partire da specie vegetali autoctone. In particolare sono state testate la Reseda e lo Scotano, due piante tintorie in grado di fornire due diverse gradazioni di giallo grazie alla presenza di polifenoli, in particolare flavonoidi.

La sperimentazione ha previsto una prima fase di caratterizzazione delle biomasse seguita da estrazione dei principi coloranti in fase acquosa a diverse condizioni di tempo e temperatura; gli estratti sono stati poi caratterizzati mediante analisi spettrofotometrica e valutazione del contenuto in polifenoli ed in flavonoidi.

I coloranti in soluzione sono stati poi soggetti a precipitazione al fine di ottenere pigmento in polvere con due tecniche diverse: spray dryer (scotano) e aggiunta di sali per la formazione di una lacca (reseda).

Le polveri sono state analizzate per derivarne le coordinate colorimetriche e la resistenza alla degradazione termica al fine di valutarne una possibile applicabilità nella tintura di diverse matrici.

Produzione Coloranti



La componente solida derivante dal processo di estrazione è stata separata per poter andare incontro a valorizzazione per la produzione di zuccheri fermentabili e lignina, le prove sono ancora in corso di svolgimento.

Capitolo 7 MATERIALI E METODI

7.1 MATERIALI

7.1.1 Reagenti

- Acqua distillata
- Etanolo (99,9%) - Sigma Aldrich
- Folin-Ciocalteu Reagent - Carlo Erba
- Acido Gallico monoidrato - Carlo Erba
- Allume di potassio
- Carbonato di calcio (>98%) - Sigma Aldrich

7.1.2 Specie vegetali

Le polveri di Reseda e Scotano con una umidità iniziale di 8.18% e 8.28% rispettivamente sono state fornite dalla ditta Oasi Colori (Jesi-Marche).

La scelta dell'utilizzo di queste piante è stata indirizzata dal fatto che sono specie note per le loro proprietà coloranti. Questi piccoli arbusti possono crescere spontaneamente in Umbria; in particolare lo Scotano è tipico della zona dell'Appennino umbro marchigiano dove cresce con basse richieste di acqua e nutrienti.



Figure 7-1: Reseda (a) e Scotano (b) in polvere

7.2 METODI

7.2.1 Caratterizzazione

Prima di procedere con le estrazioni le specie vegetali oggetto della sperimentazione sono state caratterizzate utilizzando la metodica NREL già descritta per le biomasse lignocellulosiche nel capitolo 4, paragrafo 4.1 (Metodi analitici- Caratterizzazione Biomassa tal quale).

7.2.2 Estrazioni

Dopo la caratterizzazione sono state effettuate le estrazioni sui due diversi materiali. Sono state scelte tre diverse variabili sperimentali, quantità di solido (S/L), temperatura e tempo, come sintetizzato in tabella 7.1 i cui valori sono stati selezionati in base a dati di letteratura [106, 111].

Tutte le prove sono state condotte sotto agitazione continua in acqua deionizzata e sono state effettuate in doppio. Le prove a diverse temperature sono state condotte mantenendo il tempo di estrazione pari a 60 minuti; le prove a tempi diversi sono state condotte tenendo fissa la temperatura a 100°C.

Table 7-1: Condizioni di estrazione di Reseda e Scotano e variabili

S/L	Variabili	
	T (°C)	t (min)
1:100	40	15
1:10	60	30
	100	60

Dopo l'estrazione, i campioni sono stati filtrati con filtri carta Whatman 1 e quantificati mediante determinazione gravimetrica, ovvero allontanando per evaporazione il solvente acquoso e pesando il solido risultante.

7.2.3 Analisi del Colorante

➤ Analisi spettrofotometrica

Gli estratti ottenuti sono stati analizzati tramite spettrofotometria UV-VIS con strumentazione Thermo Scientific Genesys 10S (Fig 7.2) per ottenere l'impronta spettrale dei due campioni.



Figure 7-2: spettrofotometro UV VIS Thermo Genesys 10S

Questa tecnica è il metodo d'elezione per analisi qualitative e quantitative su pigmenti in quanto facile, rapida, affidabile, e non distruttiva per i campioni oggetto di studio. In questo lavoro sono state effettuate prove qualitative andando a registrare spettri di assorbimento nel range di lunghezza d'onda tra 190 e 600 nm. Dato che ogni sostanza ha il suo spettro di assorbimento, l'esame di tali spettri permette di identificare una sostanza o una miscela (per confronto diretto con campioni noti o tramite banche dati di spettri) o di controllarne il grado di purezza.

➤ Determinazione del Contenuto di Polifenoli Totali (TPC)

Sugli estratti con la rese maggiori è stato poi eseguito il saggio per la determinazione dei polifenoli totali con Metodo Folin Ciocalteu [112]. Un millilitro di soluzione estratta è stato inserito su un matraccio dove sono stati aggiunti 5 mL del reagente Folin-Ciocalteu e miscelati. Dopo 1 minuto (e prima di 8 minuti) sono

stati aggiunti 15 mL di una soluzione di Na_2CO_3 (20 mg/ml), mescolando nuovamente. Il volume è stato poi portato a 100 ml con acqua deionizzata.

Dopo 2 ore è stata registrata l'assorbanza nel range tra 550-850 nm e con un massimo a circa 760 nm. Il protocollo è stato eseguito anche su soluzioni standard a concentrazioni note di acido gallico per costruire una retta di taratura. Il totale dei fenoli (TPC) è stato espresso come milligrammi equivalenti di acido gallico equivalente su peso secco in grammi di biomassa di partenza (GAeq/PS).

➤ Determinazione del Contenuto di Flavonoidi Totali (TFC)

È stato inoltre eseguito il saggio per la determinazione dei flavonoidi totali con il metodo del Cloruro di Alluminio [113]. Un millilitro di soluzione standard di quercetina a diverse concentrazioni ed un millilitro di campione estratto (tra quelli selezionati) sono stati posti in un matraccio da 10 ml. Sono stati aggiunti 0.3 ml di NaNO_2 al 5%, 0.3 ml di AlCl_3 al 10% ed infine 2ml di NaOH 1M e si è portato a volume con acqua deionizzata. È stata poi eseguita lettura allo spettrofotometro UV-VIS a 510 nm. Il protocollo prevede l'ottenimento di una retta di calibrazione per la quercetina; il totale dei flavonoidi (TFC) è stato espresso come milligrammi equivalenti di quercetina su peso secco in grammi di biomassa di partenza (QEq/PS).

7.2.4 Ottenimento ed analisi delle polveri

Le soluzioni con le maggiori rese in termini di colorante disciolto sono state poi sottoposte alla fase di precipitazione/essiccamento per ottenere il pigmento in polvere con due tecniche differenti:

1. *Spray dryer* per lo Scotano: La tecnica è stata eseguita all'interno del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Perugia utilizzando lo strumento Mini Spray Dryer B290 BUCHI. Il processo di *Spray-drying* si ottiene mescolando un gas riscaldato con un liquido (vaporizzato) nebulizzato di goccioline con un rapporto superficie/massa elevato all'interno di un recipiente (camera di essiccazione) e determinando, mediante contatto diretto, l'evaporazione rapida e uniforme del solvente.
2. Formazione lacca per la Reseda. Per la preparazione della lacca la polvere di Reseda è stata fatta bollire per circa 1 ora in acqua deionizzata in presenza di allume di potassio (circa 100 grammi). L'acqua bollita è stata poi filtrata ed è stato aggiunto CaCO_3 sotto agitazione costante. La lacca formatasi è stata poi lasciata depositare ed essiccata fino all'ottenimento della polvere.

Entrambe le polveri sono state analizzate. L'analisi delle polveri ha previsto l'ottenimento delle coordinate colorimetriche e l'analisi del profilo di degradazione termica.

➤ Coordinate colorimetriche con colorimetro Konica Minolta CM-2500c portatile (Fig.7.3a)

Per quanto riguarda l'ottenimento delle coordinate, lo spazio di colore utilizzato è stato l' $L^*a^*b^*$ (noto anche come CIELAB) che è attualmente uno degli spazi di colore più diffusi per la misurazione del colore di un oggetto. L^* indica la luminosità mentre a^* e b^* indicano le direzioni del colore: $+a^*$ è la direzione del rosso, $-a^*$ è la direzione del verde, $+b^*$ è la direzione del giallo e $-b^*$ è la direzione del blu. Il centro è acromatico; quando i valori a^* e b^* aumentano ed il punto si sposta dal centro, la saturazione del colore aumenta.

Per le misure è stato utilizzato l'illuminante D65 che ripropone la luce diurna e sono state effettuate 5 misurazioni. La CIE e la ISO stabiliscono che "la CIE D65 è l'illuminante normalizzato da utilizzare in tutti i calcoli colorimetrici che richiedono la rappresentazione della luce solare, a meno che non ci siano ragioni specifiche per l'utilizzo di un illuminante diverso". (ISO 11664- 2:2007 (E) / CIE 014-2 S / E: 2006).

➤ TGA con analizzatore Termogravimetrico TGA-701 LECO (Fig.7.3b)

L'analisi termogravimetrica viene utilizzata per determinare la stabilità termica di una specie e dei componenti della sua frazione volatile misurando la variazione di massa che avviene quando la specie viene riscaldata. Un grafico della massa in funzione della temperatura permette di valutare la stabilità termica, le velocità di reazione, i processi di reazione e la composizione del campione.

Le analisi TGA sono state effettuate pesando 0.2 grammi di campione in atmosfera d'aria con un flusso pari a 3.5 L/min da 25 °C a 1000 °C (con una rampa di 10°C/min). I campioni sono stati disposti in crogioli di ceramica e la perdita di peso (curva TG) ed il relativo valore della derivata (curva DTG) sono stati registrati in continuo come funzione del tempo e della temperatura.

