

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

**Dottorato di Ricerca in**

Scienze della Vita

**CICLO**

XXIX

**Processi di trattamento di reflui e materiali di scarto**

**Settore Scientifico Disciplinare ING-IND/24**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Firma

**Supervisore/Tutor:** Ch.ma Prof.ssa Vincenza Calabrò

Firma

**Dottoranda:** Dott.ssa Laura Albo

Firma

*An investment in knowledge  
pays the best interest*

*(cit. Benjamin Franklin)*

# INDICE

Introduzione.....	6
<i>Parte I: Il Progetto RecOIL</i>	
<b>Capitolo 1 - Dall'olio esausto al Biodiesel.....</b>	<b>11</b>
1.1 Descrizione e finalità del progetto <i>RecOIL</i> .....	11
1.2 Il biodiesel come combustibile.....	17
1.3 Gli oli vegetali di partenza.....	20
1.4 Gli oli di frittura esausti (WCOs).....	31
1.5 Le fasi produttive.....	35
1.5.1 La raccolta dei WCOs.....	35
1.5.2 Pretrattamenti.....	36
1.5.3 La reazione di transesterificazione.....	41
1.5.4 Post-trattamenti.....	47
<b>Capitolo 2 - Obiettivi, programmazione e struttura del lavoro di tesi.....</b>	<b>51</b>
2.1 Parte <i>IA</i> : Transesterificazione basica di oli esausti pretrattati e produzione di biodiesel.....	51
2.2 Parte <i>IB</i> : Transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti.....	57
2.2.1 Tipi di lipasi.....	58
2.2.2 Tipi di alcol e alimentazione a <i>step</i> .....	63
2.2.3 Solvente nell'ambiente di reazione.....	66
2.2.4 Cinetica enzimatica.....	67
2.2.5 Obiettivi e programmazione nella transesterificazione enzimatica.....	71
<i>Parte IA: Transesterificazione basica di oli esausti per produzione di biodiesel....</i>	
<b>Capitolo 3A: Materiali e metodi.....</b>	<b>77</b>
3.1A: Materiali utilizzati.....	78
3.2A: Modalità di esecuzione delle prove.....	79
3.2.1A Pretrattamento dell'olio esausto.....	80
3.2.2A Reazione di transesterificazione.....	81
3.2.3A Post-trattamenti.....	84

3.3A: Modalità d'analisi.....	87
3.3.1A Analisi in HPLC.....	87
3.3.2A Analisi in GC.....	93
<b>Capitolo 4A: Risultati.....</b>	<b>102</b>
4.1A Specifiche degli oli.....	102
4.2A Piano sperimentale.....	105
4.2.1A Prove su olio fresco.....	107
4.2.2A Prove sui WCOs.....	111
4.3A Rese del processo.....	117
4.4A Qualità del biodiesel.....	124
<b>Capitolo 5A: Conclusioni.....</b>	<b>139</b>
<i>Parte IB: Transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti.....</i>	<i>143</i>
<b>Capitolo 3B: Materiali e metodi.....</b>	<b>143</b>
3.1B: Materiali utilizzati.....	143
3.2B: Modalità di esecuzione delle prove.....	144
3.2.1B: Preparazione dei campioni.....	145
3.2.2B: Esecuzione delle prove.....	147
3.3B: Analisi in HPLC e metodo di rielaborazione dei dati.....	149
<b>Capitolo 4B: Risultati.....</b>	<b>155</b>
4.1B Fase sperimentale <i>A</i> .....	155
4.2B Fase sperimentale <i>B</i> .....	174
4.3B Fase sperimentale <i>C</i> .....	191
4.4B Confronti tra le prove delle fasi <i>A</i> , <i>B</i> e <i>C</i> .....	198
4.5B Applicazione del modello cinetico.....	201
<b>Capitolo 5B: Conclusioni e sviluppi futuri.....</b>	<b>212</b>
<i>Bibliografia parte I.....</i>	<i>217</i>

<b>Appendice IA</b> .....	228
<b>Appendice IB</b> .....	232
<i>Parte II: Il Progetto Res Novae</i> .....	255
<b>Capitolo 1: Le acque reflue civili e meteoriche</b> .....	256
1.1 Descrizione e finalità del progetto <i>Res Novae</i> .....	256
1.2 Acque reflue civili e meteoriche: Normativa.....	258
1.3 Acque reflue urbane.....	267
<b>Capitolo 2: Processi di trattamento di acque reflue civili e meteoriche</b> .....	277
2.1 Processo di trattamento alternativo: il bioreattore a membrana.....	277
2.2 Trattamenti biologici.....	280
2.3 Filtrazione a membrana.....	285
2.3.1 Le membrane.....	285
2.3.2 Applicazioni di membrane sintetiche.....	289
2.3.3 Configurazioni delle membrane commerciali e geometria dei moduli....	291
2.3.4 Parametri e fattori fondamentali dei processi a membrana.....	296
2.3.5 <i>Fouling</i> .....	299
<b>Capitolo 3: Progettazione di un'installazione di laboratorio con bioreattore a membrana per il trattamento di acque reflue civili e meteoriche</b> .....	307
3.1 Impiego di bioreattori a membrana nel trattamento di acque reflue civili e meteoriche.....	307
3.2 Installazione di laboratorio con bioreattore a membrana.....	312
<b>Bibliografia parte II</b> .....	323

Ringraziamenti

## INTRODUZIONE

Il lavoro di tesi si inquadra nell'ambito dei processi di trattamento di materiali di scarto, come l'olio da cucina esausto e le acque reflue civili e meteoriche, inserendosi in due progetti di ricerca: *RecOil* e *Res Novae*. In entrambi i casi l'obiettivo è rappresentato dalla ricerca di nuove tecnologie di carattere energetico, mirate a contenere l'impatto ambientale e ad accrescere nella popolazione locale una maggiore consapevolezza della questione energetico - ambientale. Il progetto *RecOIL*, relativo alla promozione e al recupero dell'olio da cucina esausto per la produzione sostenibile di biodiesel, si avvale della collaborazione di diversi partners europei ed è promosso dal comune di Castrolibero (CS), in cui ha luogo la raccolta degli oli esausti in un arco temporale di sei mesi. Al Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie del DIMES (Università della Calabria) è affidata la ricerca, l'attività sperimentale e la produzione di biocarburante secondo le fasi, le modalità e i risultati presentati nella parte *I* della tesi. Questa è, a sua volta, suddivisa in due sezioni: la parte *A* esamina e approfondisce il processo di produzione di biodiesel mediante catalisi basica, mentre la parte *B* affronta lo studio della transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti. La struttura della sezione *I* prevede nel capitolo 1 la descrizione del progetto *RecOIL* e le sue finalità, alla luce della situazione europea degli anni precedenti all'avvio di tale iniziativa, insieme con la necessità di rivolgersi verso biocombustibili in sostituzione di *fuels* di origine fossile. La letteratura scientifica è ricca di riferimenti al biodiesel e agli oli vegetali da cui è ottenuto mediante transesterificazione; un'analisi dettagliata di tali oli coinvolge la classificazione comune e le principali proprietà chimiche. Gli oli di frittura esausti (*Waste Cooking Oils WCOs*) rappresentano una soluzione alternativa all'impiego degli oli freschi, molti dei quali destinati al mercato alimentare; in questo modo oltre a superare la questione etica *food versus fuel*, si affronta il recupero e il riutilizzo di prodotti di scarto come materia prima per processi competitivi. Le caratteristiche dei WCOs e le fasi produttive del processo, raccolta e pretrattamenti dei lotti di oli esausti,

transesterificazione in ambiente basico con ottenimento di una miscela esterea grezza e successivi trattamenti di purificazione per ottenere il biodiesel finale, chiudono il primo capitolo. Il capitolo 2 della parte *I* definisce gli obiettivi, la programmazione e la struttura del lavoro di tesi relativo alla transesterificazione basica ed enzimatica di oli freschi ed esausti, esaminando nel dettaglio le specifiche degli oli e la normativa europea di riferimento UNI EN 14214 nella parte *A*, e approfondendo i diversi aspetti legati alle lipasi, all'inibizione dell'alcol sull'enzima e alla cinetica enzimatica, espressa sulla base del meccanismo Ping Pong Bi Bi, mediante il quale si ricava l'espressione della velocità di reazione nei casi esaminati. Insieme con gli obiettivi prefissati, si riporta anche il piano dettagliato delle prove per le parti *A* e *B*. A questo punto la parte *I* si divide nelle due sezioni già citate, per cui la sezione *IA* si avvale dei capitoli 3A, 4A e 5A; così come i capitoli 3B, 4B e 5B costituiranno la parte *IB* della tesi. Il capitolo 3A illustra i materiali e i metodi impiegati nel pretrattamento degli oli esausti provenienti dalla raccolta nell'ambito del progetto *RecOIL*, nella transesterificazione di oli freschi (in prima analisi) e di oli esausti con diverse caratteristiche nell'impianto di reazione considerato, e nei post-trattamenti per la purificazione del biodiesel prodotto. In seguito si descrive la modalità di analisi in cromatografia liquida e gassosa e il metodo di ottenimento e rielaborazione dei dati ottenuti, con particolare riferimento alla valutazione qualitativa e quantitativa degli esteri alchilici di acidi grassi, oltre che alla composizione dei campioni di reazione, intermedi e finali. Nel capitolo 4A si esaminano le specifiche dei diversi campioni di WCOs e, illustrate nel dettaglio le condizioni operative delle prove sperimentali, si riportano e discutono i risultati rielaborati di alcune prove significative (in Appendice *IA* saranno riportati i dati relativi a tutte le prove), allo scopo di valutare l'effetto di alcuni parametri sulla performance della reazione e sull'intero processo, soprattutto in termini di valutazione della resa finale in esteri. Il confronto di tali valori per le prove considerate potrà fornire importanti indicazioni per la produzione di 30 litri di biocarburante previsti. A questo proposito si esamineranno i risultati di altre prove sperimentali condotte su specifici lotti di WCOs, caratterizzate dalle condizioni operative ottimali individuate poco prima, ma da alcune differenze nei pre- e post-trattamenti, analizzando per ciascun campione di biocombustibile i parametri della normativa di riferimento e valutandone la qualità. L'analisi complessiva del processo implementato è affidata al capitolo 5A, in cui si presenta e motiva la transesterificazione enzimatica come valida alternativa a quella

basica. La parte *IB* presenta la stessa struttura della sezione *A*: il capitolo 3B illustra i materiali e le modalità di esecuzione delle prove, suddivise in tre fasi sperimentali; inoltre, riprende e approfondisce la metodologia di analisi in cromatografia liquida, e mostra il metodo di rielaborazione dei dati nel caso di alimentazione a *step* dell'alcol. I risultati ottenuti e relativi confronti saranno analizzati dettagliatamente nel capitolo 4B per le prove più significative (anche per la parte *IB* in Appendice si mostrano i risultati di tutte le prove) per le tre fasi; a conclusione del capitolo si riportano l'applicazione del modello cinetico, presentato nel capitolo 2, al caso degli oli esausti e il calcolo dei parametri cinetici per tale modello. Al capitolo 5B sono affidate considerazioni e conclusioni sulla reazione di transesterificazione enzimatica, esaminata in diverse condizioni, e tutto ciò apre il campo a nuovi sviluppi del processo; fra questi si individua l'impiego della miscela esterea prodotta come materiale a cambiamento di fase (*Phase Change Material PCM*, nell'ambito del suddetto progetto Res Novae, per l'attività "Condizionamento innovativo, materiali involucro e uso dei PCM"), in seguito alla valutazione delle sue caratteristiche.

La parte *II* si inquadra nel progetto PON 042 a-E RES NOVAE (Reti Edifici Strade Nuovi Obiettivi Virtuosi per l'Ambiente e l'Energia) PON R&C 2007 - 2013 e coinvolge le città di Cosenza e Bari, avvalendosi di diverse collaborazioni: la Divisione Infrastrutture e Reti di Enel (capofila del progetto), General Electric e IBM, Asperience ed Elettronika, CNR, Enea (nel ruolo di Responsabilità Scientifica dell'intero progetto), Politecnico di Bari e Università della Calabria. L'attività di ricerca condotta da quest'ultima si propone di contribuire significativamente allo sviluppo di nuove ed innovative soluzioni tecnologiche e gestionali, il cui obiettivo è la promozione del recupero, della produzione e della gestione integrata delle fonti energetiche rinnovabili e dei relativi sistemi di distribuzione. Nell'ambito dell'attività AR 2.1.4\_RSN "Modellistica sperimentazioni impianti generazione diffusa a fonti rinnovabili" si inserisce il contributo relativo alla ricerca e progettazione di un impianto di trattamento delle acque reflue civili e meteoriche, presentato nella parte *II* del lavoro di tesi. Questa si compone di tre capitoli: nel primo si illustrerà la normativa di riferimento (D. Lgs 152/2006, D. Lgs 4/2008, Decreto Ministeriale 06.11.2003 n°367) che disciplina gli scarichi delle acque reflue, con parametri e limiti previsti soprattutto per le acque reflue urbane. Alla luce di ciò, nel capitolo 2, per tali acque si esamina una soluzione di trattamento alternativa, rappresentata dall'impiego del bioreattore a membrana

(*Membrane BioReactor MBR*), che unisce al processo di ossidazione biologica un'unità di filtrazione (solitamente ultrafiltrazione UF) con membrana. Si approfondiranno gli aspetti relativi alla bioreazione, così come quelli riguardanti le membrane nelle applicazioni recenti, oltre all'individuazione delle configurazioni e geometrie dei moduli, ai parametri e ai fattori fondamentali del processo, e ai fenomeni più rilevanti che possono aver luogo, come la polarizzazione per concentrazione CP e il *fouling* della membrana stessa. La possibilità di impiego dei MBRs nel trattamento di reflui civili e meteorici contenenti idrocarburi e metalli pesanti è affidata al capitolo 3, in cui si progetta l'impianto con bioreattore a membrana, valutando le caratteristiche di ogni unità e predisponendo un sistema di acquisizione e controllo dati; si presenterà, infine, l'impianto di laboratorio realizzato e la pianificazione del processo nella definizione dei materiali e metodi da impiegare.

Quindi, l'obiettivo di tutto il lavoro di tesi è rappresentato dall'implementazione di soluzioni tecnologiche eco-sostenibili di trattamento di reflui e riutilizzo dei materiali di scarto, nel rispetto di un corretto percorso di ricerca.

*Parte I*

## Parte I: Il Progetto RecOIL

### Capitolo 1: Dall'olio esausto al Biodiesel

#### 1.1 Descrizione e finalità del progetto RecOIL

Con il termine RecOIL ci si riferisce al progetto dal titolo “Promozione e recupero dell’olio da cucina esausto per la produzione sostenibile di Biodiesel”, promosso dalla Comunità Europea attraverso il programma *Intelligent Energy Europe* (IEE) e realizzato a livello locale dal comune di Castrolibero, insieme con il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie del Dipartimento di Ingegneria Informatica, Modellistica e Sistemi (DIMES) dell’Università della Calabria. Scopo principale di tale progetto è aumentare la produzione sostenibile di Biodiesel e la sua diffusione nel mercato locale, promuovendo ed incentivando la raccolta porta a porta degli oli da cucina esausti e la loro successiva trasformazione in biocombustibile.

Con gli acronimi *UCOs* e *WCOs* (*Used e Waste Cooking Oils*) si indicano gli oli e i grassi usati dalle industrie alimentari, dai ristoranti, dai *fast foods* o nei processi casalinghi per cucinare o friggere. I *WCOs* possono essere formati da grassi e oli sia di tipo vegetale che animale; il consumo di una particolare tipologia è legato principalmente alla disponibilità offerta dal territorio e alle attività agricole svolte. Nello specifico è stato stimato che circa il 90% degli oli e dei grassi impiegati per la cucina in Europa è di tipo vegetale; costituisce un’eccezione il Belgio, dove si utilizzano grandi quantità di oli e grassi di tipo animale (Peters et al., 2013). L’olio da cucina esausto, pur rappresentando una sostanza altamente inquinante, non ha una specifica normativa che ne regola il corretto smaltimento a livello domestico. Da alcune ricerche condotte in territorio europeo si è stimato che la produzione annuale di *WCOs* potrebbe raggiungere gli 8 litri pro-capite; da una prima estrapolazione, basata su una

popolazione di circa 500 milioni, si otterrebbe una quantità di circa 4 Mton di oli esausti su base annua (Anderssen et al. 2007).

Nel triennio 2012 - 2015 il progetto RecOIL ha promosso il recupero dei *WCOs* e la loro valorizzazione tramite la produzione di biodiesel, abbattendo i costi legati ad un eventuale smaltimento e nello stesso tempo limitando gli effetti negativi relativi all'impatto ambientale. Con l'obiettivo di sviluppare e studiare i vari aspetti cruciali legati al recupero e successiva trasformazione degli oli esausti in biodiesel si parte dalla ricerca di buone ed efficienti pratiche di raccolta porta a porta degli oli a livello domestico, presso strutture alberghiere, ristoranti, mense o altre strutture non private (queste ultime, invece, sono già formate alla raccolta di olio esausto sia per le quantità prodotte che per le stringenti leggi locali e nazionali, attuando una corretta procedura per il suo smaltimento). Di contro per i singoli privati si riscontra una situazione opposta, legata alla lacunosa educazione in materia e alla critica gestione di smaltimento di piccole quantità per ogni famiglia. Allo scopo di divulgare il progetto e sensibilizzare la popolazione locale, cercando allo stesso tempo di migliorare l'efficienza della raccolta dell'olio esausto, sono state messe a punto diverse campagne pubblicitarie; tale propaganda è parte integrante del progetto stesso, perché ne evidenzia le finalità, indirizzando la maggior parte della popolazione alla partecipazione e alla raccolta degli oli esausti. A questo scopo si è partiti con una campagna di informazione disseminata sul territorio locale, illustrando i punti salienti del progetto RecOIL ai cittadini, attraverso dei *meetings* con la popolazione e successivamente coinvolgendo sia le associazioni comunali presenti che le strutture scolastiche.

Questa fase iniziale ha prodotto buoni risultati, come si evince dalla figura 1.1, in cui si registra un notevole aumento della quantità di olio esausto nel tempo, in linea con una maggiore diffusione delle attività di formazione e informazione.

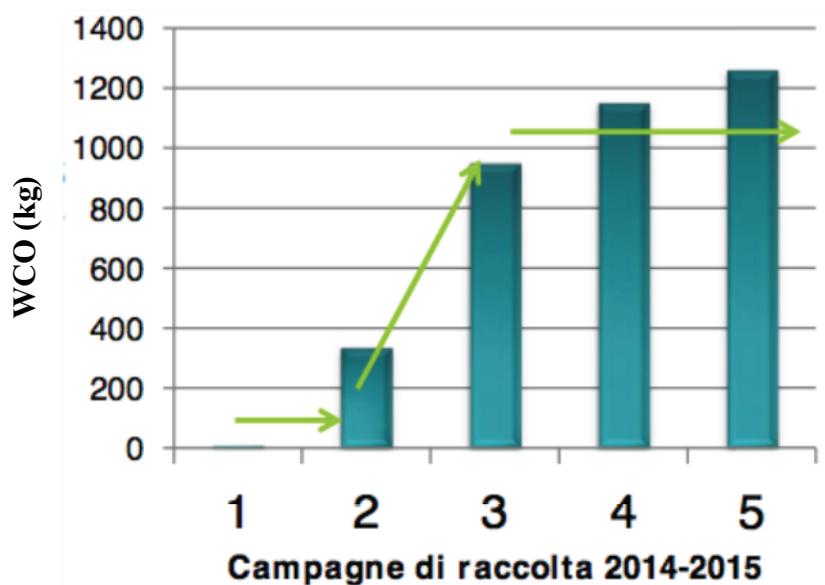


figura 1.1: Quantità di WCOs raccolti nelle 5 campagne caratterizzanti il progetto RecOIL

L'olio raccolto è così destinato al Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie del DIMES, dove si svolge l'attività di ricerca relativa al trattamento degli oli esausti e alla loro conseguente conversione in biodiesel; inoltre, si accerta la qualità del biocarburante prodotto, anche mediante analisi dettagliate presso laboratori esterni certificati. La fase conclusiva del progetto prevede l'utilizzo del biodiesel, così prodotto, come carburante per un mezzo comunale. La "filiera corta", che va dalla raccolta dell'olio al riutilizzo del biofuel prodotto e utilizzato pertanto in un ambito territoriale ristretto, costituisce un altro punto di forza del progetto RecOIL. Il progetto ha una ricaduta in ambito locale, ma si avvale di collaborazioni e partenariati ad ampio raggio. Infatti, i *partners* scientifici ed industriali sono disseminati in tutta Europa - la loro localizzazione è mostrata in figura 1.2 - e di seguito elencati:

- Energy and Environment Agency of Arrábida (Portogallo)
- Factor Social (Portogallo)
- Technic University of Crete (Grecia)
- Local Energy Management Agency of Cosenza (Italia)
- Energy Management Agency Province of Cádiz (Spagna)
- Regional Energy Agency for Barreiro, Mota, Montijo and Alcolete (Portogallo)

- ElinBiofuels SA. (Grecia)
- ETA s.r.l. (Italia)
- Municipality of Castrolibero (Italia)
- European Biomass Industry Association (Belgio)
- Agro Business Park (Danimarca)



figura 1.2: Posizione geografica dei partners del progetto RecOIL

Nelle fasi iniziali del progetto RecOIL sono stati analizzati complessivamente 44 sistemi di raccolta (1 in Belgio, 3 in Spagna, 6 in Grecia, 9 in Italia e 25 in Portogallo), il cui confronto ha permesso di individuare i punti in comune ed i fattori critici da considerare. Si evidenziano i seguenti aspetti in comune:

1. In tutti i casi, con qualche rara eccezione, le autorità locali o enti locali - in particolare le società locali per la gestione energetica e dei rifiuti - sono i principali promotori dell'iniziativa. Il loro sostegno è fondamentale per il coinvolgimento dei cittadini.