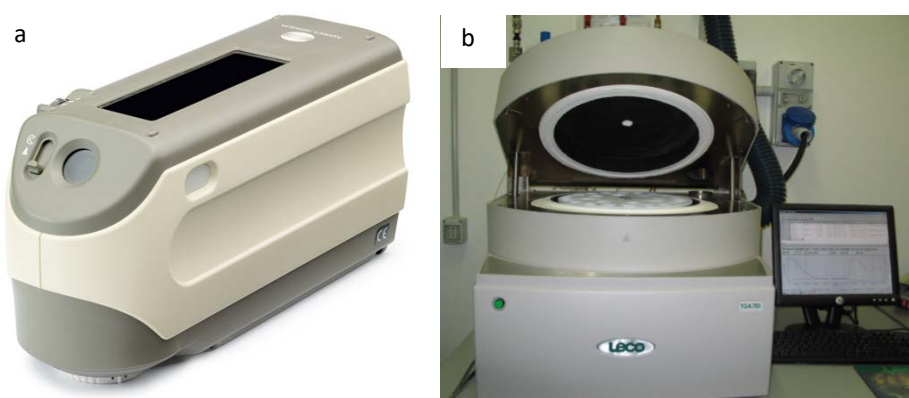


Figure 7-3: Colorimetro Konica Minolta (a) ed analizzatore termogravimetrico LECO (b)

Capitolo 8 RISULTATI

8.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE

Le specie vegetali sono state caratterizzate per valutare la loro composizione strutturale mediante metodica NREL (Capitolo 4 par. 4.1).

I risultati ottenuti sono riportati, come percentuali delle varie componenti della pianta, in Figura 8.1. Il primo elemento d'interesse risulta l'alta percentuale di estrattivi, le componenti non strutturali delle specie vegetali che, nel caso di specie tintorie conterranno anche il principio colorante d'interesse. Lo scotano in particolare presenta un contenuto in estrattivi molto alto (circa 30%) risultando essere la componente maggiormente presente nel campione. Ciò potrebbe anche sarà indice della complessità e dell'elevato numero di molecole non strutturali che si ritroveranno in larga misura nella composizione dell'estratto

La somma delle percentuali di cellulosa ed emicellulosa risulta pari al 42 ed al 36% per Reseda e Scotano rispettivamente. Tali valori risultano essere nel complesso piuttosto simili a quelle di biomasse utilizzate all'interno di una bioraffineria, pertanto si potrebbe pensare di sfruttare il residuo di filtrazione dopo estrazione dei coloranti per applicazioni nella *bio-based* industry. Il residuo potrà essere infatti idrolizzato mediante l'utilizzo di enzimi cellulolitici al fine di ricavare carboidrati semplici da sfruttare nella sugar platform come ampiamente descritto nella sezione precedente. Inoltre la percentuale di lignina non troppo elevata tra il 15 ed il 20% potrebbe essere importante per limitare l'inibizione causata da questo polimero nelle trasformazioni di tipo biochimico. Il contenuto in ceneri potrebbe essere dovuto alla contaminazione durante le fasi di raccolta.

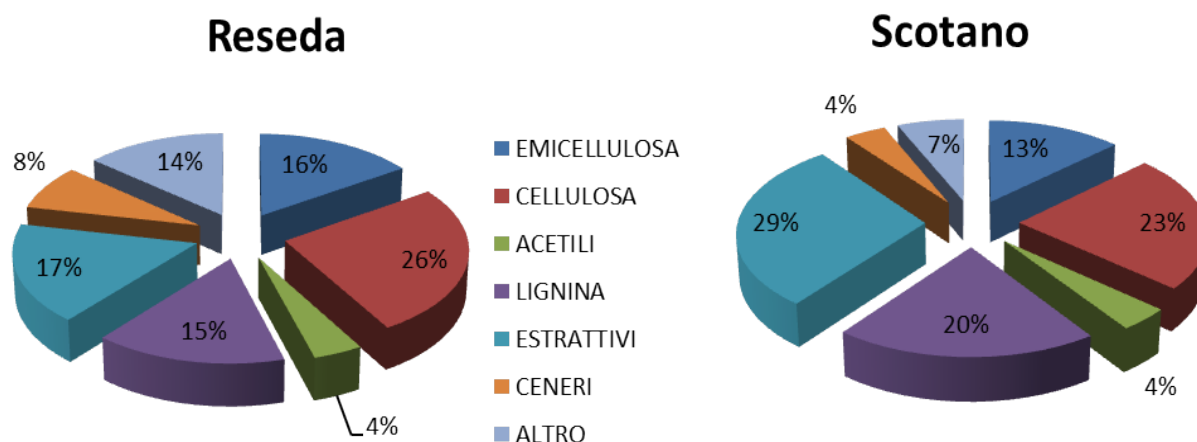


Figure 8-1: Composizione chimica percentuale delle specie vegetali utilizzate per l'estrazione

8.2 ESTRAZIONI e CARATTERIZZAZIONI

Le estrazioni sono state effettuate in duplice prova come descritto nel Capitolo 7 paragrafo 2.2. Le prove sono state condotte con diverse combinazioni della variabili in esame, così come specificato nelle Tabelle 8.1 ed 8.2.

In figura 8.2 si possono osservare il sistema di estrazione su bagnetto termostato ed agitazione magnetica (a sinistra) e quattro campioni ottenuti a diversi rapporti solido/liquido.

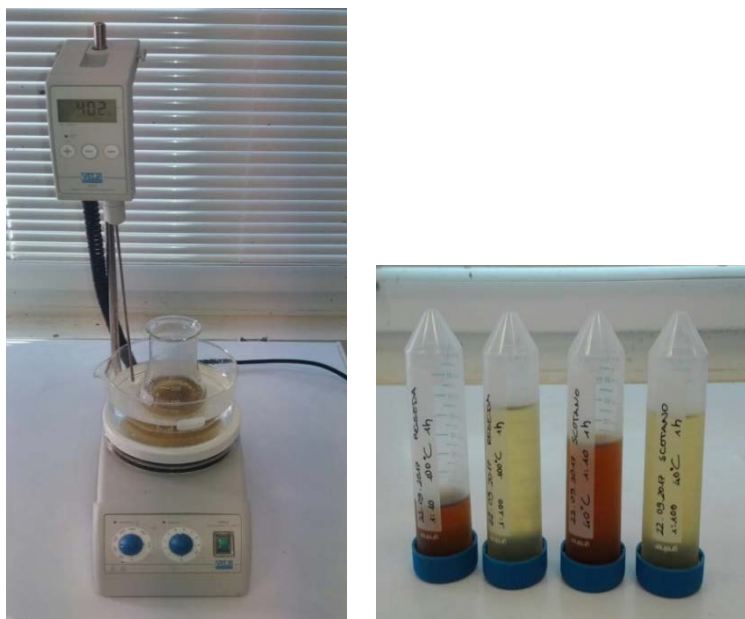


Figure 8-2: Sistema di estrazione (sx) e campioni ottenuti (dx)

La quantificazione termogravimetrica del solido estratto in ciascuna prova ha mostrato gli andamenti medi riassunti in Tabella 8.1 (Reseda) ed 8.2 (Scotano). I risultati sono stati espressi come grammi di materiale solido presente in ogni estratto (ottenuto inseguito ad evaporazione dell'acqua per differenza di peso) e come percentuale (Rese %) di materiale estratto su materiale di partenza su base secca.

Table 8-1: Rese di estrazione relative alla Reseda alle diverse condizioni

RESEDA	S/L	T(°C)	t (min)	g	Resa
	1/100	40	60	0.007	19.44%
	1/10	40	60	0.0615	10.84%
	1/100	60	60	0.0085	21.69%
	1/10	60	60	0.0665	10.77%
	1/100	100	60	0.006	15.54%
	1/10	100	60	0.069	9.69%
	1/100	100	30	0.006	13.17%
	1/10	100	30	0.0655	10.96%
	1/100	100	15	0.005	12.72%
	1/10	100	15	0.064	8.98%

Table 8-2: Rese di estrazione relative alla Scotano alle diverse condizioni

SCOTANO	S/L	T(°C)	t (min)	g	Resa
	1/100	40	60	0.008	15.23%
	1/100	60	60	0.0525	13.62%
	1/10	40	60	0.0055	14.15%
	1/10	60	60	0.0585	11.86%
	1/100	100	60	0.008	19.69%
	1/10	100	60	0.059	12.94%
	1/100	100	30	0.006	15.68%
	1/10	100	30	0.054	11.86%
	1/100	100	15	0.007	17.91%
	1/10	100	15	0.055	11.73%

➤ Effetto del rapporto solido/liquido

I risultati mostrano, come atteso, che i più alti valori di sostanze estratte (g) si ottengono lavorando ad un rapporto solido/liquido più alto. Al contrario la resa di estrazione (% su materiale secco di partenza) aumenta leggermente al diminuire del solido caricato. Indagini di letteratura dimostrano che, all'interno del range utilizzato nella sperimentazione, non si verificano sostanziali variazioni nell'efficacia dell'estrazione presumibilmente a causa dell'alta solubilità dei polifenoli [114]. Pertanto è preferibile indirizzare l'ottimizzazione delle rese di estrazione su altre variabili evitando l'utilizzo di un elevato quantitativo di solvente. Inoltre l'eccesso di solvente in fasi successive, quali l'essiccazione tramite spray dryer, potrebbe risultare sconveniente in termini energetici.

➤ Effetto della temperatura

Nelle due specie vegetali oggetto di studio, è stata osservata una risposta differente alla variabile temperatura (Fig. 8.3). Nella Reseda, il valore massimo di resa di estrazione (di circa il 21%) è stato ottenuto nelle prove effettuate a 60°C mentre le estrazioni effettuate a 100°C hanno mostrato un valore più basso a dimostrazione del fatto che presumibilmente del materiale inizia a degradarsi a temperature più spinte. Al contrario nello Scotano è stata osservata proporzionalità diretta tra aumento di temperatura ed aumento delle rese, solo a 100°C si è ottenuta infatti una resa prossima al 20%.