2. Le aziende che raccolgono l'olio sono spesso coinvolte nel trasporto e nel processo di trasformazione (63% dei casi analizzati).
3. La metodologia di raccolta più utilizzata prevede la localizzazione dei centri di raccolta dell'olio in luoghi pubblici di aggregazione come scuole, supermercati, parcheggi, edifici comunali ecc. (33 dei 44 sistemi analizzati adottano questa tipologia di raccolta). I punti di raccolta sono collocati in luoghi facilmente raggiungibili (a brevi distanze) e che solitamente attirano un gran numero di persone. Le scuole sono i luoghi più utilizzati per la raccolta dell'olio.
4. Nella maggior parte dei casi, l'olio esausto viene consegnato dai cittadini in bottiglie o contenitori forniti dalla società che si occupa della raccolta (60% dei casi analizzati). La raccolta e la consegna del prodotto devono essere quanto più semplici possibili. In diversi casi vengono forniti appositi imbuto per facilitare la raccolta dell'olio in bottiglie di plastica. Anche le attività promozionali possono essere utili, come concorsi o premi per i cittadini (ad esempio olio vergine di oliva in cambio di olio esausto).
5. Nella maggior parte dei casi l'olio esausto è scambiato con beni e servizi (57% dei casi analizzati). In molti casi è scambiato con biodiesel stesso (1 litro di biodiesel per 7 litri di olio esausto o il 5% dell'olio raccolto annualmente), oppure con detersivi o detergenti. In diversi casi i proventi della trasformazione dell'olio esausto sono utilizzati per l'organizzazione del sistema di raccolta e trasporto o per la creazione di materiale promozionale e l'organizzazione di campagne informative.
6. Nella maggior parte dei casi l'olio esausto raccolto è destinato alla produzione di biodiesel (88% dei casi analizzati). Spesso il biodiesel prodotto viene venduto sul mercato (38%), e in qualche caso fornito agli enti locali per l'utilizzo dei mezzi comunali (14%).
7. In quasi tutti i casi analizzati è prevista una massiccia campagna promozionale e diverse attività informative: pubblicazione delle iniziative sui giornali locali, diffusione attraverso volantini, opuscoli, manifesti, cartelloni

pubblicitari, scritte sui veicoli, programmi televisivi, talk show radiofonici, siti web, social media e messaggi sui contenitori della raccolta. È previsto spesso un ampio coinvolgimento di *stakeholders* locali, per esempio, condomini, associazioni di consumatori, ONG, supermercati, aziende locali di gestione di rifiuti. In particolare, il coinvolgimento delle scuole è molto comune: visite a scuola e *workshop* con insegnanti e genitori rappresentano un momento molto importante di divulgazione.

Dalle informazioni raccolte e dagli studi preliminari, mirati a lanciare il progetto pilota prima e RecOIL dopo, sono stati individuati alcuni punti critici:

1. manutenzione ed igiene dei contenitori di raccolta (perdite di olio per le strade);
2. mancanza di consapevolezza dei cittadini;
3. eccessiva distanza dai punti di raccolta;
4. contaminazione dell'olio con altre sostanze come l'olio minerale (es. per autotrazione);
5. contaminazione dell'olio con rifiuti urbani (plastica, vetro, organico, ecc.);
6. quantità di olio raccolto non sufficiente a soddisfare le esigenze dei produttori di biodiesel.

## 1.2 Il biodiesel come combustibile

La prosperità della civiltà contemporanea è basata sulla richiesta e fornitura dell'energia in ogni settore dell'economia. Sono sempre più numerosi i Paesi che approvano riforme economiche e attuano piani di sviluppo che comportano un maggior impiego delle risorse energetiche mondiali. Soprattutto nel settore dei combustibili il petrolio e i suoi derivati hanno rappresentato finora la voce predominante su scala mondiale; tuttavia, è necessario che la comunità scientifica e quella politica facciano i conti con le disponibilità dei *fuels* di origine fossile, considerando al loro posto l'impiego di combustibili rinnovabili.

Nel settore dei trasporti, in particolare, il diesel gioca un ruolo importante e il suo consumo è proporzionale allo sviluppo economico della società. La sua scarsa disponibilità nei prossimi decenni e questioni di carattere ambientale riguardo alle emissioni dei motori diesel rendono il biodiesel - termine coniato nel 1984 - un'alternativa vantaggiosa. Quest'ultimo è definito come "un combustibile costituito da esteri monoalchilici di acidi grassi a catena lunga, ottenuti da oli vegetali o grassi animali e designati col termine B100; tale *fuel* deve presentare le caratteristiche previste e rientrare nei limiti indicati dalla normativa americana ASTM D-6571 o europea UNI EN 14214".

La possibilità e l'importanza dell'impiego di oli vegetali come combustibile nei motori diesel furono riconosciute già da Sir Rudolf Diesel, il quale è ricordato per il discorso alla Engineering Society di St. Louise, Missouri, del 1912: "*The use of vegetable oils for engine fuels may seem insignificant today, but such oils may become in the course of time as important as petroleum and the coal tar products of the present times*". Tuttavia nei decenni successivi, in particolare negli anni '30 e '40 del XX secolo, gli oli vegetali furono utilizzati come combustibili e sostituti del diesel solo in caso di emergenza (Sarin A., 2012). Gli oli vegetali hanno valori di viscosità maggiori del combustibile diesel presente in commercio. Ciò riduce le prestazioni dei motori diesel, causando anche un accumulo di materiali di deposito ed il loro sporcamento (Pryde, 1983; Darnoko & Cheryan, 2000). Perciò sono stati sviluppati diversi metodi per ridurre la viscosità degli oli vegetali, quali la diluizione o *blending* (Ziejewski et al., 1986; Karaosmonoglu, 1999; Singh S.P. & Singh D., 2010), la microemulsificazione (Goering C.E., 1984; Schwab et al., 1988; Jain S. & Sharma M.P., 2010), la pirolisi o *thermal*

*cracking* (Schwab et al, 1987; Demirbas, 2008) e la transesterificazione. Quest'ultima rappresenta il processo più sostenibile, attraverso il quale, in presenza solitamente di un catalizzatore, un olio o un grasso reagisce con l'alcol per formare il glicerolo e una miscela di esteri alchilici, nota col termine di biodiesel. Il biodiesel puro o 100% è indicato, appunto, con la sigla B100; mentre una miscela di biodiesel e petrodiesel è nota come *blend* BXX, in cui XX rappresenta la percentuale di biodiesel nella miscela stessa.

Diversi sono i vantaggi nell'impiego del biodiesel come *fuel* alternativo a quello di origine fossile: è efficiente dal punto di vista energetico; è biodegradabile (Agarwal & Das, 2001); è rinnovabile, potendosi ottenere da materie prime agricole o riciclate; può essere utilizzato nella maggior parte dei motori diesel senza che questi siano sottoposti a sostanziali modifiche - il B20 può essere direttamente impiegato nei motori senza apportare cambiamenti -, aiutando anche nella lubrificazione dei motori stessi; è un prodotto a basso impatto ambientale rispetto al diesel ottenuto dal petrolio, sia perché non contiene zolfo, ma anche per le ridotte emissioni di idrocarburi incombusti, fumi, anidride carbonica e gas serra (Peterson et al., 1996; Yoshiyuki, 2000; Kalligeros et al., 2003; Frijters & Baert, 2006; Tat et al., 2007; Meng et al., 2008; Utlu & Kocak, 2008; Banapurmath et al., 2009; Li C. & Li R., 2009; Lin et al., 2009; Luj et al., 2009; Ozsezen et al., 2009; Ulusoy et al., 2009; Wu et al., 2009; Aydin & Bayindir, 2010; Gumus & Kasifoglu, 2010; Muralidharan et al., 2011).

In particolare il biodiesel contiene l'ossigeno legato alla sua struttura chimica, migliorando in questo modo le caratteristiche della combustione, come si evince dalla figura 1.3:

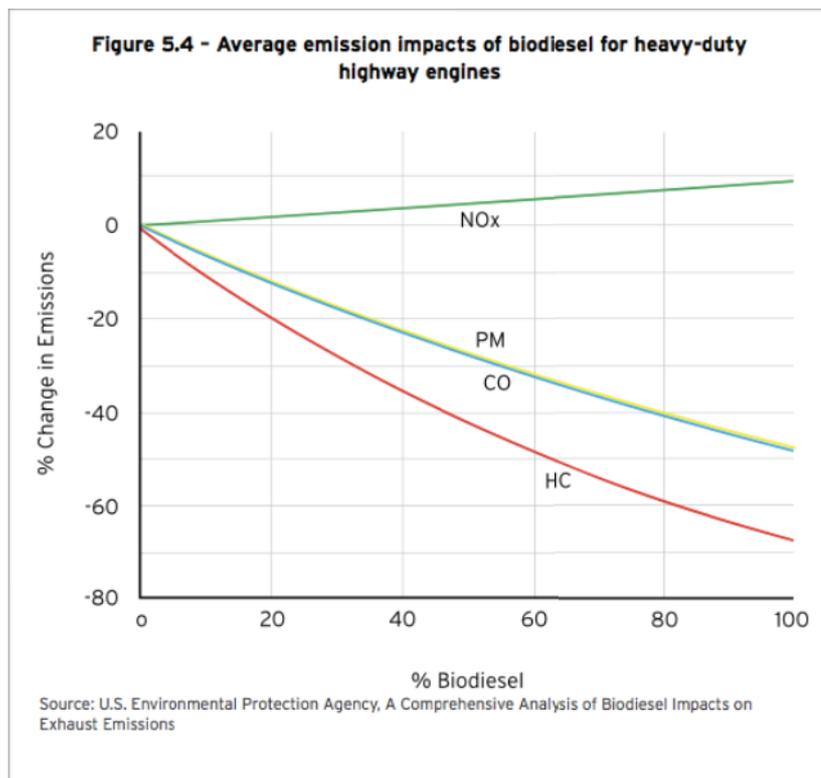


figura 1.3: *Analisi dell’impatto del biodiesel sulle emissioni di idrocarburi incombusti, particolati, monossido di carbonio e NOx (Filemon, 2010)*

Il biodiesel insieme con il bioetanolo rappresentano i tipi principali di *biofuels* liquidi, cioè di *fuels* (liquidi in questo caso) derivati dalla biomassa.

Il costo del biodiesel, comunque, rappresenta il principale ostacolo alla commercializzazione del prodotto. Dal punto di vista ingegneristico si può lavorare sulla possibilità di realizzare un processo in continuo con eventuale purificazione e recupero del sottoprodotto (glicerolo) di alta qualità, ma soprattutto si intende valutare e approfondire gli aspetti legati alle materie prime - con particolare riguardo all’utilizzo di oli esausti -, alla reazione di transesterificazione e ai suoi parametri, nonché alla purificazione della miscela esterea.

### 1.3 Gli oli vegetali di partenza

Gli oli di soia, palma e girasole, ad esempio, sono considerati di prima generazione nella produzione di biodiesel, perché sono le prime colture impiegate per la produzione di tale *biofuel*; mentre *feedstocks* non edibili quali l'olio di jatropha, mahua, jojoba, salmone, mango di mare, oli di frittura esausti (*WCOs*) e i grassi animali sono di seconda generazione (Najafi et al., 2011). I ricercatori hanno anche concentrato la loro attenzione su materie prime di terza generazione quali gli oli ottenuti da microalghe (Ahmad et al., 2010).

A tal proposito nelle tabelle 1.1 e 1.2 si riportano rispettivamente gli oli edibili e quelli non edibili, che si riscontrano maggiormente nella produzione di biodiesel.

Oli edibili		
colza ( <i>Brassica napus L.</i> )	soia ( <i>Glycine max</i> )	girasole ( <i>Helianthus annuus</i> )
cocco ( <i>Cocos nucifera</i> )	palma ( <i>Elaeis guineensis</i> )	<i>Moringa oleifera</i>
nocciola ( <i>Corylus avellana</i> )	melone ( <i>Cucumis melo</i> )	noce ( <i>Juglans regia L.</i> )
euforbia ( <i>Asclepias syriaca</i> )	mais ( <i>Zea mays L.</i> )	arachide ( <i>Arachis hypogea L.</i> )
<i>Balanites aegyptiaca</i>	<i>Brassica carinata</i>	<i>Guindilia trinervis</i>
<i>Moringa oleifera</i>	<i>Pistacia chinensis</i>	crusca di riso ( <i>Oryza sativum</i> )
<i>Syagrus coronata</i>	<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	sesamo ( <i>Sesamum indicum L.</i> )
oliva ( <i>Olea europaea</i> )	lino ( <i>Linum usitatissimum</i> )	cartamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> )

tabella 1.1: Oli edibili comunemente utilizzati nella produzione di biodiesel

<b>Oli non edibili</b>		
ricino ( <i>Ricinus communis</i> L.)	<i>Moringa pterygosperma</i>	cotone ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)
mahua ( <i>Maduca indica</i> )	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Melia azedarach</i>
<i>Argemone mexicana</i> L.	<i>Datura stramonium</i> L.	<i>Pongamia pinnata</i>
<i>Azadirachta indica</i>	<i>Jatropha curca</i> L.	<i>Prunus sibirica</i> L.
<i>Calophyllum inophyllum</i>	<i>Scleicheria triguga</i>	<i>Putranjiva roxburghii</i>
<i>Carnegiea gigantean</i>	<i>Shorea robusta</i>	<i>Sapindus mukorossi</i>
<i>Cerbera odollam</i>	<i>Sterculia striata</i>	jojoba ( <i>Simmondsia chinensis</i> )
<i>Croton megalocarpus</i>	<i>Thespesia populnea</i> L.	<i>Terminalia belerica</i> Roxb.
<i>Thevetia peruviana</i>	tung ( <i>Vernicia montana</i> )	<i>Ziziphus mauritiana</i>

tabella 1.2: Oli non edibili comunemente utilizzati nella produzione di biodiesel

La coltivazione delle diverse tipologie di piante e la quantità di olio che si può estrarre costituiscono dei parametri importanti. A tal proposito nella tabella 1.3 si riportano le quantità di oli estratti sulla quantità di pianta/coltivazione (semi o foglie generalmente) processata. Sebbene questi dati abbiano carattere indicativo, rappresentano tuttavia un buon indice della resa del processo di estrazione dell'olio, diventando così un parametro per la valutazione dei costi del processo stesso.

<b>tipo di coltivazione</b>	<b>kg olio/100 kg raccolto</b>
semi di olio di ricino	50
polpa di cocco essiccata	62
semi di cotone	13
noccioli di arachide	42
senape	35
frutti di palma	20
noccioli di palma	36
colza	37
sesamo	50
soia	14
girasole	32

tabella 1.3: Dati di estrazione di alcuni oli (Calais et al., 2012)

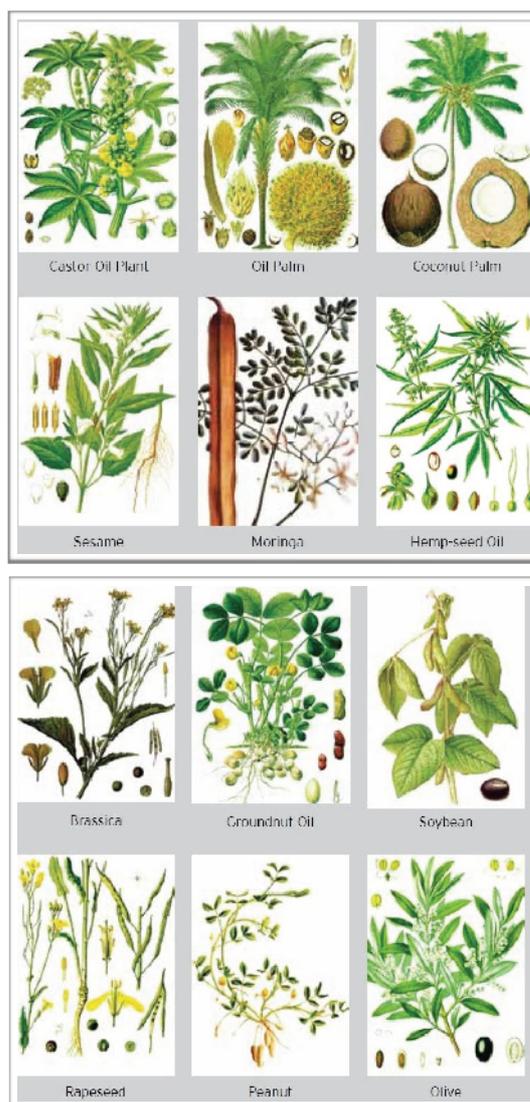


figure 1.4 e 1.5: *Alcuni tipi di piante da cui si estraggono gli oli vegetali*

Da una prima osservazione risulta che maggiore è la quantità di olio ottenuto per unità processata, più alta è la resa e minore il costo del processo. Come accennato prima, questo parametro è importante ma indicativo, in quanto non tiene conto degli *steps* (e quindi dei costi complessivi) di tutto il processo di estrazione (Sarin, 2012).

Un altro importante parametro dal punto di vista commerciale è la quantità di olio prodotta ed estratta per unità di area di terreno destinata a tale coltivazione. Nella tabella 1.4 sono riportati diversi valori di tale parametro:

<b>tipo di coltivazione</b>	<b>kg olio/ ha</b>	<b>litri olio/ ha</b>
mais	145	172
anacardio	148	176
avena	183	217
lupino	195	232
calendula	256	305
cotone	273	325
canapa	305	363
soia	375	446
semi di lino	402	478
nocciole	405	482
semi di zucca	449	534
coriandolo	450	536
semi di senape	481	572
sesamo	585	696
cartamo	655	779
riso	696	828
tung	790	940
girasoli	800	952
cacao	863	1026
arachidi	890	1059
colza	1000	1190
olive	1019	1212
semi di ricino	1188	1413
noci pecan	1505	1791
jojoba	1528	1818
jatropha	1590	1892
noci macadamia	1887	2246
noci brasiliane	2010	2392
avocado	2217	2638
cocco	2260	2689
palma	5000	5950

tabella 1.4: Valori tipici di resa dei diversi tipi di oli (Calais, 2012)

Da questi valori si deduce che la coltivazione di palma consente di ottenere la più alta resa, seguita dal cocco; mentre il mais fornisce il valore minore di resa. Tuttavia questo parametro non tiene conto di altre voci importanti come acqua, fertilizzante, energia, manodopera sia per il raccolto che per il processo.

Da un punto di vista chimico gli oli - così come i grassi - sono costituiti da acilgliceroli, in particolare da triacilgliceroli con piccole quantità di diacilgliceroli e monoacilgliceroli. Gli acilgliceroli, noti anche come gliceridi, derivano dalla naturale esterificazione degli acidi grassi col glicerolo, per sostituzione dei gruppi ossidrilici di quest'ultimo (Bagatti et al., 2010). Proprio in base al numero dei gruppi ossidrilici del glicerolo sostituiti si ottengono i monogliceridi, digliceridi e trigliceridici. Inoltre, se le tre molecole di acidi grassi che esterificano il glicerolo sono uguali, il composto prende il nome di triacilglicerolo semplice. I triacilgliceroli misti, invece, contengono due o tre acidi grassi diversi e sono molto più comuni di quelli semplici.

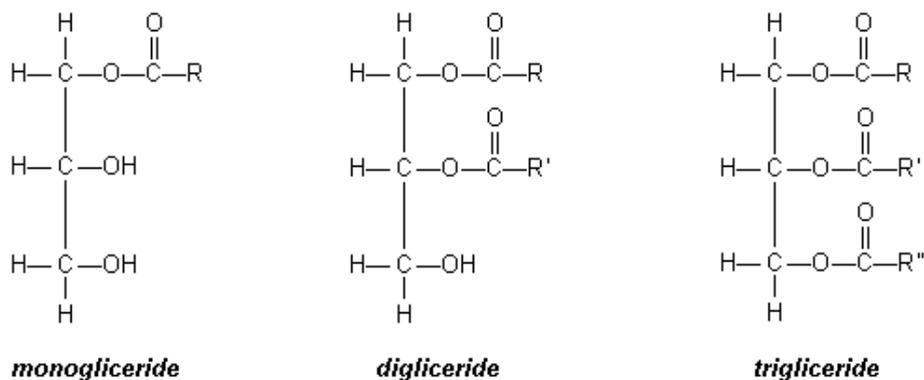


figura 1.6: Formule di struttura dei gliceridi

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici aventi lunghe catene idrocarburiche. In tabella 1.5 si riportano quelli più frequentemente ritrovati in natura e in tabella 1.6 quelli maggiormente presenti nei grassi e oli vegetali, con le relative temperature di fusione (Bruice, 2012):

Atomi di C	Composizione	Nome comune [nome IUPAC]	Not. abbr.
4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	ac. butirrico [ac. butanoico]	C4:0
6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	ac. caprinico [ac. esanoico]	C6:0
8	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	ac. caprilico [ac. ottanoico]	C8:0
10	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	ac. caprico [ac. decanoico]	C10:0
12	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	ac. laurico [ac. dodecanoico]	C12:0
14	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	ac. miristico [ac. tetradecanoico]	C14:0
16	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	ac. palmitico [ac. esadecanoico]	C16:0
16	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ac. palmitoleico [ac. (9Z)-esadecenoico]	C16:1
18	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	ac. stearico [ac. ottadecanoico]	C18:0
18	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ac. oleico [ac. (9Z)-ottadecenoico]	C18:1
18	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ac. elaidico [ac. (9E)-ottadecenoico]	C18:1
18	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	ac. vaccenico [ac. (11Z)-ottadecenoico]	C18:1
18	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ac. linoleico [ac. (9Z, 12Z)-ottadecadienoico]	C18:2
18	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	ac. linolenico [(9Z, 12Z, 15Z)-ottadecatrienoico]	C18:3
20	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	ac. arachico [ac. eicosanoico]	C20:0
20	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	ac. arachidonico [ac. (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-eicosatetraenoico]	C20:4
20	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	EPA [ac. (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)-eicosapentaenoico]	C20:5
22	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH	ac. beenico [ac. docosanoico]	C22:0
22	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	ac. cetoleico [ac. (11Z)-docosenoico]	C22:1
22	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	ac. erucico [ac. (13Z)-docosenoico]	C22:1

tabella 1.5: Classificazione degli acidi grassi

Atomi di C	Nome comune	Not. abbrev.	Punto di fusione [°C]
<b>Saturi</b>			
12	ac. laurico	C12:0	44
14	ac. miristico	C14:0	58
16	ac. palmitico	C16:0	63
18	ac. stearico	C18:0	69
20	ac. arachidico	C20:0	77
<b>Insaturi</b>			
16	ac. palmitoleico	C16:1	0
18	ac. oleico	C18:1	13
18	ac. linoleico	C18:2	-5
18	ac. linolenico	C18:3	-11
20	ac. arachidonico	C20:4	-50
20	EPA	C20:5	-50

tabella 1.6: *Gli acidi grassi più comuni negli oli vegetali*

Tali acidi grassi, sintetizzati dall'acetato, contengono un numero pari di atomi di carbonio e non sono ramificati. Essi possono essere saturi (cioè senza doppi legami C-C) o insaturi (con C=C). Gli acidi grassi contenenti un C=C sono detti monoinsaturi, polinsaturi quelli con più C=C. In ogni caso i C=C non sono mai coniugati, sono cioè sempre separati da un gruppo metilico.