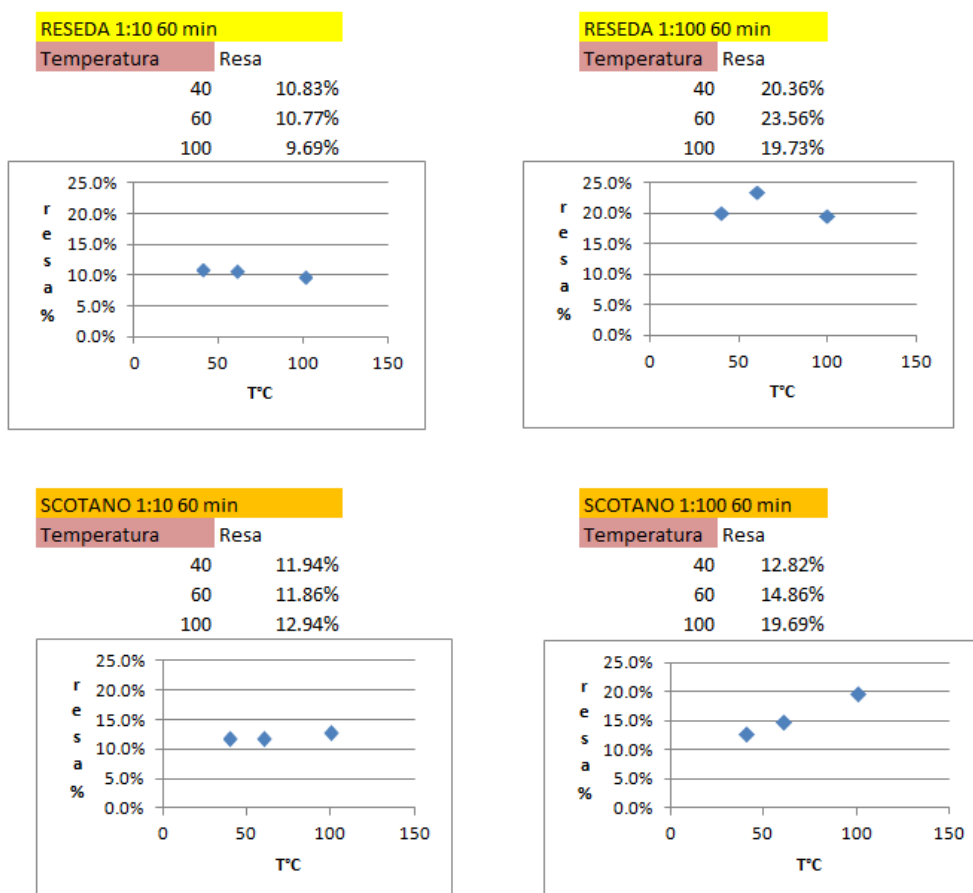


Figure 8-3: Effetto della variabile temperatura sulle rese di estrazioni di Reseda e Scotano

Andando a considerare le percentuali di estrattivi presenti sulla biomassa di partenza (Fig. 8.1), si potrebbe considerare che per reseda le alte temperature potrebbero iniziare a portare in soluzione anche altre

componenti della pianta oltre quelle non strutturali, probabilmente zuccheri derivanti dalla degradazione dell'emicellulosa.

L'analisi spettrofotometrica, effettuata con una scansione nel range tra 190 e 600 nm, ha permesso di ottenere maggiori informazioni in riferimento all'andamento delle rese di estrazione. Per quanto riguarda lo Scotano infatti, è confermato quanto ottenuto da analisi gravimetrica e quanto riportato dalla letteratura; lo spettro con altezza massima è infatti quello relativo all' estrazione effettuata a 100°C (Fig. 8.4a)

Nella Reseda al contrario si osserva come il picco a 330nm relativo all'assorbimento della luteolina [106], la principale molecola responsabile del colore nella reseda, abbia un picco massimo nell' estrazione effettuata a 100°C (Fig 8.4 b) nonostante il valore di resa massima si fosse ottenuto a 60°C. Presumibilmente, come già accennato, è stato estratto e quantificato altro materiale non attribuibile a molecole coloranti.

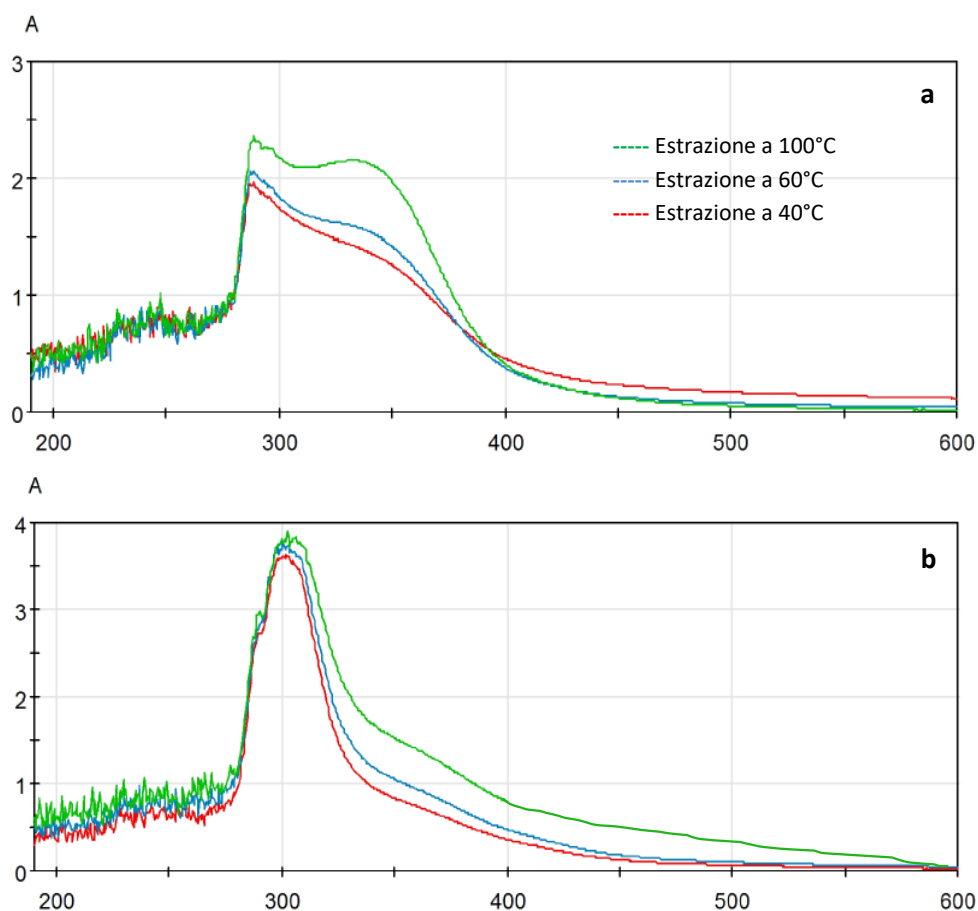


Figure 8-4: Spettri relativi ad estratti di Reseda (a) e Scotano (b) a diversi valori di temperatura

➤ Effetto del tempo

La variabile tempo è stata valutata sulle prove a 100°C dimostrate, come appena discusso, quelle migliori per l'estrazione dei coloranti. Sono state effettuate prove a 15, 30 e 60 minuti dato che in letteratura si riscontra come tempi superiori di estrazione non comportino significativi aumenti nelle rese [114]. Aspetto interessante è stato dunque individuare l'intervallo di tempo dove risultasse minima la variabilità in termini di materiale estratto.

I risultati hanno comunque mostrato un andamento crescente di resa, anche se in maniera poco significativa, all'aumentare dei tempi di estrazione per entrambe le specie (Fig . 8.5).

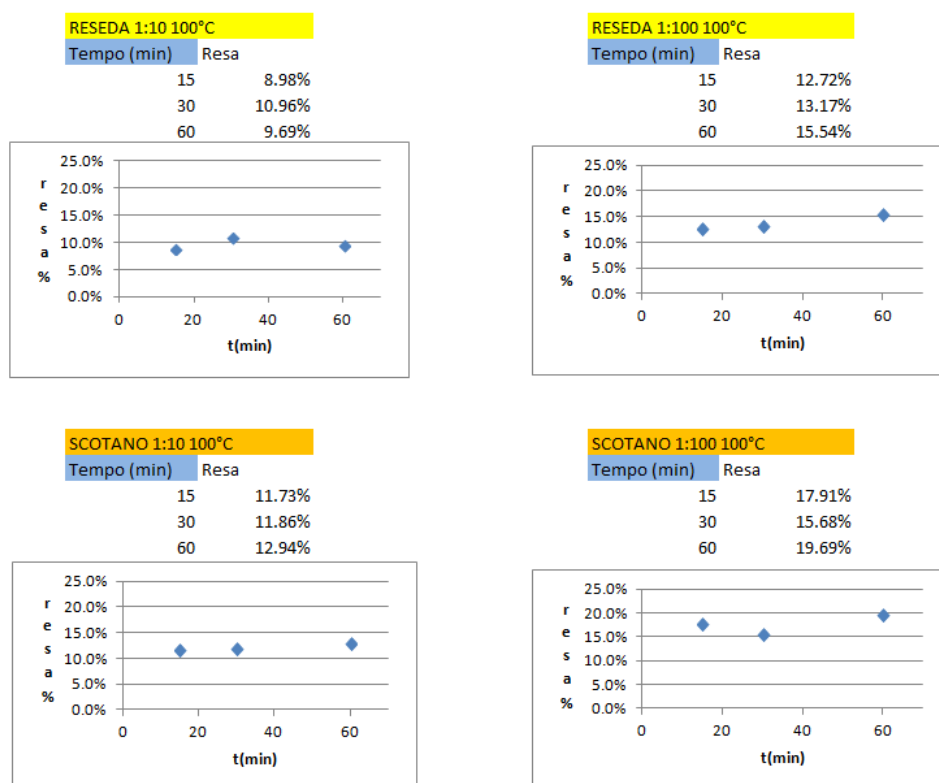


Figure 8-5: Effetto del tempo sulle rese di estrazioni di Reseda e Scotano

Di nuovo sono stati messi a confronto gli spettri ottenuti dalla scansione dei vari campioni e gli andamenti sono riportati in figura 8.6.

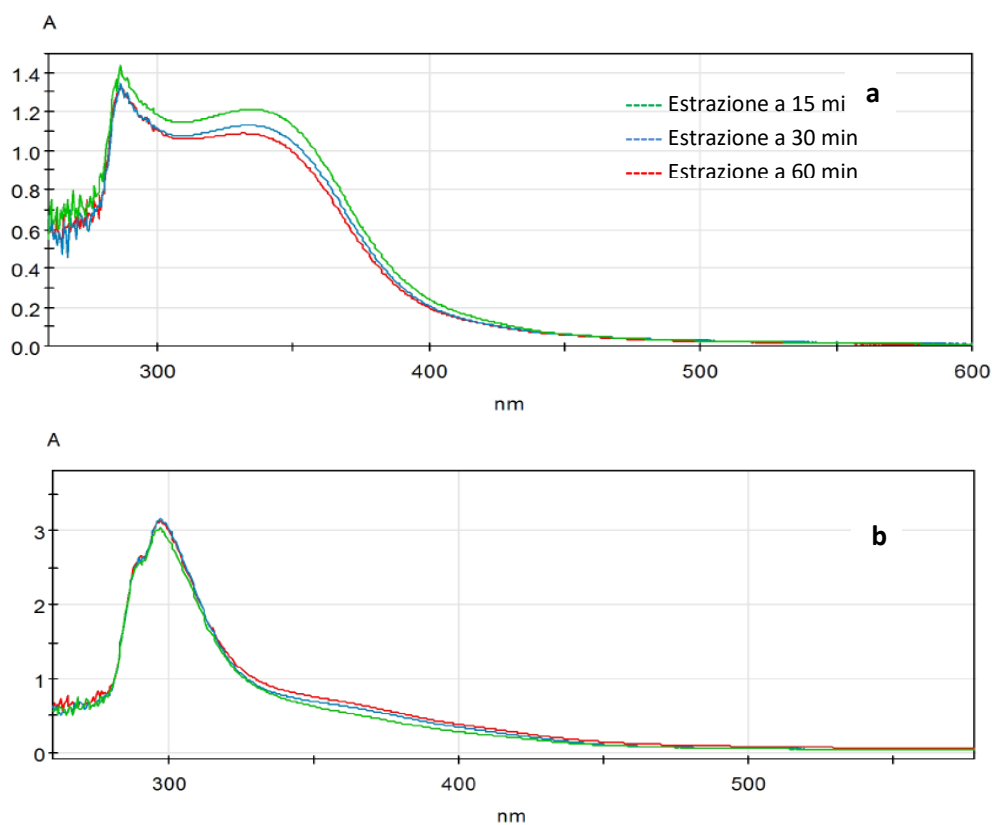


Figure 8-6: Spettri relativi ad estratti di Reseda (a) e scotano (b) a diversi tempi di estrazione

Anche in questo caso l'analisi spettrofotometrica sembrerebbe mostrare, per quanto riguarda la Reseda, andamenti discordanti rispetto alla quantificazione termogravimetrica. Il valore di assorbanza massimo ottenuto a 15 minuti farebbe pensare che per l'estrazione della luteolina siano sufficienti tempi di estrazione brevi, così come dimostrato in letteratura utilizzando però solventi organici, in particolare metanolo [106].

Per quanto riguarda lo Scotano, l'andamento risulta essere leggermente crescente all'aumentare della variabile tempo. Anche in questo caso si potrebbe pensare però di ridurre i tempi di estrazione per ottenere buone rese dato che i valori non si discostano per più di due punti percentuali per entrambi i valori di rapporto solido/liquido. Anche l'indagine spettrofotometrica conferma quanto detto in quanto i tre spettri si possono considerare quasi perfettamente sovrapposti.

➤ Determinazione del TPC

La quantificazione dei polifenoli totali (TPC) è stata eseguita con protocollo Folin-Ciocalteu. Come descritto nel Cap.7 Sez. 2.3 la reazione è stata dapprima eseguita su standard di acido gallico a diverse concentrazioni per la costruzione della retta di calibrazione e successivamente sui campioni selezionati (Fig 8.7). Il contenuto totale di polifenoli è stato poi espresso come equivalenti di acido gallico (GAeq).



Figure 8-7: Standard di acido gallico e campioni dopo la reazione

Una volta eseguita la reazione, il saggio ha previsto la scansione allo spettrofotometro nel range tra 550 e 850 nm al fine di individuare il valore di assorbanza massimo, che si è confermato essere a 760 nm. Si è quindi proceduto alle letture delle assorbanze dei 5 standard e dei campioni. I dati ottenuti sono riportati in tabella 8.3:

Table 8-3: Valori di assorbanza ottenuti per standard di acido gallico a diverse concentrazioni

Campione	(mg/mL)	Assorbanza (760 nm)
STD1 acido gallico	0.8	0.794
STD2 acido gallico	0.4	0.407
STD3 acido gallico	0.2	0.212
STD4 acido gallico	0.1	0.108
STD5 acido gallico	0.05	0.047

A questo punto è stata costruita la retta di calibrazione determinandone la funzione e il coefficiente di correlazione R^2 (figura 8.8):

$$y=1.000856 x, R^2 = 0.99959$$

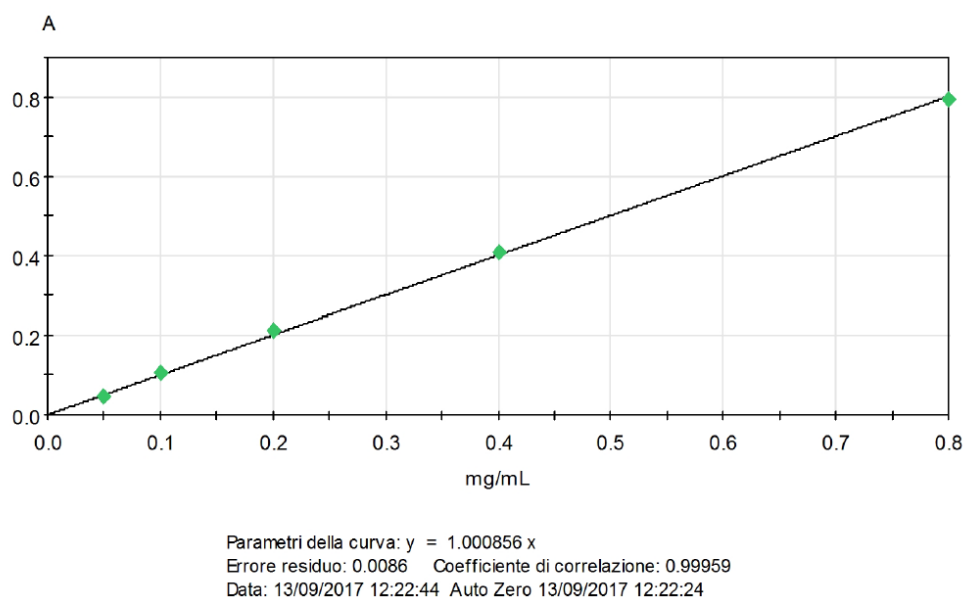


Figure 8-8: Retta di calibrazione dell'acido gallico

Dalla retta di calibrazione sono stati ricavati i mg di acido gallico equivalenti di polifenoli presenti nei campioni, i risultati sono riportati in tabella 8.4.

Table 8-4: Determinazione del contenuto in polifenoli degli estratti di Reseda e Scotano selezionati

	Campione	Condizioni		A (760 nm)	GAeq/PS(mg/g)
RESEDA	A	100°C	60 min	0.421	45.4
	B	100°C	30 min	0.423	45.6
	C	60°C	60 min	0.346	37.3
SCOTANO	A	100°C	60 min	2.479	264.9
	B	100°C	30 min	2.527	270.3
	C	60°C	60 min	2.23	237.4

I valori ottenuti si sono dimostrati simili a quelli di letteratura nonostante l'utilizzo di acqua come solvente unico per l'estrazione [111]. Lo scotano, come ci si aspettava, presenta un valore di TPC molto più alto rispetto alla Reseda, proprio a causa dell'abbondanza di composti polifenolici nei suoi estratti [115], in particolare per l'alto contenuto in tannini.

➤ **Determinazione del TFC**

Il saggio per la determinazione dei flavonoidi totali è stato eseguito, così come per i polifenoli, prevedendo dapprima la fase di preparazione di standard a concentrazione nota di quercetina (Fig. 8.9) per la costruzione della retta di calibrazione. La lettura spettrofotometrica a 510 nm ha fornito i valori di assorbanza che sono riportati in Tabella 8.5.

Table 8-5: Valori di assorbanza ottenuti per standard di quercetina a diverse concentrazioni

Campione	Concentrazione (mg/mL)	Assorbanza (510 nm)
STD1 quercetina	1	0.016
STD2 quercetina	0.2	0.022
STD3 quercetina	0.1	0.038
STD4 quercetina	0.08	0.113

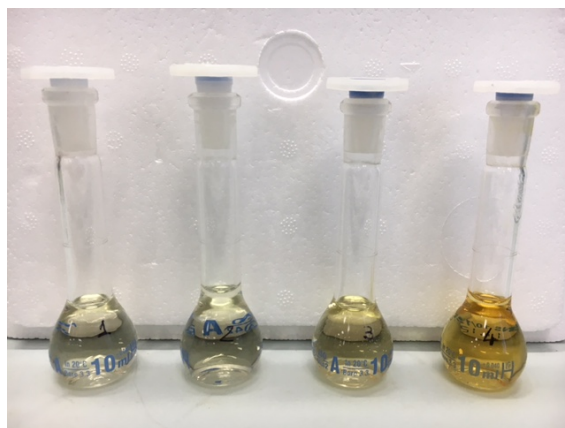
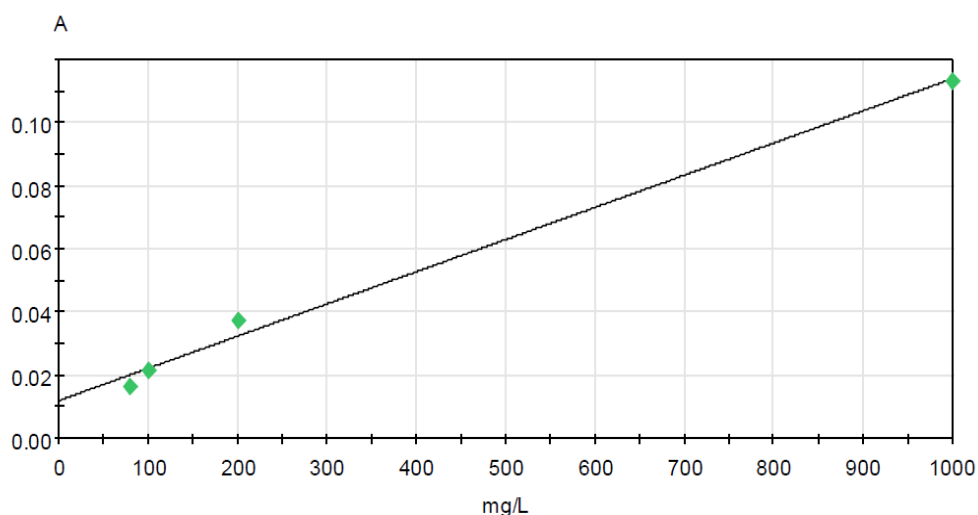


Figure 8-9: Standard di Quercetina a concentrazioni note

È stata quindi costruita la retta di calibrazione anche per la quercetina determinandone la funzione e il coefficiente di correlazione R^2 (figura 8.10):

$$y = 0.000102x + 0.0119, R^2 = 0.99640$$



Parametri della curva: $y = 1.020145E-04x + 1.195501E-02$
 Errore residuo: 0.0047 Coefficiente di correlazione: 0.99640
 Data: 10/10/2017 12:54:39

Figure 8-10: Retta di calibrazione della quercetina

È stato poi eseguito il saggio sui campioni estratti con i quali erano state ottenute le rese maggiori; i risultati sono riportati in Tabella 8.6.