Nelle tabelle 1.5 e 1.6 sono stati riportati: il numero di atomi di C per ogni acido grasso, la formula chimica con particolare rilievo alla posizione del doppio legame per gli acidi insaturi, il nome comune e quello IUPAC, la notazione abbreviata con cui si identificano solitamente. Infatti con il simbolo "C...:..." si indicano il numero di atomi di carbonio e il grado di insaturazione dell'acido grasso. Cioè, mediante questa notazione, si indicano due parametri importanti di un acido grasso: la lunghezza della catena idrocarburica e il suo grado di insaturazione, da cui dipendono diverse proprietà fisiche dell'acido stesso. Si vede, ad esempio, che i punti di fusione degli acidi grassi aumentano all'aumentare del peso molecolare; ciò è legato alla loro configurazione molecolare. I doppi legami presenti negli acidi grassi hanno generalmente configurazione (Z) o cis, che determina un piegamento nella molecola; questo impedisce il compatto impaccamento, che invece

si verifica negli acidi grassi saturi. Di conseguenza gli acidi insaturi hanno minori interazioni intermolecolari e un punto di fusione più basso di quelli aventi peso molecolare simile. Inoltre, all'aumentare del grado di insaturazione, cioè del numero dei C=C, i punti di fusione degli acidi grassi insaturi diminuiscono. Perciò, se si considerano gli acidi grassi di figura 1.7 con 18 atomi di C, passando dallo stearico (C18:0) all'oleico (C18:1), al linoleico (C18:2) e infine al linolenico (C18:3) si registra una diminuzione delle temperature di fusione. Inoltre l'aumento del grado di insaturazione rende la molecola più instabile e facilmente degradabile dal calore o dalla luce.

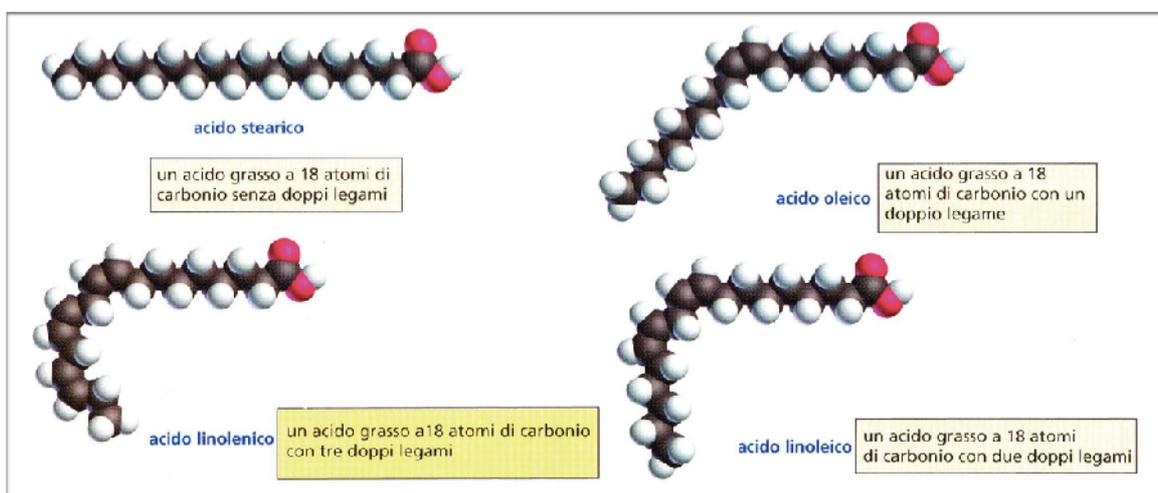


figura 1.7: Acidi grassi a 18 atomi di carbonio (Bruice, 2012)

I triacilgliceroli solidi o semi-solidi a temperatura ambiente sono chiamati grassi; questi sono ottenuti da animali e sono composti in larga parte da triacilgliceroli di acidi grassi saturi o aventi un solo doppio legame. Per questo motivo, come già precedentemente evidenziato, le code degli acidi grassi saturi si impaccano in modo compatto, dando ai trigliceridi punti di fusione elevati e ritrovandosi solidi alla temperatura considerata. Gli oli, invece, sono costituiti principalmente da trigliceridi di acidi grassi insaturi che non possono impaccarsi strettamente. Le loro temperature di fusione sono relativamente basse e sono, quindi, liquidi a temperatura ambiente.

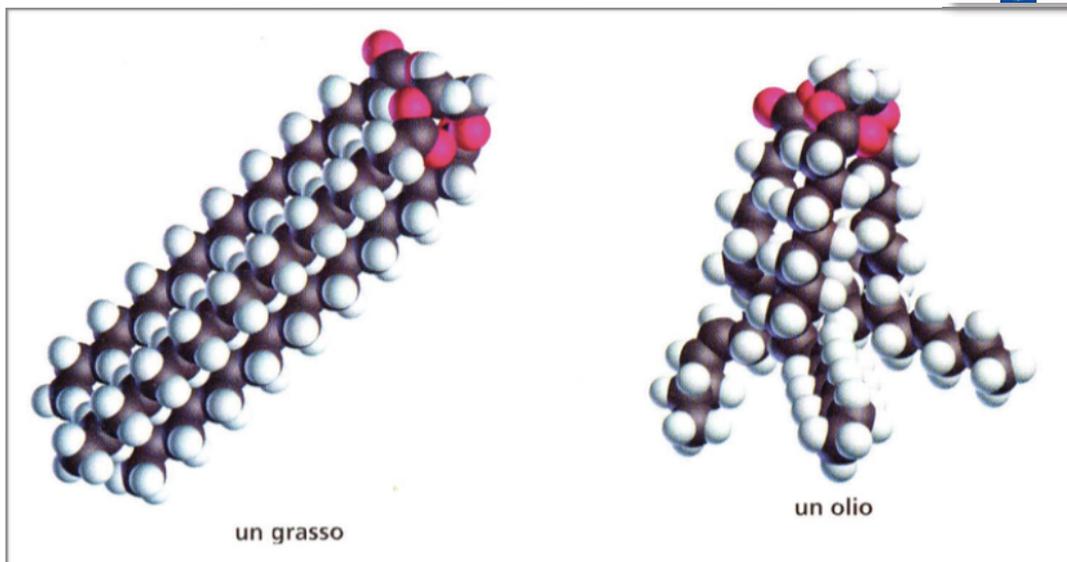


figura 1.8: Formule di strutture di un grasso e di un olio (Bruice, 2012)

Perciò le caratteristiche e le proprietà di un olio dipendono anche dalla sua composizione in termini di acidi grassi. A questo proposito in tabella 1.7 si riportano le composizioni negli acidi grassi indicati per alcuni oli comunemente utilizzati, mentre in tabella 1.8 si indica in quale olio e in che misura un determinato acido grasso è presente.

olio	acidi grassi								
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20-C22
mais	-	0 –2	8 –10	1–2	1–4	30– 50	34 – 56	-	0–2
semi di lino	-	3	6	-	-	-	74	17	-
oliva	-	-	14,6	-	-	75,4	10	-	-
palma	0,1	1,0	42,6	-	4,5	40,5	10,1	0,2	-
tallow	0,2	2-3	25-30	2-3	21-26	39-42	2	-	1,2-1,8
arachide	-	0,5	6-11	1-2	3-6	39-66	17-38	-	5-10
colza	-	-	2-5	0,2	1-2	10-15	10-20	5-10	50-60
soia	-	0,3	7-11	0-1	3-6	22-34	50-60	2-10	5-10
cotone	-	0-3	17-23	-	1-3	23-41	34-55	-	2-3
girasole	-	-	6	-	4,2	18,7	69,3	0,3	1,4
senape	-	-	3	-	1,5	15-60	12	5-10	10-60
cocco	53-70	44-51	13-18	7-10	-	1-4	5-8	1-3	-

tabella 1.7: Composizione in ac. grassi di alcuni oli (Tyson, 2001; Farid & Behzadi, 2009)

La composizione e distribuzione degli acidi grassi nei diversi tipi di olio è stata considerata anche da Marchetti et al. (2007) nella tabella 1.8, dati che confermano quanto già riportato nella tabella precedente.

<b>acido grasso</b>	<b>tipi di olio</b>				
	<b>soia</b>	<b>cotone</b>	<b>palma</b>	<b>tallow</b>	<b>cocco</b>
	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]
<i>laurico C12:0</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	46,5
<i>miristico C14:0</i>	0,1	0,7	1,0	2,8	19,2
<i>palmitico C16:0</i>	10,2	20,1	42,8	23,3	9,8
<i>stearico C18:0</i>	3,7	2,6	4,5	19,4	3,0
<i>oleico C18:1</i>	22,8	19,2	40,5	42,4	6,9
<i>linoleico C18:2</i>	53,7	55,2	10,1	2,9	2,2
<i>linolenico C18:3</i>	8,6	0,6	0,2	0,9	-

tabella 1.8: *Composizione e distribuzione degli acidi grassi negli oli (Marchetti et al., 2007)*

Da quanto detto finora si può affermare che, sebbene gli oli siano chimicamente costituiti da trigliceridi e che gli acidi grassi comunemente legati ad essi siano individuati e noti, le loro quantità relative influenzano fortemente le caratteristiche e le proprietà dell'olio stesso. Infatti, gli acidi grassi saturi come il laurico, miristico, palmitico e stearico sono solitamente solidi a temperatura ambiente, per cui l'olio di palma, costituito in larga parte da gliceridi dell'acido palmitico è solido a temperatura ambiente. Invece, gli acidi grassi insaturi quali l'oleico, il linoleico e linolenico sono di solito liquidi a temperatura ambiente; ad esempio l'olio di semi di lino è liquido alle stesse condizioni, perché costituito principalmente (70% almeno) da trigliceridi dell'acido linoleico.

Un altro parametro importante è il numero di iodio (*iodine value*), che rappresenta un indice del grado di insaturazione di grassi ed oli: alti valori indicano maggiore presenza di acidi grassi insaturi (C=C), bassi valori un basso grado di insaturazione, cioè catene prevalentemente sature degli acidi grassi presenti. Alcuni valori, riportati nella tabella 1.9, sono già stati misurati nel secolo scorso da Lewkowitsch. Infatti il numero di iodio

rappresenta il metodo più vecchio e comune per la determinazione dell'insaturazione dell'olio.

olio	numero di iodio
semi di lino	173 - 201
soia	137-143
girasole	119 - 135
mais	111 - 130
cotone	108 - 110
sesamo	103 - 108
colza	94 - 102
arachide	83 - 100
oliva	79 - 88
palma	52 - 57
cacao	32 - 41
palma kernel	13 - 17
cocco	8 - 10

tabella 1.9: Valori del numero di iodio di alcuni oli (Lewkowitsch, 1904)

Il numero di iodio è un parametro utile per valutare la “convenienza” dell’impiego di un olio tal quale come combustibile o da cui ottenere un *fuel*. Nello specifico oli con bassi valore del numero di iodio, essendo solidi a temperatura ambiente, avranno punti di fusione più alti. Di conseguenza il biodiesel prodotto da questi manterrà tali caratteristiche e potrà essere utilizzato in paesi tropicali o temperati nei mesi estivi. Invece il biodiesel ottenuto da oli con un alto numero di iodio e quindi alto grado di insaturazione hanno punti di fusione bassi e possono essere impiegati anche in zone dal clima più rigido. Accortezze devono essere, però, tenute in conto (stoccaggio appropriato e impiego in tempi rapidi) per evitare che questo *fuel*, ottenuto ad esempio da olio di soia, girasole e semi di lino, possa subire ossidazione e polimerizzazione (Filemon, 2010). Pertanto la ricerca è indirizzata verso l’ottenimento di biodiesel ottenuto da oli con una combinazione “opportuna” di acidi grassi saturi e insaturi. Sono da considerare altri parametri chimici e fisici: potere calorifero, *pour point* PP, *cloud*

*point CP, flash point*, densità e numero di cetano. Di questi si parlerà ampiamente più avanti, quando tali parametri saranno valutati anche per il biodiesel prodotto.

## 1.4 Gli oli di frittura esausti (WCOs)

Sebbene si sia già valutato che la produzione di biodiesel da oli vegetali abbia solo una modesta influenza sui prezzi dei prodotti alimentari, rimane ancora aperta la questione *food versus fuel*, in base alla quale si vuole evitare di impiegare terreni agricoli e coltivazioni di piante da olio da destinare alla produzione di biocombustibili (Sarin, 2012). A questo proposito si ricercano nuove soluzioni attraverso le quali ottenere la materia prima richiesta: *feedstocks* da microalghe, grassi animali, reflui civili e oli esausti principalmente, ma anche la coltivazione di terreni poco sfruttati dall'agricoltura o marginale, in modo da non competere con la produzione di prodotti alimentari.

Col termine *WCOs* si indicano gli oli vegetali utilizzati nella frittura o preparazione dei cibi e non più utilizzabili per il consumo (Gui et al., 2008). Secondo la normativa europea regolamentata dalla *European Waste Catalogue* (EWC) i *WCOs* sono classificati come reflui civili e non come rifiuti pericolosi, sebbene siano stati sottoposti ad elevate temperature e diverse reazioni. Non esiste perciò una normativa dettagliata che consenta di prevedere un opportuno smaltimento di tali sostanze. La comunità scientifica è quindi orientata verso l'impiego dei *WCOs* come materia prima per la produzione di biocombustibili in generale e biodiesel in particolare, rispondendo a richieste etiche (*fuel vs food*), economiche e ambientali nello stesso tempo.

Il costo di produzione del biodiesel è sicuramente proibitivo rispetto al petro-diesel e può essere considerato come la somma di alcune voci: materie prime (produzione e trattamenti), catalizzatore, produzione del prodotto (consumo energia e manodopera), costi di trasporto (materie prime e prodotto finale) e tasse (locali e nazionali) (Haas et al., 2006). Fra le voci appena elencate, il costo che incide maggiormente sul prezzo

finale del biodiesel nel mercato globale risulta quello delle materie prime, stimato pari a circa il 70% del costo totale di produzione (Lam et al., 2009), come mostrato in figura 1.9:

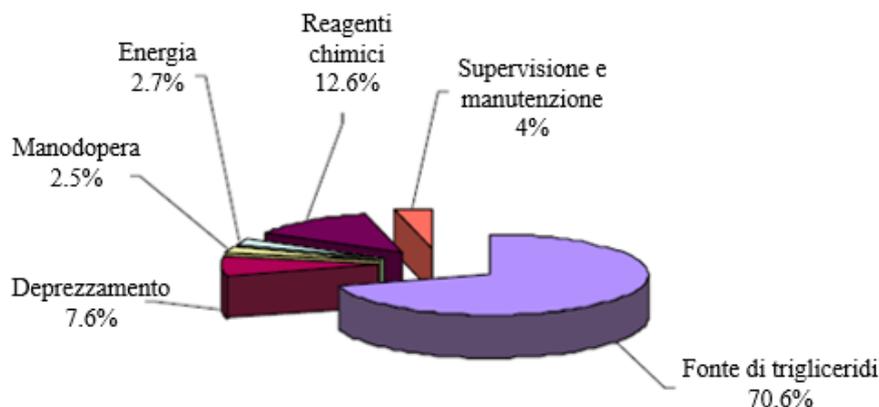


figura 1.9: Distribuzione percentuale dei costi di produzione del biodiesel (Kemp, 2006)

A tal proposito alcuni studi hanno dimostrato che l'utilizzo di oli esausti al posto di quelli raffinati consente di dimezzare i costi di produzione (Escobar et al., 2009).

L'ottenimento degli oli esausti è il risultato di un processo complesso che coinvolge l'olio di partenza (fonte principalmente di trigliceridi); durante la frittura questo viene riscaldato fino a temperature di 160 - 190 °C (Gazmuri & Bouchon, 2009) anche per tempi relativamente lunghi e per usi ripetuti. Come risultato della degradazione si ottengono diversi prodotti e la quantità di questi aumenta con l'aumentare della temperatura della frittura. L'olio è, inoltre, sottoposto a diverse reazioni chimiche come l'ossidazione, l'idrolisi e la termolisi (Mittelbach & Enzelsberger, 1999). Le reazioni di *ossidazione* hanno luogo perché l'ossigeno, disciolto nell'olio, può reagire principalmente con gli acidi grassi insaturi, altamente reattivi, dando luogo alla formazione di svariati prodotti di ossidazione, secondo il percorso radicalico riportato in figura 1.10 (Kulkharni & Dalai, 2006):

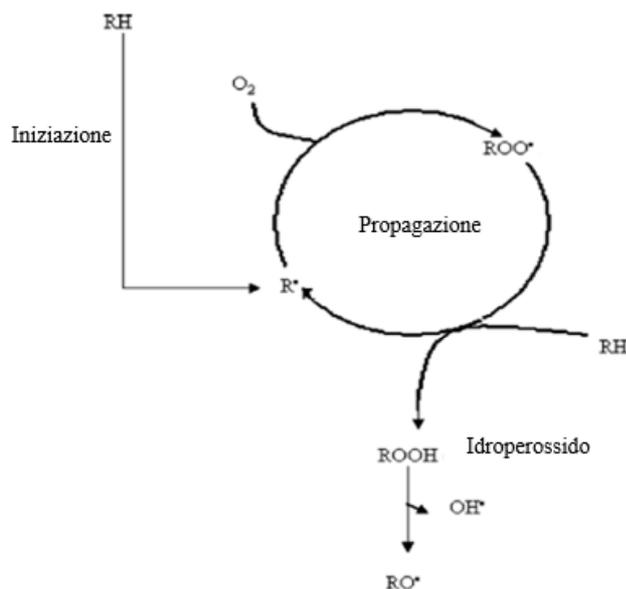


figura 1.10: Meccanismo di ossidazione radicalico degli acidi grassi

La maggior parte dei prodotti formati, come i poligliceridi, rimane nell'olio con conseguente aumento della viscosità e del peso molecolare, mentre altri possono ulteriormente decomporsi in composti volatili facilmente allontanabili dall'olio (Cvengroš & Cvengrošová, 2004).

La reazione di *idrolisi* è schematizzata in figura 1.11. Nonostante parte dell'acqua formata si evapori, una determinata quantità di essa si dissolve nell'olio, riuscendo a idrolizzare i trigliceridi, con conseguente formazione di acidi grassi liberi, glicerolo, monogliceridi e digliceridi (Kulkarni & Dalai, 2006).

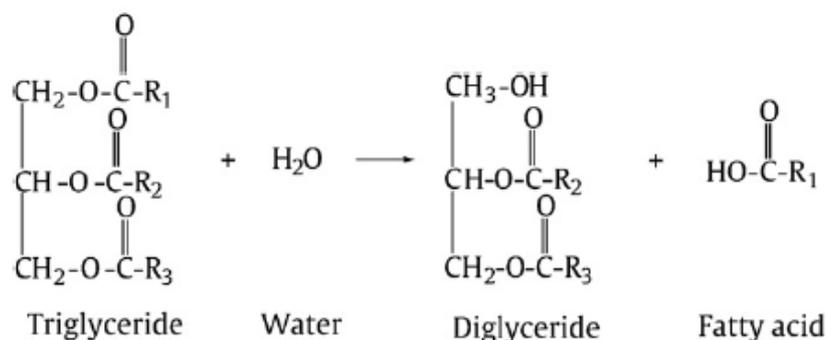


figura 1.11: Idrolisi dei trigliceridi (Lam et al., 2010)

La reazione di *termolisi* avviene alle alte temperature (circa 180°C) in assenza di ossigeno e porta alla decomposizione degli acidi grassi, sia liberi che legati nei gliceridi e in una serie di composti: gli acidi grassi saturi danno origine ad alcani, acheni,

chetoni, monossido di carbonio, anidride carbonica ed altri composti, mentre quelli insaturi possono reagire tra di loro formando dimeri e trimeri secondo la reazione denominata *Diels-Alder*.

Le proprietà fisiche e chimiche dei *WCOs* sono simili a quelle dei relativi oli edibili freschi e si verifica un aumento della viscosità e del calore specifico, una variazione della tensione superficiale e del colore (Jacobson et al., 2008). Le principali caratteristiche dei *WCOs* in relazione alla loro sicurezza possono essere così riassunte (Riera & Codony, 2000):

- trasferimento di composti liposolubili dal cibo all'olio di frittura;
- trasferimento di acqua dal cibo all'olio di frittura;
- formazione di composti volatili nell'olio: in basse concentrazioni conferiscono i tipici aromi e sapore ai prodotti fritti, ma in alte concentrazioni sono da evitare;
- considerevole degradazione nella composizione dell'olio di frittura come conseguenza delle diverse reazioni.

I composti ottenuti dalla degradazione e/o contaminazione dell'olio possono da un lato avere effetti nocivi sull'organismo umano, e dall'altro "influenzare" le caratteristiche del biodiesel ottenuto dalla transesterificazione di tali oli esausti, con particolare riferimento al quantitativo di acidi grassi liberi (FFA) e acqua (Fernandez et al., 2010). Si può affermare che la qualità dei *WCOs* dipende da una serie di fattori: la posizione geografica e il clima giocano un ruolo fondamentale sugli oli vegetali freschi e, di conseguenza, su quelli esausti; la durata e la stagione del raccolto; le temperature e l'intensità delle precipitazioni (Ghasemnezhad & Honermeier, 2007); la quantità di FFA nell'olio, cioè l'acidità (Fieldsend & Morison, 2000).

## 1.5 Le fasi produttive

La qualità dei WCOs come materia prima impiegata per la trasformazione in biodiesel costituisce un punto critico di tutto il processo, avendo un forte impatto in ogni suo stadio, dalla raccolta dell'olio all'ottenimento dei prodotti e loro successiva purificazione.

Si possono, quindi, individuare gli stadi più importanti della filiera:

1. *raccolta* dei vari tipi di *WCOs*;
2. *pretrattamenti* sull'olio esausto;
3. transesterificazione;
4. *post-trattamenti* sulla miscela prodotta.

### 1.5.1 La raccolta dei WCOs

La *raccolta* dell'olio di frittura esausto avviene secondo tre diverse modalità:

- A. raccolta decentralizzata: un sistema di raccolta porta a porta dell'olio è organizzato dalla ditta/azienda di biodiesel per raccogliere l'olio direttamente dai "produttori";
- B. raccolta centralizzata: i "produttori" di *WCOs* depositano l'olio in appositi sistemi di raccolta, da lì l'azienda provvede a recuperarli;
- C. raccolta combinata: una combinazione dei sistemi A e B.