Table 8-6: Determinazione del contenuto in flavonoidi degli estratti di Reseda e Scotano selezionati

	Campione	Condizioni		A (nm)	Qeq/PS (mg/g)
RESEDA	A	100°C	60 min	0.283	28.69
	B	100°C	30 min	0.270	27.28
	C	60°C	60 min	0.188	18.61
SCOTANO	A	100°C	60 min	0.301	151.49
	B	100°C	30 min	0.307	154.77
	C	60°C	60 min	0.246	122.18

In figura 8.11 sono raffigurati i risultati relativi al TPC ed al TFC dei diversi campioni analizzati. Nei campioni A e B il contenuto in fenoli e polifenoli non varia significativamente nelle condizioni analizzate; ciò a

dimostrazione del fatto che la temperatura incide in maniera significativa sull'estrazione rispetto alla variabile tempo. A 60°C infatti i valori di TPC ed il TFC risultano già essere leggermente inferiori.

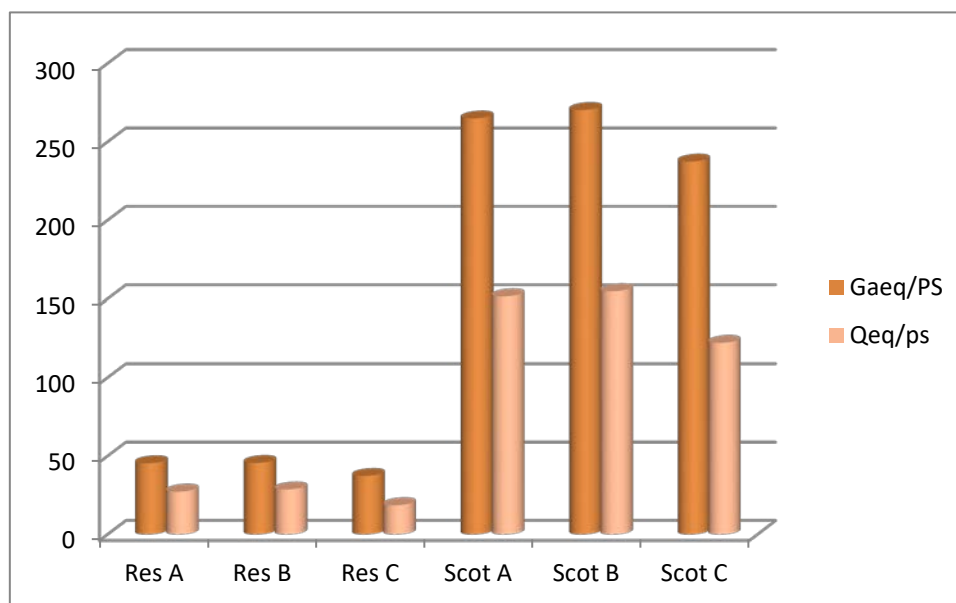


Figure 8-11: Valori relativi al TPC e TFC ottenuti su peso di materiale secco

8.2.1 Ottenimento ed analisi delle polveri

Dato che l'utilizzo di coloranti in soluzione è limitato alla tintura di fibre e tessuti, i coloranti ottenuti da Reseda e Scotano in soluzione sono stati precipitati a pigmenti al fine di poter essere applicati su una serie di prodotti che interessano una grossa fetta di mercato.

L'ottenimento della polvere è stato effettuato utilizzando due tecniche differenti:

1. Spray dryer per lo scotano
2. Formazione lacca per la reseda

In figura 8.12 sono riportate le polveri così ottenute:

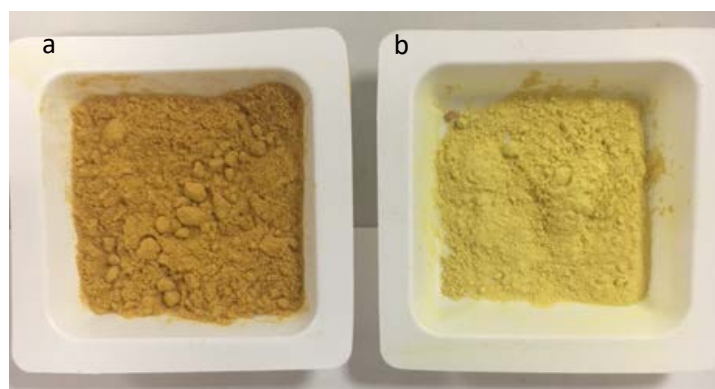


Figure 8-12: Pigmento in polvere di scotano (a) e lacca di reseda (b)

Le coordinate colorimetriche CIE $L^*a^*b^*$ (CIELAB) ottenute tramite colorimetro Konica Minolta (CM-2500c) sono riportate di seguito in tabella 8.7 :

Table 8-7: Coordinate colorimetriche delle polveri di Scotano e Reseda

Pigmento di Scotano	Lacca di Reseda:
L* = 55.35	L* = 76.42
a* = 10.07	a* = -5.82
b* = 65.15	b* = 50.57

Per definire il range di applicabilità dei pigmenti in processi che usano alte temperature, vedi materiali polimerici, è stata effettuata l'analisi termogravimetrica. L'analizzatore Termo gravimetrico TGA-701 LECO ha permesso di ottenere il profilo di degradazione termica per ciascuno dei due campioni.

Per entrambi i campioni sono stati eseguite curve TG relative alla perdita di peso del campione di partenza all'aumentare della temperatura, e la derivata della curva stessa (DTG). Questo grafico presenta dei picchi, le cui aree sono proporzionali alla variazione di peso del campione, e permette di rivelare piccole variazioni di pendenza che possono non essere visibili nella DT.

In figura 8.13 sono riportati i due grafici TG e DTG relativi alle prove di degradazione termica della lacca di Reseda.

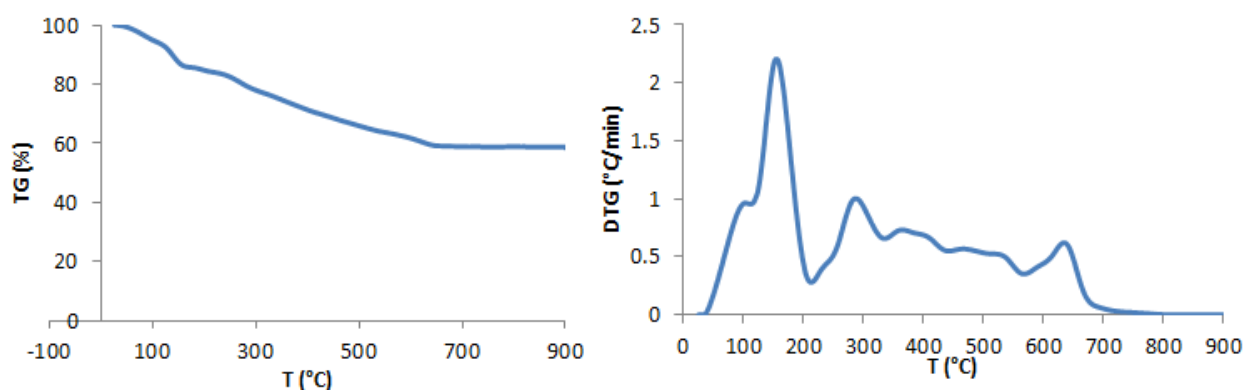


Figure 8-13: Curve TG e DTG relative alla lacca di Reseda

Dalla figura si osserva una prima zona di perdita di massa intorno ai 100°C che è quella relativa alla evaporazione dell'acqua (perdita di umidità del campione). La curva DTG presenta infatti un piccolo picco positivo alla stesso valore di temperatura, subito seguito da un picco ben più alto intorno ai 160-170°C. In base ad indagini di letteratura a tale valore di temperatura corrisponderebbe la degradazione degli zuccheri, in questo caso quelli non strutturali, disciolti durante l'estrazione dei polifenoli [116].

Al di sopra di questa temperatura sono visibili altre zone relative probabilmente alla degradazione dei composti impiegati per l'ottenimento della lacca tra cui allume di potassio e carbonato di calcio, quest'ultimo intorno ai 700°C [117]. Da notare che alla fine della prova rimane circa il 60% della massa iniziale attribuibile al CaO derivante dalla calcinazione del CaCO_3 .

L'analisi della lacca di Reseda ci indica come lavorando sopra ai 100°C quasi sicuramente ci sarebbe una perdita totale del colore pertanto potrà essere impiegata laddove i processi di produzione dei materiali da tingere non raggiungono temperature troppo elevate.

Per quanto riguarda lo Scotano (Figura 8.14) si osserva una curva DTG piuttosto diversa dalla precedente; innanzitutto va ricordato che in questo caso non sono presenti reagenti per la precipitazione a pigmento pertanto tutti i picchi osservati rappresentano la perdita di un composto appartenente all'estratto iniziale.

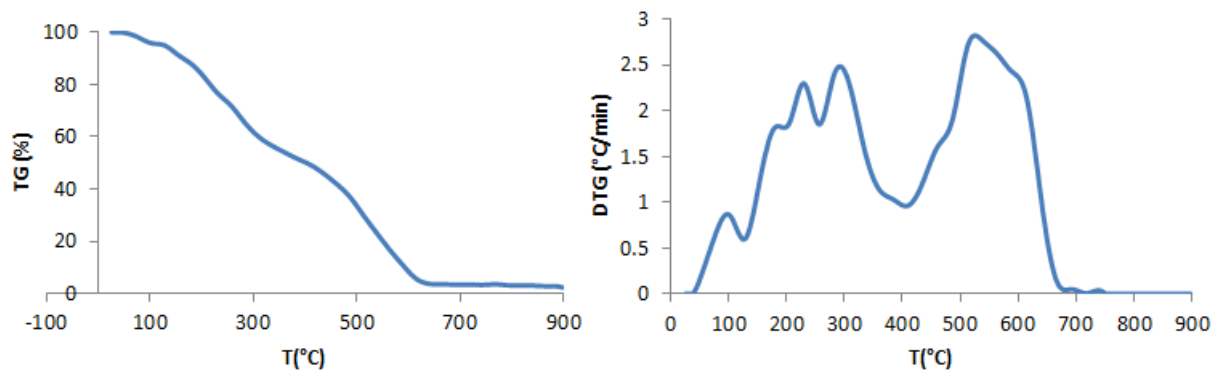


Figure 8-14: Curve TG e DTG relative alla polvere di Scotano

Anche nelle curve TG e DTG dello Scotano è presente il picco a 100°C relativo all'umidità nel campione. Di nuovo il picco relativo a zuccheri e componente polifenoli. Il picco intorno ai 300°C potrebbe essere relativo alla presenza di tannini nell'estratto [118].

8.3 SINTESI DEI RISULTATI

Due specie vegetali, Scotano e Reseda, sono state utilizzate per l'estrazione di molecole coloranti in grado di fornire il colore giallo. Tali specie sono in genere ricche in polifenoli, in particolare in flavonoidi che sono le principali molecole responsabili del colore.

Diverse prove di estrazione sono state effettuate a diversi valori di tempo, temperatura e rapporto solido/liquido e sono state valutate le rese di estrazione (intese come grammi di materiale solido estratto su materiale input) così come le impronte spettrali di tutti gli estratti ottenuti. I valori percentuali di resa di materiale solido estratto su grammi di materiale in input, sono andati da un minimo del 9% ad un massimo del 20% per la Reseda e da un minimo dell' 11% ad un massimo di circa 20% per lo Scotano. I valori massimi si sono riscontrati sempre con un minor carico di solido a dimostrazione del fatto che l'eccesso di solvente favorisce il disciogliersi del materiale. Per quanto riguarda la variabile tempo, i risultati hanno mostrato un andamento crescente di resa, anche se in maniera poco significativa, all'aumentare dei tempi di estrazione per entrambe le specie mentre per quanto riguarda la variabile temperature le migliori performance si sono ottenute lavorando a 100°C.

Sono stati pertanto eseguiti sui campioni con le migliori rese ottenute, saggi di determinazione del contenuto totale in polifenoli (TPC) e flavonoidi (TFC). I valori ottenuti sono stati espressi come acido gallico equivalente su peso secco di materiale di partenza e come mg equivalenti di quercetina su peso secco di materiale di partenza (g), rispettivamente. I valori ottenuti si sono mostrati in linea con dati di letteratura; lo Scotano ha mostrato valori più alti grazie all'alto numero di flavonoidi nella pianta rispetto alla Reseda (150 e 28 mgEq/gPS rispettivamente). Inoltre i dati ottenuti hanno dimostrato come la temperatura, più che il tempo, incidano sull'efficacia di estrazione di tali composti. I saggi TPC e TFC sugli altri campioni estratti, che sono in corso di svolgimento, daranno informazioni aggiuntive a tale riguardo. La presenza di concentrazioni piuttosto elevate di composti fitochimici ad azione antiossidante (fenoli, flavonoidi, tannini) messa in evidenza in queste specie, potrebbe consentire l'applicazione degli estratti vegetali anche nel settore cosmetico ed, in alcuni casi, fitoterapico.

Per quanto riguarda la fase di ricerca, la sperimentazione sta proseguendo con analisi HPLC UV-VIS per identificare le specie maggiormente presenti nei campioni (luteolina, quercetina, catechina, acido gallico) [119]. Inoltre potrà essere svolta analisi LC-MS degli estratti per permettere di individuare tutte le molecole presenti nell'estratto in modo tale da poter attribuire ad ogni picco rilevante all'analisi TGA il composto corrispondente ad avere un'analisi completa del materiale.

È inoltre in fase di sviluppo un metodo di ottimizzazione del processo di estrazione mediante disegno sperimentale e Response Surface Methodology al fine di variare diversi parametri oltre la temperatura ed il tempo, tra cui pH miscela acqua/solvente in diversi rapporti. A tale scopo verranno testati solventi meno impattanti rispetto a quelli tradizionali che al momento in letteratura si confermano quelli capaci di dare le rese migliori (metanolo, etanolo) [106, 119]. Inoltre, dato che i metodi di estrazione tradizionali come il Soxhlet, comportano tempi lunghi ed l'utilizzo di un alto quantitativo di solvente [120] le prossime prove saranno eseguite con metodiche alternative di estrazione in grado di ridurre tempi e costi, riducendo anche l'inquinamento causato dall'utilizzo di solventi in grandi volumi. Tra questi l'estrazione con ultrasuoni [121], mediante microonde [122, 123] o con fluidi supercritici, metodi che si sono dimostrati rapidi ed efficienti per l'estrazione di molecole chimiche da piante.

Sviluppi futuri riguardano inoltre l'utilizzo della componente zuccherina della pianta (circa 30%) per prove di idrolisi enzimatica al fine di una la possibile valorizzazione della componente di scarto del processo di estrazione.

Per quanto concerne invece la parte applicativa, le due polveri ottenute sono al momento state testate come pigmenti per colorare linoleum al fine di ottenere un tipo di pavimentazione totalmente

ecocompatibile e sostenibile. L'analisi TGA ha confermato che le polveri sono in grado di sopportare le temperature utilizzate nel processo di produzione di questa pavimentazione.

CONCLUSIONI DEL LAVORO DI TESI

Questo lavoro di tesi ha voluto dare un contributo alla ricerca riguardante la valorizzazione di biomasse nel concetto moderno di bioraffineria in sostituzione alla raffinazione fossili. Lo scopo della ricerca in questo settore resta infatti quello di creare prodotti bio-based competitivi nel mercato finale in modo da sostituire in parte, od in alcuni casi anche totalmente, i prodotti derivanti dalla raffinazione del petrolio. Infatti, mentre esistono diverse forme alternative di energia primaria valide e consolidate molto ancora c'è da fare riguardo all'ottenimento di bioprodotto tra cui biocarburanti a biochemicals per l'industria.

Il lavoro di tesi è stato articolato in due sezioni principali, la prima riguardante la produzione di biocarburanti di seconda generazione a partire da biomasse lignocellulosiche; la seconda, che si trova ancora in una fase preliminare, riguardante l'ottenimento di coloranti naturali a partire da specie vegetali autoctone.

In riferimento alla sperimentazione sui biocarburanti, lo scopo è stato quello di valorizzare biomasse lignocellulosiche residuali, pertanto largamente disponibili e sostenibili, per la produzione di etanolo e lipidi per un loro eventuale utilizzo come biocarburanti di seconda generazione.

Come sappiamo il processo di **produzione di bioetanolo** a partire da biomasse lignocellulosiche, è ormai maturo e consolidato ed il biocarburante ottenuto può essere utilizzato, puro o miscelato, in sostituzione alla benzina nel settore dei trasporti. Ciononostante è stato interessante valutare quali fossero le rese ottenibili da materiali ritenuti scarti, che sono presenti in larga misura nel territorio nazionale. Buoni risultati sono stati raggiunti per tutte le biomasse. L'utilizzo della SSF ha consentito di ridurre i tempi di trattamento da 96 a 48 ore, ottimizzando ancora il consumo energetico complessivo, i tempi di ottenimento dell'etanolo e di conseguenza i costi della fase di produzione.

Per quanto riguarda invece il processo di **produzione di lipidi** mediante l'utilizzo di microrganismi specifici, la ricerca è sicuramente in una fase meno avanzata. Lo scopo è quello di sostituire olio derivante da specie vegetali con olio prodotto da metabolismo microbico per poi eventualmente convertirlo in biodiesel attraverso transesterificazione, in sostituzione al gasolio nel settore dei trasporti. Alcune specie ed in particolare alcuni ceppi di lieviti si sono infatti dimostrati capaci di crescere ed accumulare lipidi su idrolizzati lignocellulosici. In questa sperimentazione tre ceppi di lieviti basidiomiceti non convenzionali sono stati testati e si sono dimostrati capaci di accumulare lipidi con alte rese. La prima fase di screening dei lieviti è poi proseguita con una scaling-up del processo in modo tale da simulare quanto più possibile un possibile approccio di tipo industriale. L'aspetto di maggiore rilevanza è stato quello legato ai profili lipidici ottenuti dai vari oli estratti. Infatti i lieviti selezionati hanno dimostrato pertanto di poter produrre lipidi con una composizione in termini di acidi grassi molto simile a quella dei più comuni oli vegetali, tra cui, come dimostrato in questo lavoro, anche a quello di olio di mandorle e d'oliva.

Per quanto riguarda invece la sezione di sperimentazione sui biochemicals; questa ha riguardato la produzione di biocoloranti a partire da specie vegetali autoctone. In particolare sono state testate la Reseda ed lo Scotano due piante tintorie in grado di fornire due diverse sfumature di giallo grazie alla presenza di polifenoli, in particolare flavonoidi. L'analisi chimico fisica degli estratti ha permesso di identificare le condizioni migliori per la fase di estrazione in termini di tempo e temperatura di lavoro.

Inoltre, dato che l'utilizzo di coloranti in soluzione è limitato alla tintura di fibre e tessuti, i coloranti ottenuti da Reseda e Scotano in soluzione sono stati precipitati a pigmenti al fine di poter essere applicati su una serie di prodotti che interessano una grossa fetta di mercato. Tali pigmenti sono stati analizzati in termini di coordinate colorimetriche e resistenza alla degradazione termica per valutarne possibili impieghi in diversi rami industriali tra cui quello delle pavimentazioni.

L'idea di implementare sempre più la creazione e l'efficienza delle moderne bioraffinerie è legato strettamente al concetto di sostenibilità. Infatti all'inquinamento ambientale legato all'aumento delle percentuali di anidride carbonica e di altri gas climalteranti nell'atmosfera a quello delle acque di scarico contenenti sottoprodotti tossici (metalli pesanti, solfiti, fenoli) causati da una raffineria del petrolio si contrappone l'effetto positivo dell'utilizzo delle biomasse sul riscaldamento globale. L'impiego delle biomasse per fini energetici non contribuisce infatti ad aggravare il fenomeno in atto dell'effetto serra, poiché la quantità dell'anidride carbonica rilasciata durante la decomposizione, sia che essa avvenga naturalmente sia che avvenga a seguito di processi di conversione energetica (anche attraverso la combustione), è equivalente a quella assorbita durante la crescita della biomassa stessa.