Roy (2009) ha messo in luce i principali vantaggi e svantaggi di ciascun sistema, riassunti nella tabella 1.10:

Sistema	Vantaggi	Svantaggi
<b>A</b>	Diretto contatto tra produttori di biodiesel e consumatori di olio; questo consente di educare i consumatori sulla raccolta di oli di qualità (da riciclare), scartando l'olio inappropriato	Processo di raccolta dell'olio è costoso e richiede molto tempo (legato al numero di consumatori e alla quantità di olio raccolto per ogni unità)
	possibilità di consegnare il biodiesel ai consumatori di olio durante la fase di raccolta, tagliando i costi di distribuzione e promuovendo l'uso del biodiesel	é richiesta una licenza per il <i>waste</i>
	Migliori rapporti lavorativi e comunicazione tra consumatori di olio e produttori di <i>biofuel</i>	la frequenza della raccolta è determinata dal consumatore di olio
	Nessuna tassa sulla raccolta di tale rifiuto	
<b>B</b>	Bassi costi dei depositi di raccolta, disposti vicino all'impianto del processo	Minor controllo sul processo da parte del produttore di biodiesel
	possibilità di far gestire l'olio raccolto nei depositi da una ditta/azienda che provveda al trattamento del <i>waste</i> , riducendo i costi	maggior costo della materia prima dal deposito
<b>C</b>	Costi ridotti per le attività di fornitura	Competitività con i fornitori di olio

tabella 1.10: *Vantaggi e svantaggi dei sistemi di raccolta*

Completano questa fase della filiera di trattamento dei WCOs il *trasporto* e lo *stoccaggio* degli oli stessi. Alcune linee guida da seguire sono presentate nel CEN/TR 15367-3 “*Prevention of Cross Contamination*”, altre riguardano: il sito di produzione dell'olio esausto; il primo luogo dove l'olio è raccolto; il luogo in cui i *WCOs* sono caricati sui mezzi di trasporto (qui avviene solitamente la miscelazione dei diversi tipi di oli raccolti); l'impianto di produzione di biodiesel dove l'olio esausto (cioè la miscela di oli esausti) è processato. L'applicazione delle norme sopra riportate consente, inoltre, di limitare la contaminazione dell'olio nei diversi stadi.

### 1.5.2 Pretrattamenti

La qualità dell'olio esausto raccolto è valutata in base a diversi parametri: la tipologia degli acidi grassi presenti (principalmente palmitico, stearico, oleico, linoleico e linolenico); la densità; la viscosità cinematica a 40°C, il valore di acidità e

saponificazione; il numero di iodio; il quantitativo di sodio e il valore di perossido (Wen et al., 2010). In prima analisi l'olio è solitamente filtrato allo scopo di rimuovere i residui solidi grossolani che si sono depositati durante la frittura o preparazione dei cibi. Un colino da cucina o della carta filtro sono da impiegarsi per questo scopo.

Inoltre, come già evidenziato precedentemente, si rivolge particolare attenzione al contenuto di impurezze come l'acqua e gli acidi grassi liberi (FFA), che danno luogo a saponificazione e idrolisi, soprattutto nelle transesterificazioni con catalizzatore alcalino (Leung & Guo, 2006; Banerjee & Chakraborty, 2009); ciò si traduce in una resa minore in biodiesel e in un maggior consumo del catalizzatore. Per questo motivo, in catalisi basica, è fondamentale valutare la quantità dei FFAs, che per Wang et al. (2006) non deve essere superiore a 0.5 wt% o ad un contenuto, espresso come valore di acidità, inferiore ad 1 mg KOH/g di olio (Felizardo et al., 2006). Secondo altre ricerche, si riportano buoni risultati anche per valori di FFA più elevati: fino al 2 wt% (Sahoo et al., 2007) e anche al 5 wt% (Knothe et al., 2016). Gli acidi grassi liberi, in presenza di acqua e di una base, danno luogo alle reazioni di saponificazione. Ciò si traduce in una minore resa in esteri, oltre che alla maggiore difficoltà di purificazione del prodotto desiderato (miscela esterea) dal glicerolo e dai saponi formati (Nag et al., 2008; Kulkarni & Dalai, 2006).

La reazione di saponificazione dell'acido oleico è riportata in figura 1.12:

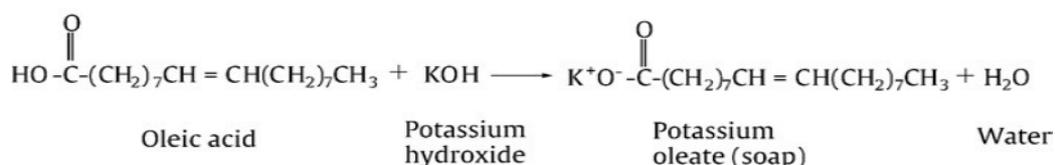


figura 1.12 : *Reazione complessiva che descrive la trasformazione di FFA in saponi (Saponificazione)*

in cui l'acido grasso (FFA) reagisce con la base (idrossido di potassio), formando l'oleato di potassio (sapone) ed una molecola di acqua. La formazione, quindi, di saponi di acidi grassi, soprattutto saturi, è caratterizzata dalla presenza di particelle gelatinose

che tendono a solidificare a temperatura ambiente (Felizardo et al., 2006), favorendo anche la formazione di strati di emulsioni e l'aumento relativo di viscosità (Basu & Norris, 1996).

L'acqua formata in seguito alla reazione di saponificazione, insieme a quella che può già trovarsi nell'ambiente di reazione, idrolizza un'aliquota dei trigliceridi con conseguente produzione di altre molecole di FFA. La reazione di idrolisi è riportata in figura 1.13:

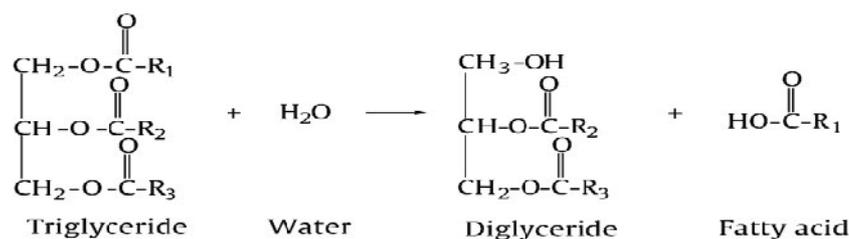


figura 1.13: Reazione complessiva che descrive la formazione di FFA

Per valutare il contenuto di FFAs è largamente utilizzata nella pratica industriale la titolazione acido – base o *tritation analysis* (Özbay et al.,2008). Mediante questa tecnica si determina la concentrazione dei FFAs nell'olio, conoscendo la concentrazione di una soluzione basica appositamente preparata, in modo da sfruttare la reazione acido – base tra gli acidi e la base stessa. In base al valore di acidità così misurato l'olio assume diverse denominazioni, come riportato in tabella 1.11:

Valore di acidità (%)	Denominazione
< 0,3	Olio di oliva raffinato, olio di sansa di oliva
< 0,8	Olio extra vergine di oliva
< 2,0	Olio di oliva
> 2,0	Olio di oliva lampante

tabella 1.11 : Classificazione dell'olio di oliva in relazione al contenuto di FFAs

Per ridurre il contenuto di FFA nella matrice oleosa si può ricorrere a diverse tecniche, qui di seguito riassunte. La neutralizzazione basica richiede che nell'ambiente di reazione si aggiunga del catalizzatore basico in eccesso rispetto al valore previsto. In questo modo tale quantità in eccesso, calcolato tenendo conto del grado di acidità, darà luogo a saponificazione dei FFAs, mentre la quantità di catalizzatore prevista per la reazione potrà essere impiegata unicamente per la transesterificazione (Van Gerpen, 2005).

Mediante esterificazione dei FFAs si trasforma la quantità di FFAs in esteri (Yaakob et al., 2012), contribuendo ad un notevole aumento della resa in esteri nel processo (Keim, 1945) ed evitando la formazione di sapone. Si esegue solitamente una reazione di esterificazione acida (con acido solforico) degli acidi grassi liberi con metanolo o con lo stesso alcol utilizzato nel processo di transesterificazione (Van Gerpen et al., 2005; Meng et al., 2008); si ottengono esteri ed acqua, come si vede nella figura 1.14:

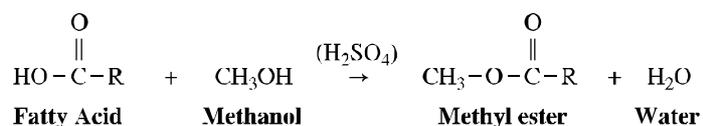


figura 1.14: Reazione di esterificazione acida di un generico acido grasso

Per l'esterificazione acida Gan et al. (2010) suggeriscono l'uso di solfato ferrico disidratato come catalizzatore capace di convertire, e quindi, di abbattere il 97 - 98% degli acidi grassi liberi presenti. In presenza di alte concentrazioni di FFAs nell'olio si può produrre biodiesel attraverso due *steps* in serie: in un primo passaggio si ha l'esterificazione dedicata solo ai FFAs, impiegando il solfato ferrico (in quantità pari al 2% w/w), precedentemente essiccato e aggiunto alla miscela di olio/metanolo e agitandola, nel rapporto 1:10 alla temperatura di 95 °C (Wang et al., 2006), oppure con un rapporto di 1:15 ad una temperatura più bassa, 65 °C. Dopo circa quattro ore si può avviare il secondo *step*, cioè la transesterificazione catalizzata dalla base. L'acqua prodotta deve essere allontanata dall'ambiente di reazione prima di procedere con la transesterificazione basica dei gliceridi.

La neutralizzazione con resine a scambio ionico di carattere acido consente di trasformare in esteri i FFAs, mediante reazione con un alcol. Questa tecnica è solitamente impiegata quando un olio presenta una concentrazione di FFAs che varia dall'1 % al 2 % in peso; la temperatura del processo è di circa 60 - 65 °C. La reazione, simile a quella dell'esterificazione acida dei FFAs, presenta alcuni aspetti vantaggiosi, legati soprattutto all'eterogeneità del sistema; ciò consente una più agevole separazione dall'eventuale acido in eccesso, perché tali resine sono facilmente allontanabili dalla reazione; inoltre, non sono necessarie misure preventive riguardo alla corrosività degli acidi immessi in soluzione. Tuttavia, in questo caso, il tempo di reazione è maggiore dei pochi minuti necessari per la reazione in fase omogenea. Le resine più utilizzate sono la Smopez 101, Amberlyst 15, Amberlyst 16 o Amberlyst 35 (Özbay et al., 2008): hanno tutte carattere acido, sono pretrattate termicamente a 100°C, sono pertanto anidre e a struttura solida, costituita principalmente da una miscela di stirene/divinilbenzene.

L'assorbimento dei FFAs su bagassa consente di adsorbire fisicamente gli acidi grassi liberi su tale materiale, costituito principalmente da cellulosa (Wannahari, 2012). La bagassa rappresenta un rifiuto organico naturale carbonioso derivante dalla produzione dello zucchero. La sua capacità adsorbente è data dalla presenza di carbonio; ciò garantisce, oltre all'assorbimento dei FFAs, il drenaggio dell'olio, e funge anche da filtro naturale e a basso impatto energetico per i residui solidi.

Sono da considerare anche altri metodi per convertire, rimuovere o ridurre i FFAs: esterificazione con glicerolo per ottenere i trigliceridi; distillazione (tecnica energivora); estrazione con solvente (Guerrero et al., 2011).

Come precedentemente accennato, in questa fase si tengono in conto gli effetti legati alla quantità di acqua presente nell'olio, sia come molecole intrappolate in agglomerati di particelle, formatesi ad esempio dall'azione termica della frittura, che in macromolecole quali i fosfolipidi. Per questi ultimi, così come per i residui solidi e altre impurezze, si possono prevedere dei cicli di lavaggio con acqua calda o rimozione mediante centrifugazione e filtrazione su carta (Chen et al., 2009). In alcuni casi si tratta di quantitativi di acqua tali da solubilizzare nell'olio; questi, sebbene modesti, possono dar luogo alle reazioni indesiderate di cui prima si è discusso. A questo proposito si possono considerare alcuni metodi per rimuovere l'acqua nell'olio come i trattamenti

fisici o chimici. Nel primo caso i WCOs si riscaldano oltre i 100°C (Demirbas, 2009) oppure sono sottoposti a distillazione sottovuoto (Felizardo et al., 2006; Yaakob et al., 2012); nel secondo caso si impiegano delle sostanze disidratanti, cioè un sale igroscopico come il solfato di sodio o magnesio, la silica gel (de Araujo et al., 2013), il cloruro di calcio (Shalaby et al., 2012). Ad esempio, se si adopera un sale igroscopico come il solfato di sodio anidro, questo si presenta come polvere e, dopo essere stato introdotto nel campione di WCO, va prima in sospensione e poi tende a diventare decaidrato, inglobando l'acqua di cristallizzazione. Il sale decaidrato, infine, si depositerà sul fondo. Questo metodo, pur valido, ha un carattere empirico: si continuano ad aggiungere, infatti, piccole quantità di sale fino a quando questo non rimane in sospensione. L'impiego di sostanze disidratanti deve prevedere uno *step* successivo per la loro rimozione, come una filtrazione, che, in base alle caratteristiche del filtro utilizzato, consente anche di rimuovere particelle sospese nell'olio.

### 1.5.3 La reazione di transesterificazione

Il biodiesel, costituito da una miscela di esteri alchilici di acidi grassi, è ottenuto da fonti biologiche rinnovabili quali grassi animali e oli vegetali. La transesterificazione è la reazione che trasforma i gliceridi (esteri del glicerolo), per mezzo di alcoli, in esteri lineari di acidi grassi. Tale reazione, nota anche come alcolisi, è complessivamente schematizzata in figura 1.15:

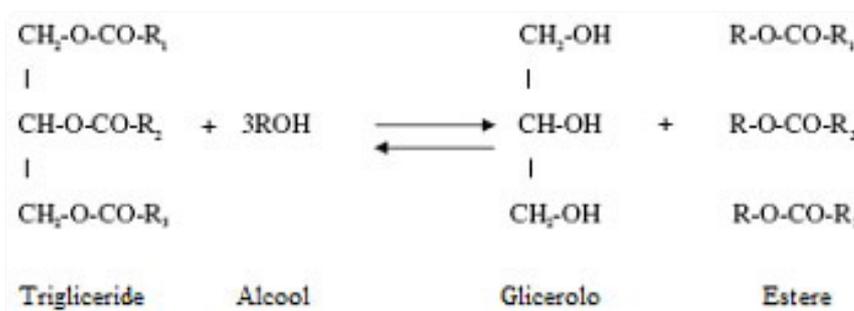


figura 1.15: Reazione complessiva della transesterificazione di una molecola di trigliceride

La reazione di transesterificazione può, inoltre, essere rappresentata tramite uno schema di reazioni reversibili in serie – parallelo (Marchetti et al., 2007); nel primo *step* i trigliceridi (TG), reagendo con l'alcol, sono convertiti nei digliceridi (DG), a loro volta convertiti nei monogliceridi (MG) nello *step* successivo. Infine dai monogliceridi si ottiene il glicerolo (G). In ognuna delle tre reazioni è prodotta una molecola di estere. Lo schema di reazioni è così scritto:

1. **Trigliceridi (TG) + R'OH ↔ Digliceridi (DG) + R'COOR<sub>1</sub>**
2. **Digliceridi (DG) + R'OH ↔ Monogliceridi (MG) + R'COOR<sub>2</sub>**
3. **Monogliceridi (MG) + R'OH ↔ Glicerolo (G) + R'COOR<sub>3</sub>**

L'olio è composto solitamente da gliceridi misti, cioè contenenti catene di diversi acidi grassi (**R<sub>1</sub>**, **R<sub>2</sub>**, **R<sub>3</sub>** in figura 1.15), per cui la miscela esterea prodotta (biodiesel), dipendendo dall'olio di partenza, sarà costituita da tipi diversi di esteri. Con **R'OH** si indica un generico tipo di alcool. Solitamente gli alcoli utilizzati sono: metilico, etilico, propilico, butilico e amilico. Degli alcoli si discuterà in dettaglio nei capitoli seguenti, in riferimento alle catalisi basica ed enzimatica.

Si ottiene una miscela di esteri alchilici di acidi grassi (R'COOR<sub>1</sub>, R'COOR<sub>2</sub>, R'COOR<sub>3</sub>), in cui R' è proprio il gruppo alchilico, mentre R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> sono le catene idrocarburiche degli acidi grassi. La stechiometria della reazione prevede un rapporto di alimentazione alcool:olio pari a 3:1, ma, essendo le tre reazioni all'equilibrio, un eccesso di alcool sposta ciascuna reazione verso la formazione dei prodotti e in particolare dell'estere.

La transesterificazione è un processo largamente impiegato nella pratica industriale: catalisi omogenea, eterogenea ed enzimatica, e l'impiego di metanolo supercritico (qui non si impiega nessun catalizzatore) costituiscono gli esempi principali. Della transesterificazione enzimatica si discuterà ampiamente nella *Parte IB*, mentre qui si intende considerare gli aspetti principali degli altri processi, con particolare riferimento alla catalisi basica. In generale, e in particolare in catalisi basica, le variabili di processo

più significative sono: il tipo di olio e di alcol utilizzati; il rapporto molare alcol:olio; il tipo e la quantità di catalizzatore (se richiesto dal processo); la temperatura di reazione; l'intensità della miscelazione.

La transesterificazione tradizionale - nota anche col termine di *catalisi basica* - prevede l'impiego di un catalizzatore alcalino omogeneo come l'idrossido di potassio (KOH) o di sodio (NaOH) per convertire i trigliceridi e le molecole di alcol in biodiesel e glicerolo. Il meccanismo di transesterificazione dei trigliceridi in catalisi basica può essere rappresentato nello schema della figura 1.16:

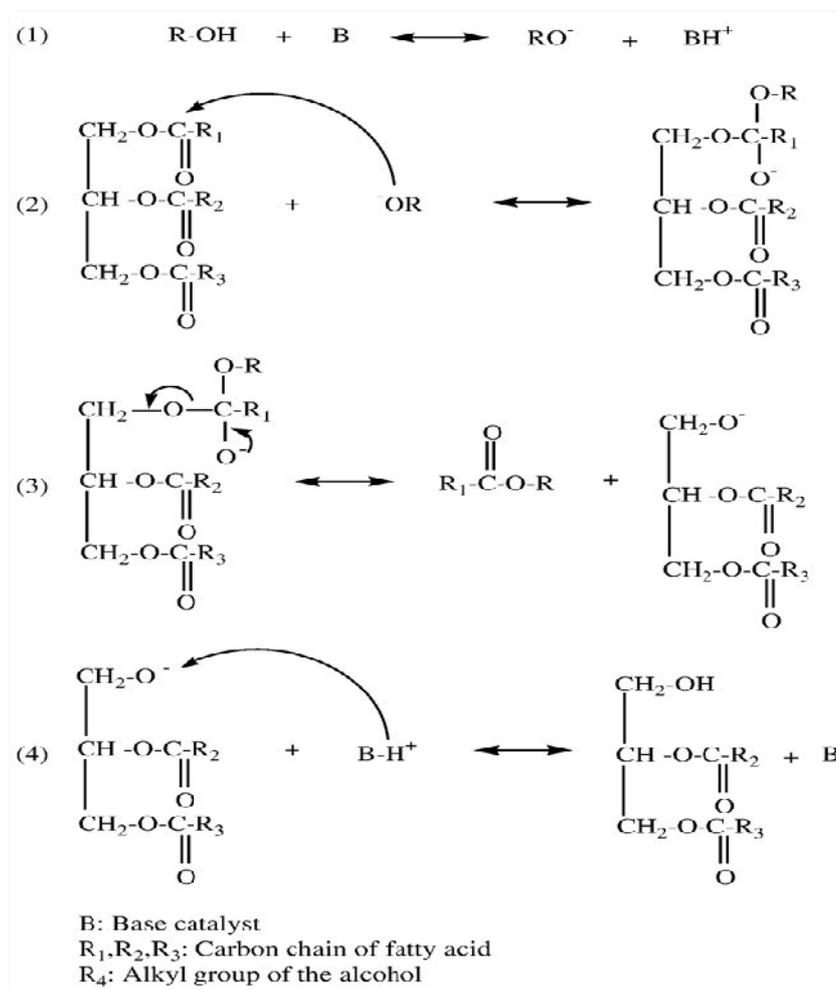


figura 1.16: Meccanismo di reazione in cui si ha la formazione di  $RO^-$ , fortemente reattivo, che dà luogo ad un intermedio di reazione per formare un estere, e poi completare questo passaggio con la rigenerazione del catalizzatore

in cui con **ROH** si indica l'alcol e con **B** la base (catalizzatore KOH o NaOH). Nella (1)

l'alcol e la base reagiscono e si forma l'anione  $RO^-$ ; questo è fortemente reattivo e nella (2) reagisce con la molecola del trigliceride, in particolare attacca il C del carbonile, che è suscettibile ad attacchi nucleofili. Viene, perciò, rotto il doppio legame e si forma un intermedio di reazione che nella (3) porta alla formazione dell'estere. La reazione procede anche per i digliceridi e poi i monogliceridi, che sono convertiti in estere allo stesso modo dei trigliceridi. Nell'ultimo passaggio si ha la rigenerazione del catalizzatore.

Questo tipo di catalisi garantisce ottime rese per la produzione di biodiesel in tempi brevi, a pressione atmosferica e valori di temperatura non alti; inoltre, sono dei processi facilmente realizzabili e a basso impatto economico (Loterio et al., 2005). Tuttavia questo processo necessita di alcune accortezze, legate alla "sensibilità" del processo stesso nei confronti delle impurezze nei *WCOs*, come le molecole di acqua e di acidi grassi liberi. A questo proposito si è già evidenziato che la reazione di saponificazione ha luogo in ambiente alcalino e porta alla formazione di un'emulsione che a valle del processo rende più difficile e costoso il recupero e la purificazione del biodiesel (Shimada et al., 2003).

Nella transesterificazione basica di oli freschi ed esausti il rapporto molare alcool:olio può variare da 1:1 a 1:9 solitamente, mentre il *range* di temperatura comprende valori tra 25 e 120°C. Sono state condotte ricerche, ad esempio, su olio di cocco con KOH in quantità pari a 0.5 wt%, metanolo in rapporto 6:1 con l'olio ed una temperatura di circa 60°C; la resa in esteri, valutata in massa, è pari al 94% (Arquiza et al., 2000). Su olio di girasole e metanolo, in rapporto 6:1 alcool:olio, una temperatura operativa di 60°C e l'1% di KOH è stata ottenuta una resa del 97 wt% in esteri metilici dopo un tempo di reazione di 2 ore (Rashid et al., 2008). Su olio di palma con il 28 wt% di alcol metilico rispetto all'olio, con una temperatura di 50°C e l'1 wt% di catalizzatore è stata valutata una resa di circa l'80 wt% in esteri (Berchmans & Hirata, 2008). Un esperimento su olio di jatropha, con l'1 wt% di NaOH, una temperatura di 60°C, il 20 wt% di metanolo, ha portato ad una resa in massa di esteri pari al 98%, dopo un tempo di reazione di 2 ore (Sharma & Singh, 2008). Su olio esausto (WCO) è stato studiato l'andamento della resa in esteri in relazione ai parametri sopra citati: per un rapporto molare 6:1 di metanolo:olio, una temperatura operativa di 50°C e lo 0,7 wt% di catalizzatore si ottiene una conversione dell'86% dopo 90 minuti di reazione (Meng et al., 2008). Un altro

studio ha riportato una resa del 98 wt% in esteri lavorando su WCO con un rapporto di alimentazione 6:1 di metanolo, l'1 wt% di KOH e una temperatura operativa di 65°C (Refaat et al., 2008). In ogni caso si registrano bassi costi per il catalizzatore e la possibilità di impiegare aliquote aggiuntive di KOH o NaOH per i WCOs con quantità elevate (>3%) di acidi grassi liberi. In diversi casi si suggerisce di usare il metossido di sodio o potassio (piuttosto che i rispettivi idrossidi), perché la mancanza di un radicale idrossido nella struttura della molecola inibisce la reazione di saponificazione (Shimada et al., 2002; Georgogianni et al., 2009; Soriano et al., 2009; Thanh et al., 2010; Guzzato et al., 2011; Charoenchaitrakool & Thienmethangkoon, 2011; Yan et al., 2011).

E' stato valutato che l'utilizzo di catalizzatori acidi eterogenei ( $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$ , HCl) consente di ottenere risultati migliori rispetto alla catalisi basica se si processano WCOs con apprezzabili quantità di FFA (Lam et al., 2010). Recentemente molti ricercatori hanno iniziato a prestare maggiore attenzione allo studio di catalizzatori eterogenei, acidi o basici, dal momento che questi consentono di raggiungere rese maggiori in biodiesel, una maggiore purezza del glicerolo prodotto e una più agevole separazione e successivo recupero del catalizzatore. Inoltre, il processo è più economico, sicuro e con minor impatto ambientale rispetto a quelli in catalisi omogenea. Soprattutto nel caso dei WCOs si eliminano gli inconvenienti legati alle reazioni indesiderate quali l'idrolisi e la saponificazione; in particolare sugli oli esausti è stato testato l'impiego di catalizzatori eterogenei come Sr/ZrO<sub>2</sub>, ZS/Si, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>, in quantità pari al 3 %wt e rapporti molari alcol:olio del 6:1 e 9:1, temperatura di 200°C e durata di 5 e 10 ore, con rese pari all'81% e 92% rispettivamente. Inoltre, aumentando il rapporto di alimentazione a 29:1 e abbassando la temperatura (115°C) e il tempo di reazione (3 ore), si abbatte la resa fino al 79% (Sakai et al., 2009; Agarwal et al., 2012). L'impiego di catalizzatori acidi, omogenei o eterogenei, per la transesterificazione di oli esausti è stato investigato: le reazioni indesiderate, come la saponificazione, non sono favorite in ambiente acido, per cui possono essere impiegati anche WCOs con quantità di FFA maggiori del 3% (Kulkarni & Dalai, 2006); inoltre, si possono contemporaneamente catalizzare reazioni di esterificazione e transesterificazione con conseguente aumento della resa finale in esteri. Tramite la prima reazione gli esteri si formano dagli acidi grassi con l'alcol e tramite la seconda reazione si parte dai trigliceridi. Pertanto i processi condotti in catalisi acida da questo punto di vista risultano essere più convenienti rispetto, ad

esempio, a quelli con catalizzatore alcalino o enzimatico (Zhang & Yen, 2003; Zhang & Yen, 2003), ma presentano alcuni inconvenienti come basse velocità di reazione, alti valori di temperatura e rapporto molare di alimentazione, corrosione dei materiali, difficile separazione del catalizzatore, problemi di inquinamento e pericolosità (Jacobson et al., 2008).

E' soprattutto oggetto di ricerca, ma poco diffuso come processo industriale, la transesterificazione con alcol supercritico (non catalizzata). Questa presenta alcuni vantaggi sui processi convenzionali: assenza del catalizzatore, una più agevole separazione dei prodotti, alte velocità di reazione, nessun problema o limitazione riguardo alla presenza di FFAs e acqua nell'olio esausto. Tuttavia, questo metodo richiede temperatura e pressione elevati, nonché quantità consistenti di alcol in eccesso. Tutto ciò si introduce in un cospicuo aumento dei costi (Saka et al., 2010; Tan et al., 2010; Quesada-Medina & Olivare-Carrillo, 2011). Oltre ai parametri del processo sopra citati, è necessario considerare qui il ruolo importante rivestito dalla pressione. Diversi studi sono stati effettuati principalmente su oli freschi: cocco (Bunyakiat et al., 2006), palma (Rathore & Madras, 2007), colza (Saka & Kusdiana, 2001; Minami & Saka, 2006), cotone (Demirbas, 2002), soia (Silva et al., 2007; Yin et al., 2008), girasole (Madras et al., 2004; Balat, 2008), ricino (Vleitez et al., 2011), riportando valori di resa apprezzabili dall'80% al 95%. Inoltre, in base a questi lavori, le condizioni operative che consentono di ottenere rese in biodiesel maggiori del 90% sono: *range* di temperatura di 300 - 350°C; pressioni di 20 - 35 MPa; rapporto molare alcol:olio di 40:1 - 42:1; tempi di reazione di 5 - 30 minuti, sia con metanolo che etanolo supercritici (He et al., 2007).

### 1.5.4 Post-trattamenti

Al termine della reazione di transesterificazione di oli freschi o esausti si ottiene una miscela di esteri alchilici che contiene alcune impurezze quali: glicerolo libero, sapone (come prodotto da saponificazione in catalisi basica), metalli, alcol non convertito (metanolo nella maggior parte dei casi), FFAs, catalizzatore, acqua e gliceridi (mono-, di- e tri-) non convertiti. Sono, pertanto, necessari dei trattamenti di purificazione per ottenere un prodotto, il biodiesel appunto, che rispetti le specifiche previste dalla normativa europea UNI EN 14214 o americana ASTM D6751. Qui si farà riferimento ai parametri, alle modalità di analisi e ai limiti, più ristrettivi, individuati dalle norme europee. Ad esempio nella tabella 1.12 sono raccolti alcuni parametri con rispettivi limiti e norme specifiche di riferimento:

<i>Parametri</i>	<i>Limiti</i>	<i>Norma</i>
<i>Viscosità</i>	3.50 – 5.00 mm <sup>2</sup> /s	<i>UNI EN ISO 3104</i>
<i>Contenuto in Esteri</i>	min 96.5 %(m/m)	<i>UNI EN ISO 14103</i>
<i>Contenuto in Acqua</i>	max 500 mg/kg	<i>UNI EN ISO12937</i>
<i>Contenuto in Metanolo</i>	max 0.20 %(m/m)	<i>DIN EN 14110</i>
<i>Glicerolo libero</i>	max 0.02 %(m/m)	<i>DIN EN 14105</i>

tabella 1.12: Raccolta di alcuni parametri importanti da analizzare, in relazione alla normativa vigente UNI EN 14214

I trattamenti post produzione sono necessari per ottenere il biodiesel con le caratteristiche richieste, in modo tale da permetterne l'utilizzo come biocarburante. Per alcuni parametri Berrios et al. (2008) riporta quali possono essere gli effetti su un motore legati all'utilizzo di biodiesel non trattato:

<i>Impurezza</i>	<i>Effetto</i>
<b>Free Fatty Acids (FFA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrosione</li> <li>• Bassa stabilità da ossidazione</li> </ul>
<b>Acqua</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Idrolisi (formazione di FFA)</li> <li>• Corrosione</li> <li>• Crescita batteriologica (ostruzione filtro)</li> </ul>
<b>Metanolo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bassi valori di densità e viscosità</li> <li>• Basso punto di infiammabilità (problemi di trasporto, stoccaggio e uso)</li> <li>• Corrosione di pezzi in Al e Zn</li> </ul>
<b>Gliceridi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevata viscosità</li> <li>• Depositi negli iniettori (residuo carbonioso)</li> <li>• Cristallizzazione</li> </ul>
<b>Metalli</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depositi negli iniettori (residuo carbonioso)</li> <li>• Intasamento filtri da ceneri solforate</li> <li>• Indebolimento del motore</li> </ul>
<b>Glicerolo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problemi di assestamento</li> <li>• Aumento di emissioni di aldeidi e acroleina</li> </ul>

tabella 1.13: *Elenco degli effetti dannosi al funzionamento di un motore, alimentato con un biodiesel che presenta valori superiori rispetto ai limiti previsti*

Il glicerolo libero è allontanato mediante sedimentazione o centrifugazione, mentre l'alcol può essere allontanato mediante evaporazione sottovuoto (Berrios et al., 2011). La qualità del biodiesel è determinata dalla durata della fase di sedimentazione, effettuata in laboratorio mediante imbuto separatore, dalle 8 alle 12 ore (Keera et al.,

2011); in questo modo il glicerolo insieme con l'alcol e gran parte del catalizzatore, alcalino solitamente, sono allontanati dalla miscela esterea. Sebbene l'alcol e l'acqua, essendo composti polari, mostrino affinità con il glicerolo, alcuni residui si ritrovano nella miscela di esteri che necessita, per questi e gli altri composti, di ulteriori purificazioni. La letteratura scientifica è ricca di metodi di purificazione del biodiesel "grezzo" che ne prevedono un lavaggio "umido" o "a secco". Per allontanare le impurezze della miscela esterea, sia quelle già presenti nell'olio esausto di partenza che quelle prodotte da reazioni indesiderate parallele alla transesterificazione, il metodo di lavaggio ad umido è tradizionalmente il più utilizzato (Filemon, 2010): acqua calda distillata a 50 - 60°C è aggiunta alla miscela di esteri con lo scopo di rimuovere il glicerolo, l'acqua e i saponi (questi ultimi ottenuti in catalisi basica); solitamente si procede con diversi cicli di lavaggio. L'efficienza di questo metodo è comprovata, ma presenta alcuni inconvenienti come la necessità di dover trattare quantità considerevoli di acque di lavaggio inquinate; inoltre, nella fase acquosa si trattengono anche quantitativi importanti del prodotto obiettivo e si formano delle emulsioni quando si utilizzano degli oli di frittura esausti o altre materie prime con alto contenuto di FFAs, dal momento che in catalisi basica - come già ricordato - questi danno luogo a reazioni di saponificazione. Inoltre, questo metodo prevede tempi lunghi e costi elevati. Perciò, oltre alla possibilità di impiego di solventi organici come l'etere di petrolio seguito da lavaggio con acqua distillata o alla neutralizzazione con acido solforico o fosforico (Yaakob et al., 2013), si affiancano anche altri trattamenti a secco, che impiegano dei materiali adsorbenti come resine a scambio ionico, silicati di magnesio e silica gel. Tali processi di purificazione hanno mostrato buone performance nella rimozione dell'acqua e del metanolo, ma anche dei FFAs, soprattutto se paragonate ai tradizionali e consolidati metodi di lavaggio con acqua calda distillata (Predojevic, 2008). Wang et al. (2009) hanno, inoltre, investigato l'uso di membrane ceramiche come nuovi materiali per rimuovere quantità residue di glicerolo e catalizzatore (se alcalino).

In ogni caso l'efficienza del metodo utilizzato è legata all'olio di partenza, ai pre-trattamenti che ha subito, alle condizioni di reazione e a quelle dei "primi" post-trattamenti, come la sedimentazione per allontanare il glicerolo e la *flash evaporation* per rimuovere l'alcol.

La qualità del biodiesel è fortemente legata ai valori dei parametri previsti dalla UNI EN 14214. Di questi si parlerà ampiamente nel capitolo 5A, in relazione ai campioni di biodiesel prodotto, alle caratteristiche del *feedstock*, alle condizioni operative della reazione e ai processi di separazione e purificazione adottati.

## Parte I

### Capitolo 2: Obiettivi, programmazione e strutturazione del lavoro di tesi

La *Parte I* del presente lavoro di tesi esamina gli aspetti del progetto RecOIL relativo alla transesterificazione degli oli esausti in biodiesel, attraverso un processo di catalisi basica (*Parte IA*) ed enzimatica (*Parte IB*). Gli aspetti dei due processi, gli obiettivi prefissati e il piano sperimentale sono presentati nei seguenti paragrafi.

#### 2.1 Parte IA: Transesterificazione basica di oli esausti pretrattati e produzione di biodiesel

La parte *IA* ha un duplice obiettivo: lo studio della transesterificazione in catalisi basica di oli freschi ed esausti e la produzione massiva di 30 litri di biodiesel da oli esausti raccolti nel comune di Castrolibero nell'ambito del progetto RecOIL, rispettandone così le direttive e le finalità. In entrambi i casi si procede con lo studio del processo e la definizione delle diverse fasi produttive. In particolare, la struttura del lavoro è articolata in una serie di punti: caratterizzazione dell'olio esausto raccolto e conseguenti trattamenti preliminari sull'olio; studio della reazione di transesterificazione e delle metodologie di analisi; individuazione dei post-trattamenti sulla miscela prodotta al fine



di ottenere il biodiesel purificato; valutazione della qualità del biodiesel attraverso i parametri previsti dalla normativa europea di riferimento.

Si intende iniziare con lo studio della reazione di transesterificazione in catalisi basica, impiegando in prima analisi dell'olio fresco commerciale. Per rispondere alle direttive del progetto in esame, come già detto nel capitolo 1, la catalisi basica consente di ottenere rese elevate in tempi competitivi rispetto agli altri processi. Inoltre, si vuole partire da un olio vegetale fresco per affrontare e approfondire lo studio della reazione e anche dei post-trattamenti sulla miscela esterea prodotta, prima di valutare e mettere in pratica le fasi dei pretrattamenti previsti per i campioni di olio esausto utilizzati.

La scelta dell'olio fresco ricade sull'olio di frittura commerciale FRIOL, sia perché si intende inserire questo lavoro di tesi nell'ambito di un filone di ricerca attivo nel laboratorio di Fenomeni di trasporto e Biotecnologie (Naccarato C., 2012; Albo, 2013; Gioia, 2014; Naccarato S., 2014; Conte, 2015; Lopresto et al., 2015; Sanginiti, 2016) e sia perché, questo olio presenta caratteristiche standardizzate. Nello specifico l'olio FRIOL è costituito prevalentemente da olio di semi di girasole e in parte da oli vegetali frazionati. Di tale olio si intende valutare la composizione, cioè la quantità dei diversi gliceridi (mono-, di- e trigliceridi) presenti, la tipologia dei gliceridi stessi, semplici o misti, e il grado di insaturazione della catene idrocarburiche degli acidi grassi. Un'analisi cromatografica in HPLC, illustrata nel dettaglio nel capitolo 3A, consente di fornire tali informazioni e la distribuzione nei diversi gliceridi può essere riassunta nella seguente tabella:

<b>Composto</b>	<b>% in peso</b>
trigliceridi	97 - 98
digliceridi	2 - 2,5
monogliceridi	0 - 0,5

tabella 2.1: *Composizione di un campione di olio fresco FRIOL*

Già da dati di letteratura si considerano le informazioni riguardo alle caratteristiche dell'olio di girasole (Tyson, 2001; Farid & Behzadi, 2009), in cui si afferma che esso è costituito da trigliceridi misti e che la composizione nei diversi acidi grassi presenti nella struttura degli acilgliceroli è così schematizzata:

<b>Acido grasso</b>	<b>% in peso</b>
Ac. palmitico (16:0)	6,0
Ac. stearico (18:0)	4,2
Ac. oleico (18:1)	18,7
Ac. linoleico (18:2)	71,1

tabella 2.2: *Distribuzione degli acidi grassi in un campione di olio di girasole*

Sulla base di queste considerazioni e tenendo conto delle formule di struttura dei gliceridi e degli esteri, si calcolano i loro pesi molecolari, ottenendo:

<b>Composto</b>	<b>Peso molecolare MW [g/mol]</b>
trigliceride	878
digliceride	616
monogliceride	354
estere	308

tabella 2.3: *Pesi molecolari di gliceridi ed esteri*

I valori così ricavati per i diversi pesi molecolari sono confrontati con quelli dei rispettivi gliceridi semplici (tabella 2.4):

<i>Composto</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Composto</i>	<i>MW [g/mol]</i>
<b>trigliceride</b>	878	<b>trioleina</b>	885
<b>digliceride</b>	616	<b>dioléina</b>	620
<b>monogliceride</b>	354	<b>monoléina</b>	356
<b>estere</b>	308	<b>estere</b>	310

tabella 2.4: *Confronto dei pesi molecolari*

Si possono, quindi, ritenere valide le valutazioni presentate finora e impiegare tali dati nella trattazione che seguirà. Inoltre, questi dati saranno confermati da analisi cromatografiche specifiche, i cui metodi e risultati saranno presentati nei capitoli 3A e 4A rispettivamente.

Riguardo ai campioni di olio raccolti durante la campagna promossa dal progetto RecOIL saranno effettuate analisi puntuali, successive ai pretrattamenti dell'olio esausto, ma precedenti alla reazione. La scelta dell'alcol cade sul metanolo; i motivi di tale scelta si ritrovano sempre nelle specifiche illustrate nel progetto, dal momento che il biocarburante prodotto deve essere costituito da una miscela di esteri metilici di acidi grassi (FAMES). Per cui si parlerà di transesterificazione o metanolisi allo stesso modo. Inoltre, come già evidenziato, gli alcoli a catena corta - il metanolo, perciò, soprattutto - consentono di ottenere rese elevate; per cui l'impiego di tale reagente è consolidato anche nella pratica industriale, ma necessita di accortezze per garantire la sicurezza di persone e ambienti di lavoro, vista la sua natura tossica ed esplosiva. Il catalizzatore alcalino è l'idrossido di potassio.

A questo punto si procede con la progettazione e realizzazione dell'impianto di laboratorio, utilizzato sia per lo studio della reazione che per la produzione dei 30 litri di biodiesel. Successivamente, dopo attenta analisi dei lavori di letteratura e valutazioni presentate nel capitolo precedente, si individuano i parametri e le condizioni operative della transesterificazione di oli di frittura freschi ed esausti: temperatura di reazione, rapporto molare alcol:olio, quantità di catalizzatore, intensità dell'agitazione, durata della reazione. Nello specifico, per reazioni di durata pari a 90 minuti, si è fissata la temperatura a 55°C e si sono individuati due parametri chiave: il rapporto molare di alimentazione alcol:olio pari a 6:1 o 9:1, e la quantità di catalizzatore di 1,5% o 2% in peso rispetto all'olio utilizzato. La reazione prevede un'alimentazione molare

stechiometrica alcol:olio di 3:1, per cui qui si lavora con eccesso di alcol, secondo una pratica anche industriale piuttosto diffusa.

Si stabilisce, quindi, un piano programmatico che, partendo dall'olio FRIOL e procedendo con i diversi campioni di olio esausto RecOIL, esamina e risponde alle specifiche e agli obiettivi prefissati. Si effettuano una serie di prove sull'olio FRIOL, variando alcune condizioni operative, poiché l'analisi della reazione in tali condizioni fornisce informazioni importanti sulla comprensione di questo passaggio del processo e la definizione dei pretrattamenti necessari sull'olio esausto portano all'esecuzione di diverse prove relative alla trasformazione in catalisi basica dei WCOs in biodiesel. In particolare, riguardo ai pretrattamenti, si rende necessario la rimozione dei residui solidi grossolani e dei solidi in sospensione mediante filtrazione e si intende rimuovere l'acqua mediante l'impiego di un agente essiccante.

Al variare della provenienza degli oli esausti e anche delle condizioni operative si valuta la resa del processo, oltre che l'andamento della reazione e l'efficacia dei metodi di post trattamento implementati per l'allontanamento del glicerolo e la successiva purificazione della miscela esterea dai residui di metanolo e acqua. Si valuta la resa finale dei FAMES secondo il metodo previsto dalla norma UNI EN 14214 e la loro composizione in termini di acidi grassi presenti.

Parallelamente a queste prove se ne effettuano altre mirate alla valutazione della qualità del biodiesel prodotto a partire da specifici lotti di raccolta degli oli; per questa analisi dettagliata dei parametri previsti dalla normativa europea ci si affida ad un laboratorio certificato esterno.

Nella tabella 2.5 sono riassunte le diverse tipologie di prove in relazione alle variabili qui evidenziate: tipo di olio, rapporto molare di alimentazione e quantità di catalizzatore. Il dettaglio delle prove e i risultati ottenuti saranno presentati nel capitolo 4A.

Olio	rapporto molare metanolo:olio [mol/mol]	quantità KOH [% w/w]	N° prove
FRIOL	6:1	1,5	3
	9:1	1,5	
	6:1	2,0	
WCOs da diversi lotti nell'ambito delle raccolte Recoil	6:1	1,5	6
	9:1	1,5	
	6:1	2,0	
WCOs per produzione Recoil da campioni di raccolta 2-3-4	6:1	1,5	3
WCOs da specifici lotti di raccolta 1-2-3-4-5 Recoil, ma condizioni differenti nei pre- e post-trattamenti	6:1	1,5	5

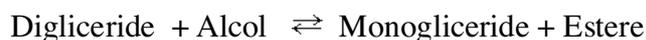
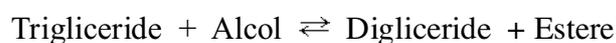
tabella 2.5: Diverse tipologie di prove sperimentali

Perciò alla luce di quanto affermato finora, si possono qui riassumere gli obiettivi del lavoro di tesi:

- studio della transesterificazione basica dei WCOs e valutazione delle rese del processo;
- produzione dei 30 litri di biodiesel e valutazione della qualità del biocarburante prodotto.