Con le moderne bioraffinerie inoltre si possono limitare tutti quei rischi ambientali legati alle classiche metodiche di lavorazione del greggio utilizzando solventi meno pericolosi, condizioni di pressione e temperatura meno gravosi, così come dimostrato in questo lavoro di tesi.

Appare chiaro quanto siano interessanti gli sviluppi di tali tecnologie per i vantaggi ottenibili sia dal punto di vista economico che da quello dell'ecosostenibilità, data la disponibilità di una vasta e diversificata gamma di prodotti di partenza nonché di possibili prodotti ottenibili. Tali vantaggi ovviamente, aumentano con l'aumentare del livello di integrazione raggiunto all'interno della bioraffineria stessa.

Il concetto di bioraffineria insegue quindi la prospettiva di un futuro in cui le fonti rinnovabili possano aver rimpiazzato i combustibili fossili: le biomasse hanno infatti, come il petrolio, una composizione complessa che permette di ottenere un'ampia gamma di co-prodotti senza tutte le problematiche legate all'utilizzo del petrolio.

LISTA DEI PRINCIPALI ACRONIMI UTILIZZATI

LFC = Lignocellulosic Feedstock Biorefineries

SSF = Simultaneous Saccharification and Fermentation

SE = Steam Explosion

BS = Campione di Biomasse spiaggiate

OL= Campione di Potatura d'olivo

CA = Campione di Cardo

LogR_0 = Fattore di severità del pretrattamento di SE

NREL= National Renewable Energy Laboratory

H% = Percentuale di Emicellulosa

C% = Percentuale di Cellulosa

L% = Percentuale di Lignina

WIS = Water Insoluble Substrate (componente solida derivante dalla SE)

LF = Liquid Fraction (componente liquida derivante dalla SE)

$\text{WIS}_r\%$ = percentuale di solido recuperato dopo il pretrattamento

ED% = Dosaggio enzimatico

OY= Overall Yield (grammi di etanolo ottenuti per 100 grammi di biomassa)

C/N = rapporto carbonio/azoto

FAME = Fatty acid Methyl esters

UFA % = Unsaturated Fatty Acids Percentage

SFA% = Saturated Fatty Acids Percentage

UI= Indice di insaturazione

S/L = rapporto solido/liquido

TPC = Contenuto Totale di Polifenoli

TFC= Contenuto Totale di Flavonoidi

BIBLIOGRAFIA

1. CORDIS, C.e.-. *SFIDE PER LA SOCIETÀ - Azione per il clima, ambiente, efficienza delle risorse e materie prime*. 2013/743/EU del 2013-12-03, 2013.
2. Nizam, A.-S., *Trends & Sustainability Criteria for Biofuels*. pdf. 2016.
3. europea, C., *Roadmap for moving to a competitive low carbon economy in 2050*. 2011.
4. Ricerche, I.S.D.S.e., *La bioeconomia in Europa 2° Rapporto*. 2015.
5. Cherubini, F., *From oil refinery to biorefinery: production of energy and chemicals from biomass*. Ital Biol (Biol Ital), 2009. **5**: p. 44-59.
6. Cherubini, F. and A.H. Strømman, *Production of biofuels and biochemicals from lignocellulosic biomass: Estimation of maximum theoretical yields and efficiencies using matrix algebra*. Energy & Fuels, 2010. **24**(4): p. 2657-2666.
7. Kamm, B., P.R. Gruber, and M. Kamm, *Biorefineries—industrial processes and products*. 2007: Wiley Online Library.
8. FitzPatrick, M., et al., *A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products*. Bioresource Technology, 2010. **101**(23): p. 8915-8922.
9. Kim, J., S. Yun, and Z. Ounaies, *Discovery of cellulose as a smart material*. Macromolecules, 2006. **39**(12): p. 4202-4206.
10. Kamm, B. and M. Kamm, *Biorefinery-systems*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2004. **18**(1): p. 1-7.
11. Ente per le nuove Tecnologie, I.E.e.I.A.-E., *Energia dalle biomasse: tecnologie e prospettive* 2008.
12. Jodice, R. and M. Pin, *I biocarburanti. Le filiere produttive, le tecnologie, i vantaggi ambientali e le prospettive di diffusione*. AREA, Trieste, 2007.
13. Hoekman, S.K., et al., *Review of biodiesel composition, properties, and specifications*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012. **16**(1): p. 143-169.
14. Zhang, Y., et al., *Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment*. Bioresource technology, 2003. **89**(1): p. 1-16.
15. Warabi, Y., D. Kusdiana, and S. Saka, *Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols*. Bioresource technology, 2004. **91**(3): p. 283-287.
16. Zheng, S., et al., *Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil*. Biomass and Bioenergy, 2006. **30**(3): p. 267-272.
17. Di Serio, M., et al., *Synthesis of biodiesel via homogeneous Lewis acid catalyst*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2005. **239**(1): p. 111-115.
18. Knothe, G., *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters*. Fuel processing technology, 2005. **86**(10): p. 1059-1070.
19. Steen, E.J., et al., *Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass*. Nature, 2010. **463**(7280): p. 559.
20. Knothe, G., *“Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties*. Energy & Fuels, 2008. **22**(2): p. 1358-1364.
21. Naik, S.N., et al., *Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. **14**(2): p. 578-597.
22. Lapuerta, M., et al., *Potential for reducing emissions in a diesel engine by fuelling with conventional biodiesel and Fischer–Tropsch diesel*. Fuel, 2010. **89**(10): p. 3106-3113.
23. Subramaniam, R., et al., *Microbial lipids from renewable resources: production and characterization*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2010. **37**(12): p. 1271-1287.
24. Meng, X., et al., *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*. Renewable energy, 2009. **34**(1): p. 1-5.
25. Sitepu, I.R., et al., *Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production*. Biotechnology advances, 2014. **32**(7): p. 1336-1360.
26. Ratledge, C., *Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential [Algae, yeasts, fungi]*. Progress in industrial microbiology, 1982.

27. Sitepu, I.R., et al., *Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species*. Bioresource Technology, 2013. **144**: p. 360-369.
28. Ageitos, J.M., et al., *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. Applied microbiology and biotechnology, 2011. **90**(4): p. 1219-1227.
29. Barakat, A., H. De Vries, and X. Rouau, *Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review*. Bioresource technology, 2013. **134**: p. 362-373.
30. Sun, Y. and J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology, 2002. **83**(1): p. 1-11.
31. Overend, R.P., E. Chornet, and J. Gascoigne, *Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 1987. **321**(1561): p. 523-536.
32. Lim, K.O., *Conversion of Lignocellulosic Biomass to Fuel Ethanol-A Brief Review*. The Planter, 2004. **80**(941).
33. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*. Bioresource Technology, 2000. **74**(1): p. 25-33.
34. Olofsson, K., M. Bertilsson, and G. Lidén, *A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*. Biotechnology for biofuels, 2008. **1**(1): p. 7.
35. Hahn-Hägerdal, B., et al., *Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today*. Trends in biotechnology, 2006. **24**(12): p. 549-556.
36. Walker, L. and D. Wilson, *Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview*. Bioresource technology, 1991. **36**(1): p. 3-14.
37. Patel, S.J., R. Onkarappa, and K. Shobha, *Fungal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production*. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2007. **6**(4): p. 1921-1926.
38. Coombs, J., *Carbohydrate feedstocks: availability and utilization of molasses and whey*. Special publications of the Society for General Microbiology, 1987.
39. Li, Y., Z.K. Zhao, and F. Bai, *High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture*. Enzyme and microbial technology, 2007. **41**(3): p. 312-317.
40. Andrews, J.F., *A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates*. Biotechnology and Bioengineering, 1968. **10**(6): p. 707-723.
41. Chen, C., C. Lin, and J. Chang, *Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **57**(1): p. 56-64.
42. Manzoni, M., *Microbiologia industriale*. 2006: Casa Editrice Ambrosiana.
43. Amaretti, A., et al., *Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785*. Microbial cell factories, 2010. **9**(1): p. 73.
44. Jin, M., et al., *Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges*. Trends in biotechnology, 2015. **33**(1): p. 43-54.
45. Papanikolaou, S. and G. Aggelis, *Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011. **113**(8): p. 1031-1051.
46. Ratledge, C., *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production*. Biochimie, 2004. **86**(11): p. 807-815.
47. Lomoro, A., et al., *Recupero e valorizzazione di residui vegetali spiaggiati di*.
48. Cotana, F., et al., *Driftwood Biomass in Italy: Estimation and Characterization*. Sustainability, 2016. **8**(8): p. 725.
49. ENERGIA, B.E., *CARATTERISTICHE TECNICHE DELLE BIOMASSE E DEI BIOCOMBUSTIBILI*.
50. Firenze, C.d.C.d.C.d., *LE BIOMASSE- Un'analisi su caratteristiche e prospettive del settore rivolta agli operatori agricoli della Toscana*. 2013.
51. ISTAT, *Indagine sulla struttura e sulle produzioni delle aziende agricole*. 2008.
52. Cotana F., C.G., *La valorizzazione energetica delle potature di olivo*. Quaderni Ercole Olivario, 2008. **5**.