## 2.2 Parte IB: Transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti

Parallelamente all'impiego degli oli esausti nella catalisi basica, pratica industriale piuttosto diffusa, si intende indagare anche la possibilità di realizzare la transesterificazione di oli freschi ed esausti mediante reazione enzimatica. Le lipasi costituiscono una classe di enzimi dall'eccellente attività catalitica nella produzione di biodiesel da diversi substrati, costituiti da gliceridi, come la trioleina, oli vegetali freschi (oliva, sevo, colza, soia, tung, palma, nocciola, papaia, girasole, ecc...) ed esausti (UCO e WCO) o grassi animali (Gog et al., 2012). La reazione di transesterificazione, come precedentemente illustrato, avviene mediante tre reazioni reversibili in serie - parallelo:



in cui gli oli freschi ed esausti, così come i grassi, costituiscono la fonte di trigliceridi principalmente, e in piccola parte anche di digliceridi, monogliceridi e acidi grassi liberi.

La catalisi enzimatica, rispetto alla catalisi acida o basica, presenta alcuni vantaggi: la possibilità di ottenere apprezzabili rese in esteri a basse temperature; la possibilità che piccole quantità di acqua siano ammissibili e in alcuni casi necessarie nell'ambiente di reazione; la resa in esteri è piuttosto alta; non è necessario purificare gli esteri prodotti; l'immobilizzazione della lipasi, la sua rigenerazione e riutilizzo garantiscono una migliore stabilità termica e meccanica. Tuttavia l'elevato costo del biocatalizzatore, rispetto ai catalizzatori acidi o alcalini, costituisce ancora il principale svantaggio del processo di transesterificazione enzimatica. In tabella 2.6 si può riassumere il confronto tra i diversi processi in riferimento ad alcuni aspetti:

Variabile	Catalisi		
	basica	enzimatica	acida
Temperatura [°C]	60 - 70	30 - 40	55 - 80
FFA nell'olio	prodotti saponificati	esteri	esteri
Acqua nell'olio	interferenza	nessuna influenza	interferenza
Resa in estere	buona	elevata	buona
Recupero glicerolo	difficile	facile	difficile
Purificazione esteri	lavaggi ripetuti	nessuna	lavaggi ripetuti
Costo produzione catalizzatore	basso	elevato	basso

tabella 2.6: Confronto tra diverse tecnologie di produzione del biodiesel

In generale le variabili di processo più significative sono: la temperatura di reazione; il rapporto alcol:olio; il tipo e la quantità di catalizzatore; il tipo di olio; l'intensità di miscelazione. Nell'ambito di questo paragrafo e in tutta la sezione *IB* si esamineranno gli aspetti relativi alla transesterificazione enzimatica degli oli freschi in primo luogo e successivamente di UCO e WCO.

### 2.2.1 Tipi di lipasi

Diversi sono i tipi di lipasi utilizzate come biocatalizzatori nelle reazioni. Ad esempio, la *Candida antarctica* rappresenta una delle lipasi più impiegate nelle reazioni di transesterificazione, specialmente nella sua forma immobilizzata e commerciale Novozyme 435 (Nelson et al., 1996; Hsu et al., 2002; Xu et al., 2003; Salis et al., 2005; Xu et al., 2006; Azocar et al., 2010), utilizzata anche insieme con la Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* su silica gel) (Li et al., 2006; Liu et al. 2009) e la Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei* su resine idrofiliche macroporose a scambio ionico) (Winayanuwattikun et al., 2008; Liu et al., 2009). Anche i diversi tipi di Lipozyme sono stati impiegati come biocatalizzatore: Lipozyme TL IM (Hsu et al.,

2002; Du et al., 2005; Khor et al., 2010); Lipozyme RM IM (Salis et al., 2005; Kumari et al., 2007; De Paola et al., 2009); Lipozyme MM IM (*Mucor miehei* su resina macroporosa a scambio ionico) (Calabrò et al., 2010). La *Thermomyces lanuginosus* è stata impiegata anche dopo immobilizzazione su matrice polimerica microporosa (Dizge et al., 2009) e nano-particelle magnetiche (Xie et al., 2010).

Nella reazione di transesterificazione su diversi substrati altre lipasi sono state impiegate libere in soluzione: *Geotrichum candidum* e *Rhizopus delemar* (Nelson et al., 1996); *Rhizopus niveus* (Iso et al., 2001); *Candida rugosa* (Kaieda et al., 2001; Shah et Gupta, 2007); *Mucor javaricus* (Iso et al., 2001; Shah et Gupta, 2007).

Nella reazioni di transesterificazione finalizzate alla produzione di biodiesel le *Pseudomonas* costituiscono un gruppo importante di lipasi, in particolare la *Pseudomonas fluorescens* (Kaieda et al., 2001; Iso et al., 2001; Kumari et al., 2007; Shah et Gupta, 2007) e la *Pseudomonas cepacia*. Di quest'ultima, conosciuta anche come *Burkholderia cepacia*, negli ultimi decenni sono state investigate le proprietà in diversi lavori scientifici (Kazlauskas et al., 1991; Stamatis et al., 1993; Lemke et al., 1997; Pencreac'h et Baratti, 1997; Kim et al., 1997; Schrag et al., 1997; Reetz and Jaeger, 1998; Lang et al., 1998; Hsu et al., 2000; Schulz et al., 2000; Nouredдини et al., 2002; Soumanou et Bornscheuer, 2003). La lipasi *Pseudomonas cepacia*, oltre che nelle reazioni di idrolisi ed esterificazione, è utilizzata come biocatalizzatore nella transesterificazione - con metanolo o etanolo - di oli edibili (Kaieda et al., 2001; Soumanou et Bornscheuer, 2003; Nouredдини et al., 2005; Gamba et al., 2008) e non edibili (Kumari et al., 2007; Shah et Gupta, 2007; Li & Yan, 2010), ma anche di WCOs (Al-Zuhair et al., 2009).

### Lipasi libere in soluzione

Gli aspetti principali nell'utilizzo delle lipasi come catalizzatori nella reazione di transesterificazione dei gliceridi possono essere così riassunte:

- individuazione del tipo di lipasi che ha la migliore prestazione per la transesterificazione di un dato olio,
- uso dell'alcool più adatto e nella quantità opportuna, cioè tale da non causare la disattivazione dell'enzima;

- valutazione della convenienza dell'impiego di un solvente;
- verifica dell'inibizione data dall'eventuale presenza di acqua;
- determinazione del tempo oltre il quale la lipasi impiegata perde la propria efficienza catalitica.

In letteratura sono presenti diversi tipi di lipasi impiegate per le reazioni di transesterificazione di differenti oli. La tabella 2.7 riassume le principali informazioni sul processo e le prestazioni dei biocatalizzatori impiegati (Bajaj et al., 2010):

Olio	Alcool	Lipasi	Conversione [%]	Solvente
jatropha	Etanolo	<i>Chromobacterium viscosum</i>	92	-
	Etanolo	<i>Burkholderia cepacia</i>	79	-
	Metanolo	<i>Enterobacter aerogenes</i>	94	tert-butanolo
tallow	Metanolo	<i>Mucor miehei</i>	98,4	esano
	Etanolo	<i>Mucor miehei</i>	98,3	
	Propanolo	<i>Mucor miehei</i>	98,6	esano
	Butanolo	<i>Mucor miehei</i>	99,6	esano
	Isobutanolo	<i>Mucor miehei</i>	99,4	esano
soia	Metanolo	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	>90	-
	Etanolo	<i>Mucor miehei</i>	97,4	esano
	Metanolo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	92	n-eptano
	Etanolo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	71	iso-ottano
	Metanolo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	83,8	-
	Metanolo	<i>Rhizomucor miehei</i>	92,2	esano
soia-colza	Metanolo	<i>Candida antartica</i>	98,4	-
girasole	Metanolo	<i>Candida antartica</i>	97	-
WCO	Metanolo	<i>Bacillus subtilis</i>	90	-

tabella 2.7: Confronto dell'attività di diversi tipi lipasi su vari substrati

*Nelson et al.* hanno investigato in primo luogo l'uso della lipasi *Mucor miehei* su olio di tallow in diverse prove che differiscono in base al tipo di alcool utilizzato: metanolo, etanolo, propanolo, butanolo, isobutanolo. In ogni prova (tranne che in quella con l'etanolo) il solvente è esano e le conversioni ottenute sono elevate, superiori al 98%. La stessa lipasi è stata poi utilizzata nella transesterificazione di olio di soia con etanolo in presenza di esano, raggiungendo conversioni elevate anche in questo caso (97,4%). La lipasi *Pseudomonas fluorescens* immobilizzata è stata impiegata su olio di soia con metanolo (in un caso con alimentazione a *step*) in presenza di n-eptano ottenendo una conversione del 92% (Luo et al., 2006), in un altro caso con rapporto molare alcool:olio pari a 3:1, raggiungendo conversioni dell'83,8% (Yang et al., 2009), mentre con etanolo (rapporto molare alcool:olio pari a 3:1) in presenza di iso-ottano come solvente si è registrata una conversione più bassa, cioè pari al 71% (Zhao et al., 2007). *Shimada et al.* hanno valutato l'uso di *Candida antarctica* su una miscela di olio di soia e di colza, alimentando a *step* il metanolo e ottenendo conversioni elevate (98,4%). Anche *Belafi-Bako et al.* hanno impiegato lo stesso enzima, ma nella reazione di transesterificazione di olio di girasole con metanolo (alimentazione continua) con rese sempre elevate (97%). Utilizzando olio di soia sono state raggiunte conversioni significative sia con la lipasi *Thermomyces lanuginosa* con metanolo (Du et al., 2005) che con la *Rhizomucor miehei* con metanolo in presenza di esano come solvente (Shieh et al., 2003); le conversioni ottenute sono state rispettivamente superiori al 90% e al 92,2%. Sul WCO si è esaminata l'azione della lipasi *Bacillus subtilis* con metanolo alimentato a *step*, raggiungendo una conversione del 90% (Ying e Chen, 2007). Sull'olio di *jatropha* è stata testata l'efficacia di tre diverse lipasi: la *Chromobacterium viscosum* con etanolo con conversioni del 92% (Shah et al., 2004), l'*Enterobacter aerogens* con metanolo e *tert*-butanolo come solvente, raggiungendo conversioni maggiori (94%) (Kumari et al., 2009), mentre si è raggiunto solo il 79% impiegando la *Burkholderia cepacia* con etanolo.

In ogni caso l'obiettivo prefissato è l'ottimizzazione del processo di produzione del biodiesel. A questo scopo sono state messe a punto diverse strategie per migliorare la resa nel prodotto desiderato e per ottenere bassi tempi di reazione, agendo sulla temperatura, durata del processo e velocità di agitazione, e tenendo conto delle diverse combinazioni di lipasi, olio, alcool ed eventualmente solvente impiegati.

### Immobilizzazione e riuso dell'enzima

Uno dei più comuni inconvenienti nei processi di catalisi enzimatica è rappresentato dall'alto costo dell'enzima. L'immobilizzazione dell'enzima su opportuni supporti consente di conferire all'enzima stesso una maggiore stabilità nei confronti della temperatura e di altre cause di denaturazione. In questo modo non solo si preserva l'enzima da un'eventuale perdita significativa di attività nell'ambiente di reazione, ma nello stesso tempo se ne rende più agevole la gestione, il recupero e il riciclo, abbassando i costi del processo. L'attività dell'enzima sarà così legata anche alle proprietà chimiche e fisiche del *carrier* impiegato per l'immobilizzazione. Per lipasi come *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia* sono stati sperimentati diversi supporti per l'immobilizzazione: *celite*, *cellulose fabric*, SM-10, silica gel (Bajaj et al., 2010). È stata, inoltre, testata l'efficacia dell'immobilizzazione della lipasi *Pseudomonas cepacia* su supporti sferici di materiale ceramico nella produzione di biodiesel da WCO e metanolo rispetto alle prestazioni esibite senza immobilizzazione: l'enzima immobilizzato è più efficiente nella produzione di biodiesel anche in presenza di elevati contenuti di acqua, ma in assenza di solvente organico. L'impiego di esano come solvente, infatti, produce un effetto negativo sulla velocità di produzione del composto obiettivo, a causa della diluizione dei reagenti e dell'aggiunta di resistenze al trasporto di materia (Al-Zuhair et al., 2009). La lipasi *Thermomyces lanuginosus*, utilizzata nella transesterificazione di olio di soia con metanolo alimentato a *step*, consente di raggiungere una conversione del 66%; l'immobilizzazione di questa lipasi su silica gel nello stesso processo permette di ottenere una conversione massima del 90% (Du et al., 2005). La reazione di transesterificazione di olio di tung con metanolo, impiegando la lipasi immobilizzata NOVO435 da *Candida antarctica* in un ambiente di reazione privo di solvente, ha consentito di raggiungere un'apprezzabile resa in esteri nel primo utilizzo (67,5%). La lipasi è stata sottoposta a lavaggio con acetone ed è stata così impiegata altre 4 volte, mostrando una riduzione della resa del 6% al termine del processo (Xu et al., 2006). Il costo del processo può essere ridotto se si impiega un'opportuna combinazione di lipasi immobilizzate. Ad esempio gli enzimi immobilizzati Novozyme 435 e Lipozyme TL-IM forniscono una conversione in esteri del 97,2% e possono essere riutilizzati 20 volte. La stessa combinazione di enzimi (qui in quantità pari al 3% di Lipozyme TL-IM e 1%

di Novozyme 435, in peso rispetto al quantitativo di olio) è stata utilizzata nella transesterificazione di olio di colza con metanolo in *tert*-butanolo come sovente organico, consentendo di raggiungere una conversione del 95%, con la possibilità di riuso dell'enzima per 200 volte (Li et al., 2006). La combinazione di enzimi Novozyme 435 - Lipozyme TL-IM in un mezzo di reazione rappresentato da *tert*-butanolo è stata ulteriormente impiegata nella preparazione di biodiesel da WCO, mostrando un'elevata stabilità durante le 300 ore di reazione corrispondenti a 30 cicli, al termine dei quali le lipasi combinate hanno presentato l'85% dell'attività iniziale (Li et al., 2006).

### 2.2.2 Tipi di alcol e alimentazione a step

Nelle reazioni esaminate in questo capitolo diversi sono gli alcoli utilizzati: metanolo, etanolo, 1-propanolo, 1-butanolo, 2-butanolo, isobutanolo (2-metil-1-propanolo) e alcol isoamilico (3-metil-1-butanolo). In ogni caso è valutato il tipo di alcol e la condizione di alimentazione. Nella reazione di transesterificazione il rapporto di alimentazione molare alcool:olio è di 3:1; per cui un eccesso di alcool rispetto a quello stechiometrico porterebbe ad un aumento nella conversione in esteri. Tuttavia, si è trovato che gli alcoli che hanno una catena di atomi di carbonio superiore a 3 si dissolvono completamente nell'olio in quantità stechiometrica, mentre le solubilità del metanolo e dell'etanolo sono rispettivamente 1/2 e 2/3 di quella stechiometrica. Studiando la metanolisi di oli vegetali e impiegando la lipasi *Candida antarctica* (Novozym 435), si è visto che per valori di metanolo/acido grasso superiori a 0,5 mol/mol la conversione in estere diminuisce sensibilmente (Shimada et al., 2003), come è evidente nella figura 2.1:

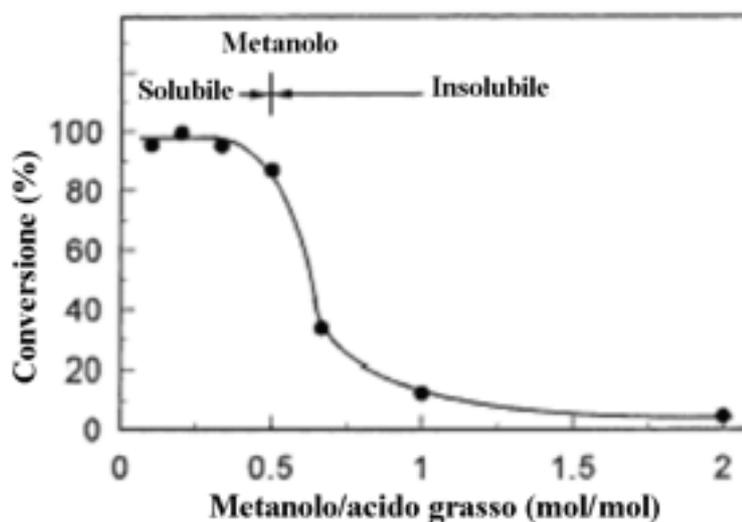


figura 2.1: Dipendenza della conversione dalla solubilità dell'alcool (Shimada et al., 2003)

Poiché le proteine generalmente sono instabili negli alcoli a catena corta, si è ipotizzato che le basse conversioni raggiunte nella metanolisi siano dovute alla disattivazione della lipasi in seguito al contatto col metanolo non solubilizzato, presente sotto forma di gocce. Tali considerazioni sono state ritenute valide anche nel caso dell'etanolisi. Inoltre, pur utilizzando in reazioni successive quantità di metanolo o etanolo inferiori al limite di solubilità, non si è ripristinata l'attività della lipasi, essendo stata irreversibilmente disattivata dal contatto con l'alcool non solubilizzato nell'olio (Wu et al., 2004; Li et al., 2006). Pertanto nella metanolisi (e per estensione anche nell'etanolisi) viene alimentato l'alcool in tre *steps* successivi, in ognuno dei quali il rapporto molare alcool:olio è di 1:1 (Nelson et al., 1996; Shimada et al., 2003). In figura 2.2 si osserva l'evoluzione della reazione nel tempo nel caso di due e tre iniezioni di metanolo:

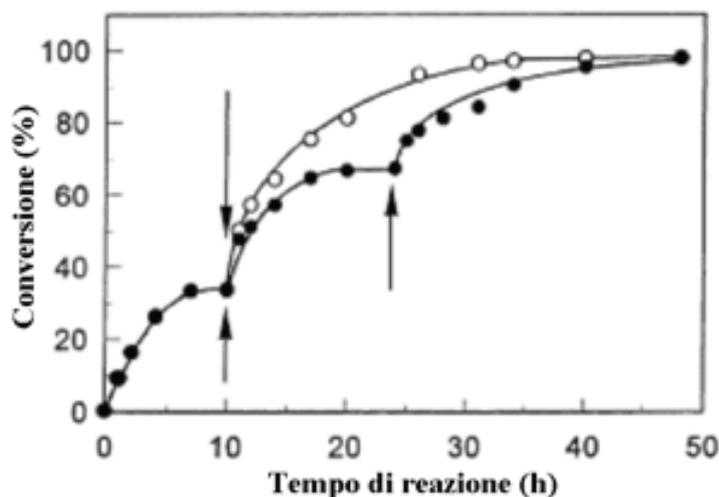


figura 2.2: Conversioni raggiunte in sistemi alimentati a step di alcool (Nelson et al., 1996; Shimada et al., 2003)

Xie et al. hanno valutato l'effetto del rapporto molare metanolo:olio sulla conversione raggiunta nella transesterificazione enzimatica di olio di soia senza l'utilizzo di un solvente e impiegando una lipasi immobilizzata. La temperatura è di 45°C e il tempo di reazione è di 12 ore. Sono stati considerati cinque diversi valori del rapporto molare metanolo:olio pari a 1:0,5; 1:1; 1,5:1; 2:1 e 3:1.

I risultati, espressi in termini di conversione nel tempo, sono stati riportati nella seguente figura 2.3:

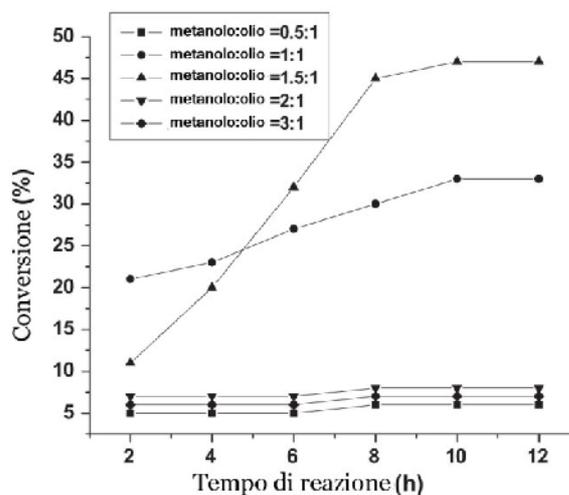


figura 2.3: Effetto del rapporto metanolo:olio sulla transesterificazione di olio di soia con enzima immobilizzato (Xie et al., 2010)

Si può vedere che ogni valore del rapporto molare metanolo:olio superiore a 1,5:1 potrebbe portare alla disattivazione dell'enzima; il motivo di ciò risiede sempre nella bassa solubilità del metanolo nell'olio. Perciò anche in questo caso si è optato per un'alimentazione dell'alcool in tre *steps* consecutivi, mantenendo un rapporto molare globale metanolo:olio pari a 3:1.

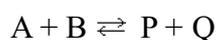
Si è anche valutata la possibilità di alimentare l'alcool in due *steps* anziché in tre: *Xu et al.* hanno trovato le condizioni ottimali della transesterificazione di olio di *tung* con metanolo, utilizzando la lipasi immobilizzata NOVO435 come catalizzatore in un ambiente privo di solvente. Il rapporto molare metanolo:olio è di 2,2:1, da alimentare in due *steps* successivi, raggiungendo una conversione totale dell'85% dopo 36 ore di reazione.

### 2.2.3 Solvente nell'ambiente di reazione

È stato dimostrato che gli enzimi mostrano una maggiore attività e una buona stabilità in solvente organici idrofobi (Liu et al., 2009). È largamente diffuso l'impiego di esano (Nelson et al., 1996; Shieh et al., 2003; De Paola et al., 2009). In alcuni casi si è scelto l'esano tra i diversi solventi organici riportati in letteratura, proprio perché questo presenta un basso punto di ebollizione, rendendo così più agevole la sua separazione dagli altri prodotti di reazione (Calabrò et al., 2010). Nella transesterificazione enzimatica di olio di soia con metanolo, catalizzata dalla *Pseudomonas fluorescens* immobilizzata, si è utilizzato il n-eptano (Luo et al., 2006), mentre nella reazione con l'etanolo e la *Pseudomonas fluorescens* il solvente organico è l'iso-ottano (Zhao et al., 2007). Quindi, sebbene il n-esano e gli altri solventi organici abbiano garantito agli enzimi buone condizioni per ottenere alte conversioni, si è constatato che il metanolo e il glicerolo hanno scarsa solubilità in tali solventi idrofobi, causando effetti negativi sull'attività delle lipasi e sulla loro stabilità. Di conseguenza si è optato per un solvente moderatamente polare come il *tert*-butanolo (Li et al., 2006; Liu et al., 2009), nel quale sia il metanolo che il glicerolo sono solubili.

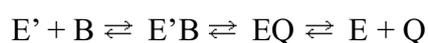
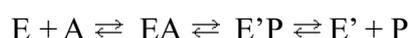
## 2.2.4 Cinetica enzimatica

I riferimenti in letteratura mostrano che la cinetica della reazione di transesterificazione enzimatica di oli vegetali è espressa sulla base del meccanismo *Ping Pong Bi Bi* o a *doppio spostamento* (Al-Zuhair et al., 2009; Calabrò et al., 2010). Questo è relativo al caso in cui sono coinvolti più substrati ed è caratterizzato dalla dissociazione di uno o più prodotti dall'enzima prima che tutti i substrati si siano legati ad esso (Bisswanger, 2002). Si tratta quasi sempre di reazioni di trasferimento, e in questo specifico caso di doppio trasferimento. Una generica reazione con due substrati (A e B) e dalla quale si ottengono due prodotti (P e Q) può essere così indicata:



*equazione 2.1*

Se si considera anche il ruolo giocato dall'enzima, si ricava il seguente schema (Marangoni, 2003):



*equazioni 2.2*

in cui  $E$  rappresenta l'enzima nella sua forma nativa ed  $E'$  in quella modificata. Pertanto, si può ritenere che il substrato  $A$  reagisca con l'enzima  $E$ , dando il prodotto  $P$  e una forma modificata  $E'$  di  $E$ . In seguito la reazione del substrato  $B$  con  $E'$  porta al prodotto  $Q$  e alla rigenerazione dell'enzima  $E$ .

Secondo questo meccanismo i substrati  $A$  e  $B$  non si incontrano mai sull'enzima. Per ottenere l'equazione cinetica le reazioni da considerare sono:



*equazioni 2.3*

che è equivalente a quanto indicato in figura 2.4:

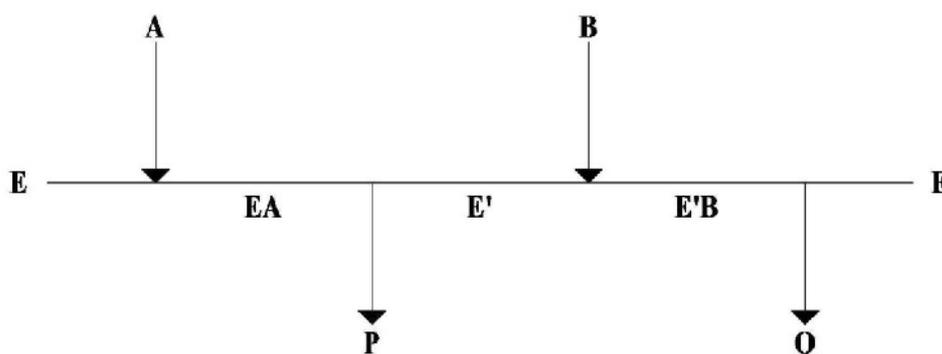
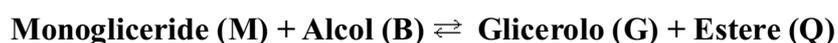
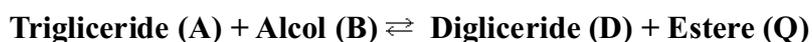


figura 2.4: *Meccanismo di reazione Ping Pong Bi Bi*

Nella transesterificazione di olio con alcol le tre reazioni reversibili in serie – parallelo si possono riscrivere con la notazione seguente:



I due substrati principali sono i trigliceridi (A) e l'alcol (B), dal momento che la quantità di digliceridi (D) e monogliceridi (M) presenti inizialmente e che partecipano alla reazione sono basse rispetto a quella dei trigliceridi. Il meccanismo ipotizzato è riportato in figura 2.5 (Calabrò et al., 2010):

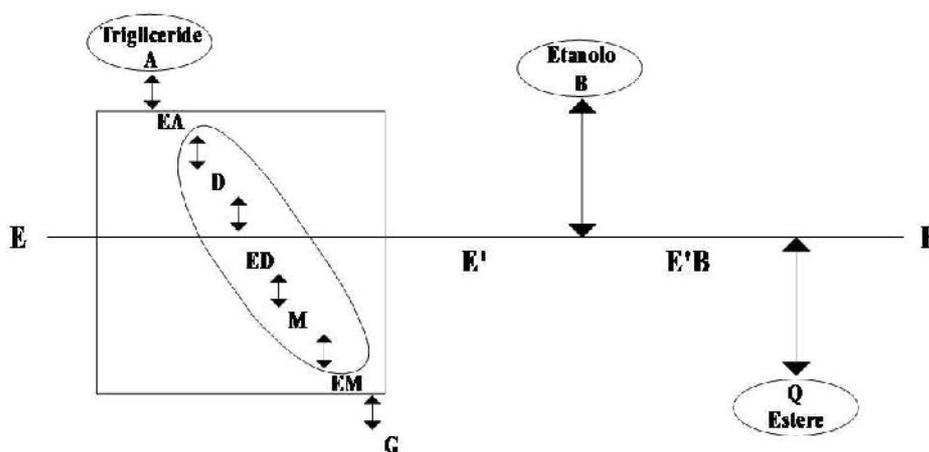


figura 2.5: Meccanismo di reazione ipotizzato

Il trigliceride *A* viene per prima attaccato dall'enzima *E*, formando il complesso attivato *EA*; questo si trasforma in un nuovo complesso attivato *E'*, costituito dall'enzima legato alla catena oleica, rilasciando *D*. A sua volta il digliceride *D* con *E* forma il complesso *ED*, che rilascia *M* e nuovamente il complesso *E'*. Infine *M* si complessa con l'enzima *E* per dare *EM*, rilasciare *E'* e il glicerolo *G*. Gli *E'* ottenuti in questa fase reagiscono con l'etanolo *B* per formare il complesso *E'B*, il quale rilascia l'estere *Q* e restituisce l'enzima *E*. Invece di trattare questo meccanismo in maniera dettagliata, si semplifica il modello guardandolo macroscopicamente. A questo scopo si considerano:

- i reagenti: Trigliceride **A** ed Alcol **B**
- i prodotti: estere **Q** e **P** (Digliceride + Monogliceride + Glicerolo)

Pertanto il meccanismo, schematizzato nella forma *Ping Pong Bi Bi* e indicato nelle equazioni 2.3, è riportato in figura 2.6:

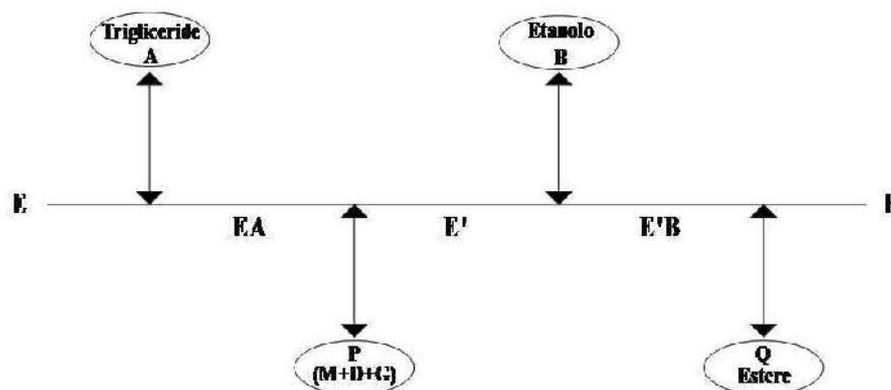


figura 2.6

Per derivare l'equazione cinetica ci si avvale del metodo di *King – Altman* (King e Altman, 1956) che si basa sull'approssimazione dello stato quasi – stazionario. Questo modello ipotizza che i vari intermedi di reazione in cui è legato l'enzima siano allo stato stazionario, ovvero in equilibrio dinamico, e ne valuta la velocità dallo stadio in cui è presente il composto d'interesse. Da analisi sperimentali si è visto che tale approssimazione è valida soprattutto quando il rapporto enzima/substrato è sufficientemente piccolo (Catalano, 2004). La trattazione dettagliata del metodo e la sua applicazione nel caso della transesterificazione enzimatica di oli con alimentazione a *step* dell'alcol, considerando l'eventuale inibizione dell'alcol stesso, è stata affrontata nella mia Tesi Specialistica (Albo, 2013), di cui qui si riportano le equazioni cinetiche ricavate nei casi a) *senza* inibizione da alcol e b) *con* inibizione da alcol:

a)

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{K_1[A][B] - K_2[P][Q]}{K_3[A] + K_4[B] + K_5[A][B] + K_6[P] + K_7[A][P] + K_8[Q] + K_9[B][Q] + K_{10}[P][Q]}$$

b)

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{K_1[A][B] - K_2[P][Q]}{K_3[A] + K_4[B] + K_5[A][B] + K_6[P] + K_7[Q] + K_8[P][Q] + K_9[A][Q] + K_{10}[B][Q] + K_{11}[B]^2 + K_{12}[B][P]}$$

equazioni 2.4

in cui  $r_Q$  è la velocità di reazione, definita in termini di formazione dell'estere  $Q$ ,  $[E_0]$  è la concentrazione iniziale della lipasi, le  $K_i$  rappresentano i diversi raggruppamenti delle costanti cinetiche (Albo, 2013).

Nell'ambito di questo lavoro si intende verificare la validità del modello cinetico, già utilizzato in altre sedi, nelle condizioni qui implementate e con particolare riferimento al caso degli oli esausti.

### 2.2.5 Obiettivi e programmazione nella transesterificazione enzimatica

Nella *Parte IB* si intende testare la lipasi Epobond *Pseudomonas cepacia* nella transesterificazione enzimatica di un olio fresco commerciale (FRIOL) e di due tipi di olio esausto (UCO e WCO). Il lavoro di ricerca si innesta nell'ambito delle attività finora promosse per quanto riguarda la catalisi enzimatica, partendo dal lavoro della mia tesi specialistica, in cui si è impiegata la lipasi Lipo *Pseudomonas cepacia* (le due lipasi differiscono per il metodo di immobilizzazione e il supporto), e proseguendo con una serie di prove “di collegamento” in una prima fase e con quelle specifiche di questo lavoro nelle fasi successive. La transesterificazione enzimatica è condotta con etanolo. I dati ottenuti e rielaborati saranno presentati nel capitolo 4B, allo scopo di studiare l'andamento della reazione e valutare la performance del processo con riferimento agli aspetti indagati; infine sarà valutata anche l'applicazione del modello cinetico al caso degli oli esausti.

Definizione delle attività sperimentali:

La fase sperimentale, in cui tutte le prove e l'analisi dei campioni prelevati sono condotti in doppio, è suddivisa in tre momenti **A**, **B**, **C**. In ognuno di essi si indicano le condizioni operative dell'etanolisi: il tipo di olio; il tipo, lo stato (fresco o riutilizzato) e la quantità di lipasi, la durata della reazione, il numero degli *steps* di alimentazione dell'etanolo, la tipologia di lavaggio della lipasi nel caso del riutilizzo del catalizzatore.

1. **Fase A:** si impiega un olio di frittura fresco (FRIOL) e l'enzima lipo *P. cepacia* per la conduzione, in primo luogo, di prove sperimentali dalla durata di 5 ore in cui si vuole analizzare l'effetto di alcune variabili, come la quantità di enzima caricato e lo stato dell'enzima, sulla performance della transesterificazione di olio fresco con etanolo alimentato in 3 *steps* consecutivi. Qui si sono esaminati i casi relativi all'enzima fresco e a quello separato e riutilizzato senza lavaggio in nuovi cicli di reazione. Come sopra affermato, queste prove (dalla #1 alla #9), condotte ed analizzate nel mio precedente lavoro di tesi specialistica, costituiscono il punto di partenza per le altre che seguiranno (dalla #10 alla #35), finalizzate allo studio della transesterificazione con lipasi epobond *P. cepacia* su oli freschi ed esausti. Pertanto, si è ritenuto opportuno testare l'attività catalitica della lipasi lipo *P. cepacia* conservata per 2 anni e riutilizzata dalle prove #10 in poi, constatando che il biocatalizzatore presenta ancora valori apprezzabili di attività catalitica per una durata della reazione di 9 ore. In queste condizioni sono state condotte delle prove al variare della quantità di enzima fresco impiegato (#10 - #13). La tabella 2.8 riassume le prove previste per la fase **A**:

Fase sperimentale <b>A</b> (FRIOL, lipo <i>P. cepacia</i> )				
Prova	durata [h]	stato lipasi	quantità lipasi [%w/wolio]	N° steps alimentazione alcol
<b>1</b>	5	F, fresco	1%	3
<b>2</b>	5	R1, riutilizzato da #1 (senza lavaggio)	1%	3
<b>3</b>	5	R2, riutilizzato da #2 (senza lavaggio)	1%	3

<b>4</b>	5	F, fresco	3%	3
<b>5</b>	5	R1, riutilizzato da #4 (senza lavaggio)	3%	3
<b>6</b>	5	R2, riutilizzato da #5 (senza lavaggio)	3%	3
<b>7</b>	5	F, fresco	5%	3
<b>8</b>	5	R1, riutilizzato da #7 (senza lavaggio)	5%	3
<b>9</b>	5	R2, riutilizzato da #8 (senza lavaggio)	5%	3
<b>10</b>	9	F, fresco	1%	3
<b>11</b>	9	F, fresco	3%	3
<b>12</b>	9	F, fresco	5%	3

tabella 2.8: Prove sperimentali della fase A

in cui nelle colonne si indica la denominazione e la durata della reazione; lo stato del catalizzatore fresco F o riutilizzato R (in quest'ultimo caso si numera il ciclo di riutilizzo e l'eventuale lavaggio a cui il catalizzatore è stato precedentemente sottoposto) e la sua quantità, valutata come percentuale ponderale sulla massa di olio caricata; il numero degli *steps* di alimentazione dell'alcol.

2. **Fase B:** si vuole testare la lipasi epobond *P. cepacia* nella transesterificazione dell'olio vegetale fresco FRIOL con etanolo alimentato in tre *steps*, ciascuno dalla durata di 3 ore, sia nel caso di enzima fresco con diverse quantità caricate, sia per quantità fissata di lipasi, lavata e riutilizzata in nuovi cicli di reazione (prove dalla #13 alla #21). Successivamente, con l'enzima fresco e quantità pari al 3%, si intende valutare l'andamento temporale dei diversi composti durante il corso della reazione, variando il numero e la durata degli *steps* di alimentazione dell'alcol (prove dalla #22 alla #25). La lipasi qui utilizzata sarà poi sottoposta a lavaggio con acqua o esano e riutilizzata nelle stesse condizioni delle prove #22 - #23 - #24 - #25 (prove dalla #26 alla #29), come riassunto nella tabella 2.9:

Fase sperimentale B (FRIOL, epobond <i>P. cepacia</i> )				
Prova	durata [h]	stato lipasi	quantità lipasi [%w/wolio]	N° steps alimentazione alcol
<b>13</b>	9	F, fresco	1%	3
<b>14</b>	9	F, fresco	3%	3
<b>15</b>	9	F, fresco	5%	3
<b>16</b>	9	R1, riutilizzato da #14 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>17</b>	9	R2, riutilizzato da #16 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>18</b>	9	R3, riutilizzato da #17 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>19</b>	9	R4, riutilizzato da #18 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>20</b>	9	R5, riutilizzato da #19 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>21</b>	9	R6, riutilizzato da #20 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>22</b>	9	F, fresco	3%	1
<b>23</b>	9	F, fresco	3%	2 [6 h + 3 h]
<b>24</b>	9	F, fresco	3%	2 [4,5 h + 4,5 h]
<b>25</b>	9	F, fresco	3%	6 [1,5 h ciascuno]
<b>26</b>	9	R1, riutilizzato da #22 (lavaggio con acqua)	3%	1
<b>27</b>	9	R1, riutilizzato da #24 (lavaggio con acqua)	3%	2 [4,5 h + 4,5 h]
<b>28</b>	9	R1, riutilizzato da #23 (lavaggio con acqua)	3%	3
<b>29</b>	9	R1, riutilizzato da #25 (lavaggio con esano)	3%	3

tabella 2.9: Prove sperimentali della fase B

Questa tabella riporta le stesse informazioni relative a ciascuna reazione, come già illustrato per la tabella 2.8.

3. **Fase C:** esaminati gli aspetti relativi allo stato dell'enzima e al diverso numero e durata degli *steps* di alimentazione dell'etanolo, si intende qui esaminare le caratteristiche della transesterificazione condotta su due tipi di oli di frittura esausti (UCO e WCO) al variare della quantità della lipasi epobond *P. cepacia* impiegata (prove dalla #30 alla #35), elencate nella tabella 2.10:

Fase sperimentale C (WCOs, epobond <i>P. cepacia</i> )					
Prova	durata [h]	olio	stato lipasi	quantità lipasi [%w/Wolio]	N° steps alimentazione alcol
<b>30</b>	9	UCO	F, fresco	1%	3
<b>31</b>	9	UCO	F, fresco	3%	3
<b>32</b>	9	UCO	F, fresco	5%	3
<b>33</b>	9	WCO	F, fresco	1%	3
<b>34</b>	9	WCO	F, fresco	3%	3
<b>35</b>	9	WCO	F, fresco	5%	3

tabella 2.10: Prove sperimentale della fase C

*Parte IA*



## *Parte IA: Transesterificazione basica di oli esausti per produzione di biodiesel*

### **Capitolo 3A: Materiali e metodi**

In questo lavoro di tesi si vuole studiare il processo di produzione di biodiesel dagli oli di frittura esausti (WCOs) nell'ambito del progetto RecOIL. Pertanto, si possono individuare tre momenti caratteristici del processo: pretrattamenti degli oli esausti, reazione di transesterificazione con catalizzatore basico e post-trattamenti per la purificazione della miscela di esteri metilici (FAMES) prodotta. Le caratteristiche della reazione e la qualità del biofuel ottenuto sono valutate in diversi stadi e con metodologie cromatografiche specifiche. I diversi pretrattamenti sono comuni a tutti i tipi di oli di frittura esausti impiegati nel processo, e i post-trattamenti individuati si applicano a tutte le miscele di FAMES prodotte, cioè anche a quelle ottenute a partire da olio fresco. Lo stadio centrale di tutto il processo è costituito dalla reazione; la denominazione delle prove è riassunta qui di seguito:

- **Prova F:** relativa all'impiego di olio fresco FRIOL;
- **prova WCO:** relativa all'utilizzo di diversi campioni di oli di frittura esausti, raccolti nell'ambito di specifici lotti di WCOs (RecOIL);
- **prova Pro:** relativa all'uso di oli esausti delle raccolte 2, 3 e 4;
- **prova Racc:** relativa all'impiego di WCOs specifici nell'ambito delle 5 raccolte previste, dal mese di ottobre del 2014 (raccolta 1) e periodicamente fino al mese di aprile del 2015 (raccolta 5), con durata di post-trattamento diversa dalle prove **Pro**.

Nelle prove **F**, **WCO** e **Pro** si valuta l'andamento della reazione e la resa finale degli esteri metilici prodotti, mentre per le prove **Racc** si prevede un'analisi della qualità del prodotto finale secondo i parametri previsti dalla normativa europea UNI EN 14214.

### **3.1A: Materiali utilizzati**

Nelle prove sperimentali effettuate sono stati usati i seguenti reagenti:

- Olio commerciale fresco Friol, costituito prevalentemente da olio di semi di girasole e da oli vegetali frazionati;
- olio di frittura esausto RecOIL, proveniente da raccolte a domicilio effettuate in momenti diversi (da ottobre 2014 ad aprile 2015) e processato;
- metanolo prodotto da AnalR Normapur (purezza > 99,5 %);
- idrossido di potassio prodotto da Sigma Aldrich (purezza >90 %);
- solfato di sodio anidro prodotto da S.A. Sulquisa;
- solventi prodotti da Sigma Aldrich: acetone, acetonitrile, iso-ottano, decano, esano (purezza >99,5%);
- estere C19, prodotto da Sigma Aldrich.

Ci si è avvalsi della strumentazione e delle apparecchiature seguenti:

- pallone da 1000 ml a tre colli e un pallone da 500 ml a due colli;
- condensatore in vetro a tre e sei bolle;
- termocoppia S/N L131287 della CalSystem;
- bilancia Mettler Toledo PB3002-S, usata per pesare l'olio;

- bilancia Sartorius CP225D-0CE, usata per pesare il catalizzatore e i campioni da analizzare al GC;
- rotavapor Heidolph G3 e annessa pompa da vuoto;
- HPLC prodotto dalla Jasco, costituito da una Intelligent Hplc Pump PU-980, da un Intelligent RI Detector RI-930, una colonna Alltech Adsorbosphere HS (C18);
- GC prodotto da Agilent Technologies, GC System 7890 A, colonna prodotta da Agilent Technologies DB – FFAP lunga 30 metri, diametro di 0,250 mm e con uno spessore di film pari a 0,25  $\mu\text{m}$ , ed un range operativo di temperatura da 40 °C a 250 °C;
- micropipette Kartel da 2 – 20  $\mu\text{l}$ , 10 – 1000  $\mu\text{l}$ , vials di vetro della Sigma Aldrich;
- vetreria di laboratorio (beute, beute codate, beakers, cilindri, buckners,);
- pompa da vuoto prodotta da KNF, modello N811KT.18;
- carta da filtro prodotta dalla VWR da 55mm di diametro e porosità di 1  $\mu\text{m}$ .

### **3.2A: Modalità di esecuzione delle prove**

Ogni prova comprende tre passaggi fondamentali:

- Pretrattamento dell'olio esausto
- Reazione di transesterificazione
- Post-trattamenti sulla miscela esterea prodotta

### 3.2.1A Pretrattamento dell'olio esausto

L'olio esausto raccolto ha una colorazione piuttosto scura e risulta torbido, come si vede nell'immagine a lato; questi aspetti visivi dipendono dal particolare campione considerato. Quantità note di WCOs, di almeno 1 litro alla volta, sono filtrate con un colino da cucina in modo da eliminare i residui solidi grossolani dovuti ai processi di frittura. Si è valutato che circa 1/4 del volume iniziale di olio raccolto è costituito da massa residuale, allontanata poi dai pretrattamenti. Successivamente si aggiunge il sale  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , che agisce da agente essiccante, per eliminare o ridurre il quantitativo di acqua. Il sale ha una consistenza piuttosto fine; come precedentemente affermato, questo inizialmente si trova anidro in sospensione, poi si recupera sul fondo sottoforma di sale decaidrato di aspetto cristallino. Questo stadio ha durata di 20 - 30 minuti, ma in generale dipende dalla quantità di acqua presente nella fase organica. Segue una filtrazione sottovuoto per purificare l'olio esausto dai residui solidi fini e dal solfato di sodio decaidrato ottenuto. Al termine di queste fasi l'olio pretrattato è abbastanza limpido, soprattutto se confrontato con l'olio esausto di partenza. Lo stadio lento è sicuramente la filtrazione sottovuoto, e i tempi di questo *step* dipendono dalla quantità di sostanze residuali presenti nel campione di WCO sottoposto a trattamento; il filtro carta necessita di essere sostituito con maggiore frequenza e i pori in ogni caso saranno parzialmente ostruiti dalle sostanze di deposito, che rallentano la filtrazione. Si nota come sul filtro si raccoglie una massa colloidale costituita prevalentemente dal sale decaidrato, da altri solidi fini e piccole quantità di olio.