53. De Gennaro, B. and A. Pantaleo, *Valorizzazione energetica di residui e sottoprodotti della filiera olivicola-olearia in Italia*. 2011, Agriregionieuropa.
54. Fernández, J., M.D. Curt, and P.L. Aguado, *Industrial applications of Cynara cardunculus L. for energy and other uses*. Industrial crops and Products, 2006. **24**(3): p. 222-229.
55. Fernández, J. and M. Curt. *State-of-the-art of Cynara cardunculus as an energy crop*. in *Proceedings of the 2nd World Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*. 2005.
56. Pari, L., et al., *Global process to improve cynara cardunculus exploitation for energy applications: 2nd annual report*. 2007.
57. Pari, L., et al. *Prototype for Cynara cardunculus capitula threshing and biomass windrowing*. in *17th European Biomass Conference & Exhibition-from research to industry and markets Hamburg 29 June-3 July 2009*. 2009.
58. Cavalaglio, G., et al., *Mass and Energy Flows of Cardoon Oil in a Prototype System for Seeds Milling and Vegetable Oil Treatment and Cogeneration*. Energy Procedia, 2015. **82**: p. 681-686.
59. Encinar, J.M., et al., *Preparation and properties of biodiesel from Cynara C arduunculus L. oil*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1999. **38**(8): p. 2927-2931.
60. Shatalov, A. and H. Pereira, *Biorefinery of Energy Crop Cardoon (Cynara cardunculus L.)-Hydrolytic Xylose Production as Entry Point to Complex Fractionation Scheme*. J. Chem. Eng. Process Technol, 2011. **2**: p. 118.
61. Ballesteros, I., et al., *Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **42**(1): p. 84-91.
62. Filippucci, S., et al., *Study of Holtermanniella wattica, Leucosporidium creatinivorum, Naganishia adeliensis, Solicoccozyma aeria, and Solicoccozyma terricola for their lipogenic aptitude from different carbon sources*. Biotechnology for biofuels, 2016. **9**(1): p. 259.
63. Sluiter, J. and A. Sluiter, *Summative mass closure*. Laboratory analytical procedure_Review and integration. National renewable energy laboratory, 2011.
64. Sluiter, A., et al., *Determination of extractives in biomass*. Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2005. **1617**.
65. Sluiter, A., et al., *Determination of ash in biomass*. National renewable energy laboratory, 2008: p. 1-5.
66. Sluiter, A., et al., *Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL Technical Report No. NREL/TP-510-42621, 2008.
67. Pan, L.-X., et al., *Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities*. Food Technology & Biotechnology, 2009. **47**(2).
68. Aued-Pimentel, S., et al., *Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from Sterculia striata St. Hil. Et Nauds seed oil*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1): p. 235-239.
69. ENEA -Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l.e.e.l.s.e.s., *Caratterizzazione di campioni di carboni e biomasse per applicazioni di generazione di energia elettrica*. 2013.
70. Cotana, F., et al., *A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production*. Industrial Crops and Products, 2015. **69**: p. 424-432.
71. Cotana, F., et al., *Production of Bioethanol in a Second Generation Prototype from Pine Wood Chips*. Energy Procedia, 2014. **45**(0): p. 42-51.
72. Cavalaglio, G., et al., *Response surface methodology for the optimization of cellulosic ethanol production from Phragmites australis through pre-saccharification and simultaneous saccharification and fermentation*. Industrial Crops and Products, 2016. **83**: p. 431-437.
73. Cuevas, M., et al., *Determination of optimal pre-treatment conditions for ethanol production from olive-pruning debris by simultaneous saccharification and fermentation*. Fuel, 2010. **89**(10): p. 2891-2896.
74. Garrote, G., H. Domínguez, and J.C. Parajó, *Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor*. Process Biochemistry, 2002. **37**(10): p. 1067-1073.

75. Ballesteros, I., et al., *Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning*. Bioresource Technology, 2011. **102**(11): p. 6611-6616.
76. Guinda, A., et al., *The isolation and quantification of the components from olive leaf: hexane extract*. Grasas y Aceites, 2002. **53**(4): p. 419-422.
77. Tamaki, Y. and G. Mazza, *Measurement of structural carbohydrates, lignins, and micro-components of straw and shives: effects of extractives, particle size and crop species*. Industrial Crops and Products, 2010. **31**(3): p. 534-541.
78. Cotana, F., et al., *Lignocellulosic Biomass Feeding in Biogas Pathway: State of the Art and Plant Layouts*. Energy Procedia, 2015. **81**: p. 1231-1237.
79. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification*. Bioresource technology, 2000. **74**(1): p. 17-24.
80. Hendriks, A. and G. Zeeman, *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. Bioresource technology, 2009. **100**(1): p. 10-18.
81. Cara, C., et al., *Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning*. Fuel, 2008. **87**(6): p. 692-700.
82. Martín, C., et al., *Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002. **98**(1-9): p. 699.
83. Cara, C., et al., *Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification*. Process Biochemistry, 2006. **41**(2): p. 423-429.
84. Mateo, S., et al., *Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue*. Industrial Crops and Products, 2013. **49**(Supplement C): p. 196-203.
85. Sitepu, I., et al., *An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species*. Journal of microbiological methods, 2012. **91**(2): p. 321-328.
86. Ratledge, C. and J.P. Wynn, *The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*. Advances in applied microbiology, 2002. **51**: p. 1-52.
87. Rungtaphan, W. and J.D. Keasling, *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals*. Metabolic engineering, 2014. **21**: p. 103-113.
88. Tsigie, Y.A., et al., *Lipid production from Yarrowia lipolytica Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate*. Bioresource Technology, 2011. **102**(19): p. 9216-9222.
89. Romero-García, J., et al., *Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends*. Bioresource technology, 2014. **159**: p. 421-432.
90. Ratledge, C., *The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems*. Biotechnology letters, 2014. **36**(8): p. 1557-1568.
91. Kolouchová, I., et al., *Production of palmitoleic and linoleic acid in oleaginous and nonoleaginous yeast biomass*. International journal of analytical chemistry, 2016. **2016**.
92. Ramos, M.J., et al., *Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties*. Bioresource technology, 2009. **100**(1): p. 261-268.
93. Liu, J.n., et al., *Efficient bioconversion of high-content volatile fatty acids into microbial lipids by Cryptococcus curvatus ATCC 20509*. Bioresource Technology, 2017. **239**: p. 394-401.
94. Puig, S. and J.E. Pérez-Ortín, *Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift*. Yeast, 2000. **16**(2): p. 139-148.
95. Mba, O.I., M.-J. Dumont, and M. Ngadi, *Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review*. Food bioscience, 2015. **10**: p. 26-41.
96. Vijay, V., et al., *The impacts of oil palm on recent deforestation and biodiversity loss*. PloS one, 2016. **11**(7): p. e0159668.
97. Clark, J.H., *Green chemistry for the second generation biorefinery—sustainable chemical manufacturing based on biomass*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007. **82**(7): p. 603-609.
98. Knight, D.J., *New EU regulation of chemicals: REACH*. Vol. 16. 2006: iSmithers Rapra Publishing.

99. Cherubini, F. and A.H. Strømman, *Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2011. **5**(5): p. 548-561.
100. Saxena, S. and A. Raja, *Natural dyes: sources, chemistry, application and sustainability issues*, in *Roadmap to sustainable textiles and clothing*. 2014, Springer. p. 37-80.
101. Zollinger, H., *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. 2003: John Wiley & Sons.
102. Padhi, B., *Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation*. International Journal of Environmental Sciences, 2012. **3**(3): p. 940.
103. Ogugbue, C.J. and T. Sawidis, *Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by Aeromonas hydrophila Isolated from Industrial Effluent*. Biotechnology Research International, 2011. **2011**: p. 11.
104. Biertümpfel, A. and G. Wurl, *Dye plants in Europe*, in *Handbook of Natural Colorants*. 2009, John Wiley & Sons, Ltd. p. 37-52.
105. Angelini, L.G., et al., *Agronomic potential of Reseda luteola L. as new crop for natural dyes in textiles production*. Industrial Crops and Products, 2003. **17**(3): p. 199-207.
106. Cristea, D., I. Bareau, and G. Vilarem, *Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (Reseda luteola L.)*. Dyes and Pigments, 2003. **57**(3): p. 267-272.
107. TÜRkmen, N., et al., *An investigation of dye plants and their colourant substances in the eastern Mediterranean region of Turkey*. Botanical Journal of the Linnean Society, 2004. **146**(1): p. 71-77.
108. Antal, D.S., et al., *Cotinus coggygia Wood: Novel Flavanone Dimer and Development of an HPLC/UV/MS Method for the Simultaneous Determination of Fourteen Phenolic Constituents*. Planta Med, 2010. **76**(15): p. 1765-1772.
109. Ivanova, D., et al., *Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **96**(1-2): p. 145-150.
110. Valianou, L., et al., *Phytochemical analysis of young fustic (Cotinus coggygia heartwood) and identification of isolated colourants in historical textiles*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009. **394**(3): p. 871-882.
111. TAVARINI S., A.L.G., *Valorizzazione di specie spontanee per la produzione di coloranti vegetali per produzioni innovative di nicchia e lo sviluppo locale sostenibile*. 2012.
112. DISEASES, B.C.F.A.-R., *Total Phenolic Contents in Green tea, grape products echiancea Products, et al., by UV spectrometric method using gallic acid as standard*. 2001.
113. Sahu, R. and J. Saxena, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.
114. Silva, E., H. Rogez, and Y. Larondelle, *Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology*. Separation and Purification Technology, 2007. **55**(3): p. 381-387.
115. Antal, D.S., et al., *Cotinus coggygia wood: novel flavanone dimer and development of an HPLC/UV/MS method for the simultaneous determination of fourteen phenolic constituents*. Planta medica, 2010. **76**(15): p. 1765-1772.
116. Casazza, A.A., et al., *Pyrolysis of grape marc before and after the recovery of polyphenol fraction*. Fuel Processing Technology, 2016. **153**(Supplement C): p. 121-128.
117. Li, X.-G., et al., *Decomposition kinetic characteristics of calcium carbonate containing organic acids by TGA*. Arabian Journal of Chemistry, 2017. **10**(Supplement 2): p. S2534-S2538.
118. LISPERGUER, J., Y. SARAIVA, and E. VERGARA, *STRUCTURE AND THERMAL BEHAVIOR OF TANNINS FROM Acacia dealbata BARK AND THEIR REACTIVITY TOWARD FORMALDEHYDE*. Journal of the Chilean Chemical Society, 2016. **61**: p. 3188-3190.
119. Koleva, V. and E. Simeonov, *Solid liquid extraction of phenolic and flavonoid compounds from Cotinus coggygia and concentration by nanofiltration*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2015. **28**(4): p. 545-551.
120. Wang, L. and C.L. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(6): p. 300-312.

121. Dey, S. and V.K. Rathod, *Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis**. Ultrasonics Sonochemistry, 2013. **20**(1): p. 271-276.
122. Afoakwah, A., et al., *Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials*. Global Journal of Bioscience and Biotechnology, 2012. **1**(2): p. 132-140.
123. Sinha, K., P.D. Saha, and S. Datta, *Response surface optimization and artificial neural network modeling of microwave assisted natural dye extraction from pomegranate rind*. Industrial Crops and Products, 2012. **37**(1): p. 408-414.