Al termine dei pretrattamenti l'olio è caratterizzato nella sua composizione in termini di quantità e tipologia dei diversi gliceridi, soprattutto per i campioni di olio di frittura esausto. Per quanto riguarda il FRIOL ci si aspetta che le caratteristiche di questo olio rimangano invariate; tuttavia se ne ripete periodicamente la caratterizzazione in HPLC. Nel paragrafo successivo sarà illustrata la modalità di analisi insieme con la lettura del cromatogramma, da questo l'ottenimento dei dati sperimentali e la loro successiva rielaborazione.

### **3.2.2A Reazione di transesterificazione**

La conduzione delle reazioni di transesterificazione è uguale in ciascuna delle prove considerate, pur variando in alcune le condizioni operative quali il tipo di olio, il rapporto molare di alimentazione e la quantità di catalizzatore utilizzato. Questa fase sperimentale è articolata in due momenti:

- preparazione dei campioni
- esecuzione delle prove

#### *1. Preparazione dei campioni*

Per garantire una completa miscelazione del sistema reagente e un corretto funzionamento dell'impianto e degli strumenti di misura (termocoppie e sonde per prelievo dei campioni) immersi nella fase liquida, si è valutata che la quantità minima di olio da caricare per un reattore da 500 ml fosse pari a circa 75 g. I trigliceridi costituiscono il 97% della matrice oleosa nel caso di olio fresco, mentre per gli oli esausti sarà valutata per ogni caso mediante analisi in cromatografia liquida. Attraverso dei calcoli matematici e passaggi stechiometrici si calcola la quantità di metanolo - reagente in eccesso in rapporto 6:1 o 9:1, mentre quello stechiometrico è 3:1 - e successivamente per ciascuna prova la quantità di catalizzatore (1,5% o 2% w/w rispetto alla quantità di olio considerata).

L'olio, pretrattato e pesato, è posto direttamente nel reattore e qui riscaldato fino alla temperatura di esercizio di 55°C, tramite l'impiego di un bagno ad acqua, adagiato su una piastra riscaldante ed agitante. In questo modo si mantiene costante la temperatura e si regola la velocità di agitazione, impostata a circa 3000 rpm e fisicamente realizzata tramite un magnetino. Nel frattempo si scioglie l'idrossido di potassio nel metanolo, nelle quantità previste dalla singola prova.

## 2. Esecuzione delle prove

L'impianto, progettato e realizzato in laboratorio, è schematizzato in figura 3A.1: il reattore è costituito da un pallone a tre colli dalla capacità di 500 o 1000 ml, all'interno del quale all'olio, riscaldato e mantenuto a temperatura costante, è aggiunta la miscela di alcol e KOH, a temperatura ambiente. Ciò costituisce l'istante iniziale della metanolisi, in cui si verifica un abbassamento della temperatura di esercizio di qualche grado e l'evaporazione di parte del metanolo. Come precedentemente detto, l'agitazione del sistema, realizzata con un magnetino, è impostata a 3000 rpm; a questo valore si osserva una buona miscelazione tra le due fasi liquide alimentate e l'assenza di vortici e turbolenze nelle diverse condizioni operative implementate.

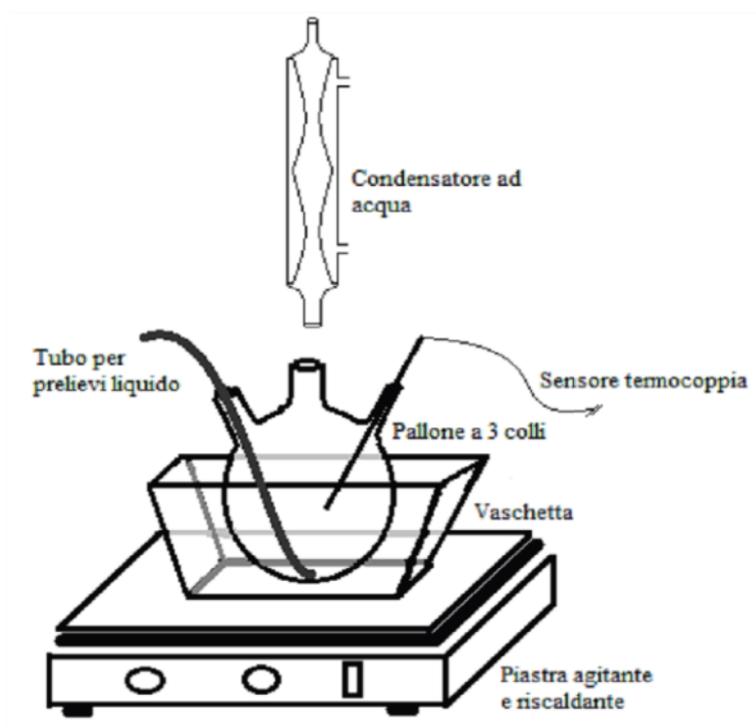


figura 3A.1: Schema semplificato dell'impianto di reazione

Lo schema di reazione prevede che il pallone sia provvisto di tre colli: uno è adibito al controllo della temperatura interna grazie ad una termocoppia (si sigilla l'ingresso utilizzando un tappo di gomma forato e a tenuta); un altro - quello centrale - è destinato alla connessione con un refrigerante a tre o sei bolle per garantire la condensazione del

metanolo e la sua successiva ricaduta nell'ambiente di reazione; il terzo collo è destinato sia all'ingresso dei reagenti che al prelievo dei campioni intermedi di reazione. Quest'ultimo collo, dopo l'alimentazione dei reagenti e del catalizzatore, è immediatamente sigillato con un tappo a tenuta, evitando la fuoriuscita dell'alcol, composto altamente volatile. Nel tappo è inserito un sistema artigianale di tubo-siringa, per garantire il prelievo dei campioni intermedi senza fermare la reazione. In cima al condensatore è posizionato un palloncino in gomma, con lo scopo di evitare l'allontanamento dell'alcol e la sua conseguente dispersione nei luoghi di lavoro. Questo, gonfiandosi, funge da dispositivo di sicurezza e di tenuta del metanolo, che ritorna prima nel condensatore e poi nel reattore. In figura 3A.2 è mostrato l'impianto di reazione per le prove di transesterificazione in catalisi basica:

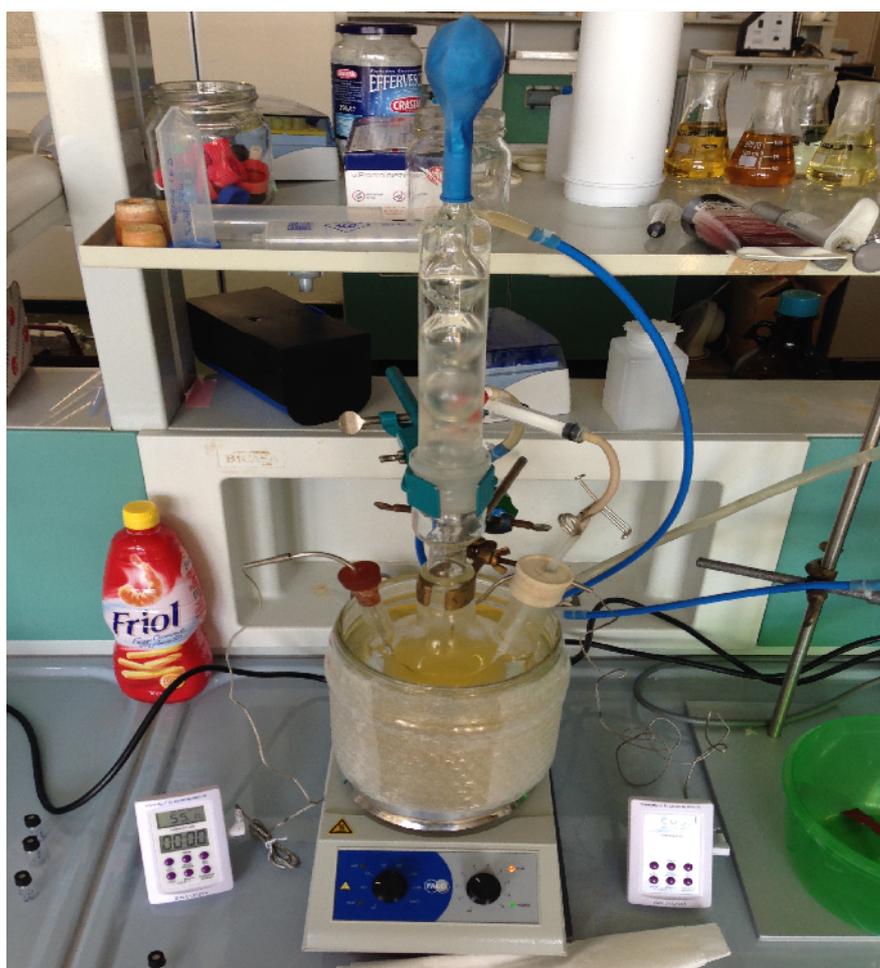


figura 3A.2: Fotografia dell'impianto di reazione utilizzato per tutte le prove

I prelievi intermedi dei campioni, da 200 µl, sono stabiliti a tempi prefissati: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 45, 90 minuti dall'avvio della reazione; ad ogni prelievo si controlla la temperatura, mantenendola costante a 55°C, tramite la piastra. I campioni prelevati sono posti in freezer prima di essere analizzati. La tempistica del prelievo è fondamentale soprattutto nei primi minuti di reazione, dal momento che, come si è già detto, la reazione avviene principalmente in questo periodo.

Tutte le prove sperimentali e l'analisi di ogni campione in ciascuna prova sono state condotte in doppio.

### **3.2.3A Post-trattamenti**

La fase di purificazione della miscela esterea, ottenuta dopo 90 minuti di reazione, prevede due momenti: la separazione del glicerolo e la purificazione del biodiesel grezzo. L'allontanamento del glicerolo, ed eventualmente anche di acqua, catalizzatore, metanolo e gliceridi non convertiti, è realizzata mediante sedimentazione della fase a maggiore densità - il glicerolo appunto - in imbuto separatore dalla capacità di 1 litro, come mostrato in figura 3A.3, per un tempo variabile da 30 minuti a 24 ore, a seconda della prova considerata. Si recupera così una miscela di esteri metilici con tracce di metanolo e altre impurezze, la cui purificazione è effettuata mediante distillazione sottovuoto, nel successivo *step* in evaporatore rotante (figura 3A.4 ). Per entrambi gli stadi presentati si varia la durata del trattamento; per quanto riguarda la sedimentazione in imbuto separatore è stato osservato che nel giro di qualche minuto si riesce ad ottenere una netta stratificazione tra la fase esterea e quella del glicerolo, ma una più efficace purificazione del biodiesel si è ottenuta per tempi di sedimentazione più lunghi.



figura 3A.3: Fotografia del processo di separazione per stratificazione del glicerolo (sul fondo) dagli esteri (miscela liquida di colore giallo, surnatante)

In particolar modo in alcune prove è stato misurato il tempo in cui si raggiunge la stratificazione tra le due fasi, tenendo conto anche della variazione di livello della fase sottostante, e si è osservato che in circa 6/7 minuti si raggiungeva il massimo valore di altezza relativo alla fase sottostante composta prevalentemente da glicerolo. In relazione a tale risultato è stato deciso di considerare un tempo di riposo minimo in imbuto separatore di circa 30 minuti, durata in cui si dovrebbe realizzare la sedimentazione delle più fini particelle di glicerolo. Questo tempo permette di raggiungere una netta stratificazione, ma da letteratura (Knothe et al., 2015) si evince che tempi più lunghi, di circa 24 ore di riposo, portano ad una migliore separazione delle due fasi. Per quanto riguarda la purificazione mediante distillazione sottovuoto si valutano le condizioni operative in evaporatore rotante: temperatura del bagno, pressione di distillazione, velocità di agitazione e tempo di permanenza della miscela di FAMES. Pertanto, si

imposta a 80°C la temperatura del bagno, 350 mbar è la pressione realizzata all'interno del distillatore, 60 rpm è la velocità di agitazione del pallone rotante; la durata del trattamento, variabile da 20 a 40 minuti, sarà valutata nelle singole prove. Queste condizioni operative sono state scelte per assicurare la separazione di metanolo soprattutto, essendo il composto più basso bollente, ma anche di acqua dal biodiesel grezzo.



*figura 3A.4: Fotografia del processo di purificazione del biodiesel da acqua e metanolo in Rotavapor*

Il biodiesel purificato è sottoposto ad analisi cromatografiche in fase liquida e gassosa (queste ultime condotte in triplo); da quest'ultima in particolare, oltre a reperire importanti informazioni sulla miscela di FAMES dalla lettura del cromatogramma, si valuta la resa in esteri di tutto il processo.

Per le prove **Racc** si è predisposto l'invio dei campioni, in quantità pari ad almeno 1 litro di biodiesel ottenuto da ciascuna delle 5 raccolte, al laboratorio certificato esterno RECORD, presso l'Università di Firenze. In questo modo saranno misurati tutti i parametri previsti dalla normativa europea di riferimento UNI EN 14214 e confrontati rispetto ai limiti vigenti.

### 3.3A: Modalità di analisi

Per ogni prova sono stati prelevati dei campioni intermedi durante la reazione e analizzati in cromatografia liquida (HPLC), e campioni al termine del processo, cioè sul biodiesel purificato, e sottoposti ad analisi in gas cromatografo (GC).

#### 3.3.1A Analisi in HPLC

In figura 3A.5 si presenta lo strumento di analisi in cromatografia liquida (HPLC):



figura 3A.5: Fotografia della strumentazione utilizzata, HPLC

Questo strumento si avvale della tecnica di cromatografia ad assorbimento su colonna. Si è sviluppato un metodo di analisi in HPLC a partire dalla preparazione del campione da iniettare all'interno dell'apparecchiatura. In particolare ad una parte del campione prelevato, circa 60 µl, viene aggiunto un solvente, acetone, in rapporto volumetrico 12,5:1 rispetto alla quantità di campione. Tale quantità è stata stimata dopo una serie di prove preliminari. L'iniezione di circa 30 µl di campione così diluito avviene manualmente, attraverso un'apposita siringa. Si prevede che lo strumento effettui uno *split* di 20 µl di campione prima dell'analisi. Il restante campione iniettato entra in contatto con la fase stazionaria nella colonna. Di particolare importanza è la scelta del solvente (o miscela di solventi), capace di eluire e distanziare le diverse sostanze nel tempo previsto; infatti dalle sue proprietà dipende fortemente il tempo di analisi. Il solvente deve presentare alcune caratteristiche: non essere reattivo con l'adsorbente; essere economico; avere un basso punto di ebollizione e una bassa viscosità; essere poco tossico e difficilmente infiammabile. La fase mobile utilizzata per le analisi di queste prove è una miscela di acetone/acetonitrile in rapporto volumetrico 70/30 rispettivamente, tale da garantire una buona risoluzione dai monogliceridi ai trigliceridi, con un tempo di analisi di 35 minuti.

Le condizioni di analisi sono così riassunte:

- un flusso della fase mobile impostato ad una portata di 1 ml/min;
- splittaggio del campione iniettato di 20 µl;
- tempo di analisi pari a 35 minuti.

All'uscita della colonna un rilevatore ad indice di rifrazione, di opportune caratteristiche e proprietà, invia i segnali ad un computer, il quale si dedica alla loro acquisizione ed elaborazione. I segnali del rilevatore sono registrati in modo continuo da un computer che acquisisce i dati attraverso una scheda seriale collegata all'HPLC e li registra in files. La gestione di queste operazioni è affidata al software Borwin 1.20, con il quale è possibile visualizzare e rielaborare successivamente i cromatogrammi risultanti.

Il campione da analizzare è costituito da esteri, glicerolo, trigliceridi, digliceridi, monogliceridi e metanolo, oltre che dal solvente. In base alle caratteristiche della

colonna adoperata si nota che questo sistema non è in grado di rilevare i composti diversi dalla “fase lipidica”, cioè l’alcol e il glicerolo. Per cui i dati ottenuti da ogni cromatogramma non contengono informazioni relative alla presenza di questi due composti. Per le diverse sostanze sono stati considerati i valori dei tempi di rilevamento caratteristici in HPLC da analisi preliminari condotte su degli standard principalmente di esteri (etil palmitato, etil oleato, etil linoleato) e trigliceridi (tripalmitato e trioleato), singolarmente o insieme. Questi dati sono poi stati confrontati con quelli ricavati precedentemente in analoghe condizioni di analisi (Catalano, 2004; Albo, 2013), relativi ai rispettivi gliceridi semplici (monoleina, dioleina, trioleina), trovando una corrispondenza nei diversi tipi di composti. Ad esempio, in figura 3A.6 sono riportati e confrontati i cromatogrammi relativi agli standard di monogliceride, estere e trigliceride dell’etil oleato:

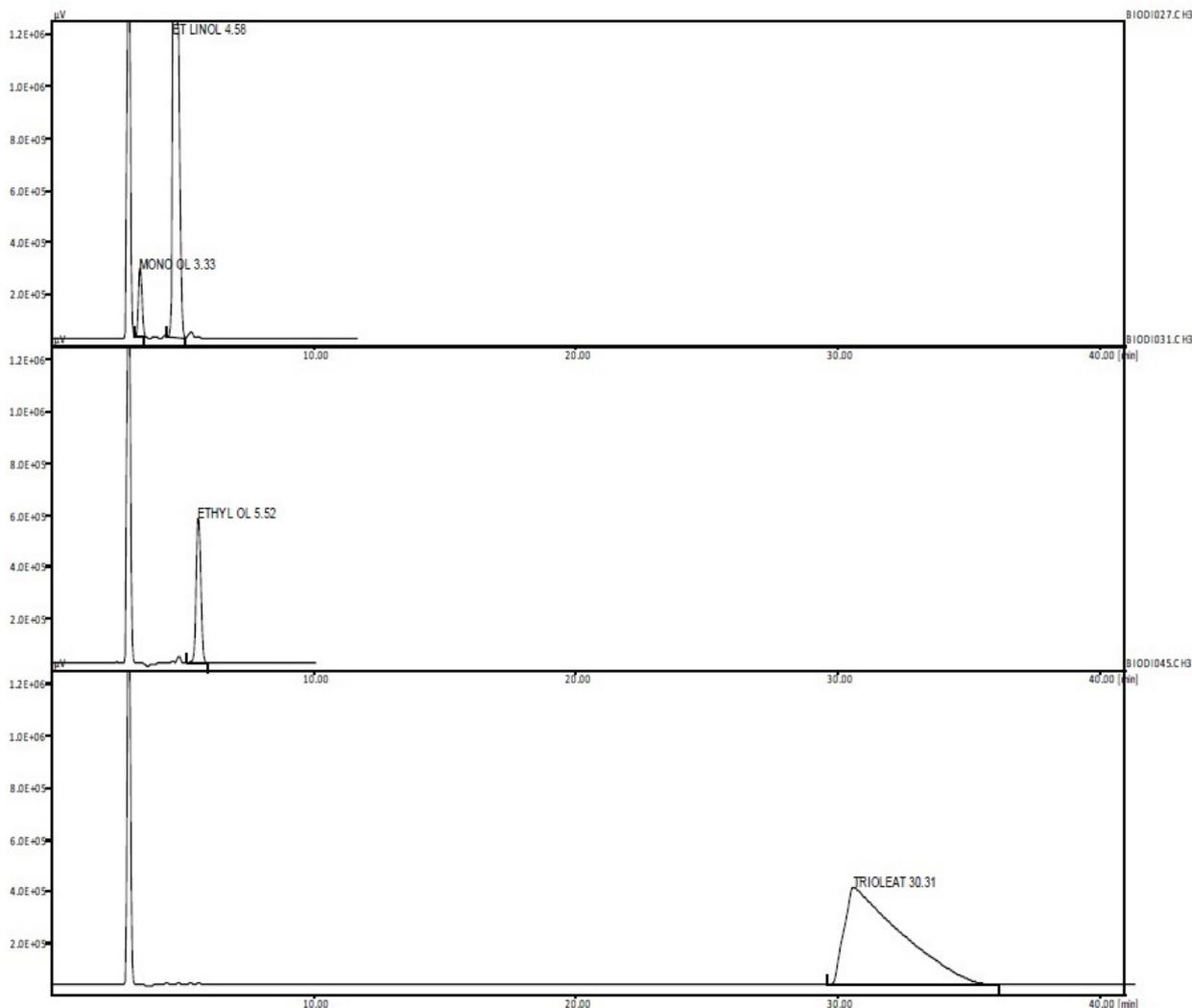


figura 3A.6: Sovrapposizione di tre cromatogrammi relativi rispettivamente agli standard momo-oleato e etil linoleato, etil oleato e gliceril tri-oleato

Riassumendo le informazioni sui tempi di ritenzione delle sostanze principali finora considerate, si può stilare la seguente tabella:

<i>Sostanza</i>	<i>Tempo (min)</i>
<i>Monoleina</i>	4,0
<i>Etil linoleato</i>	4,4
<i>Etil oleato</i>	5,1
<i>Etil palmitato</i>	5,3
<i>Diolenina</i>	8,1
<i>Gliceril trioleato</i>	16,4
<i>Triolenina</i>	28,1

tabella 3A.1: *Tempi di ritenzione delle sostanze standard misurate in HPLC*

Dalla tabella 3A.1 si evince che l'ordine di uscita dei composti è così individuato: monogliceridi, esteri, digliceridi e infine trigliceridi. Considerando i diversi tipi di esteri, si vede che l'etil palmitato (C16:0) ha un tempo di ritenzione maggiore rispetto ai C18. Inoltre, per gli esteri a 18 atomi di carbonio, come l'etil oleato (C18:1) e linoleato (C18:2), il tempo di ritenzione è più basso se maggiore è il grado di insaturazione. Per i trigliceridi si ottiene un ampio range per i tempi di ritenzione, perciò questi saranno valutati in riferimento ai campioni considerati.

Pertanto, si riportano di seguito i cromatogrammi relativi ad un campione di olio FRIOL e uno di olio di frittura esausto fornito durante i mesi di raccolta :

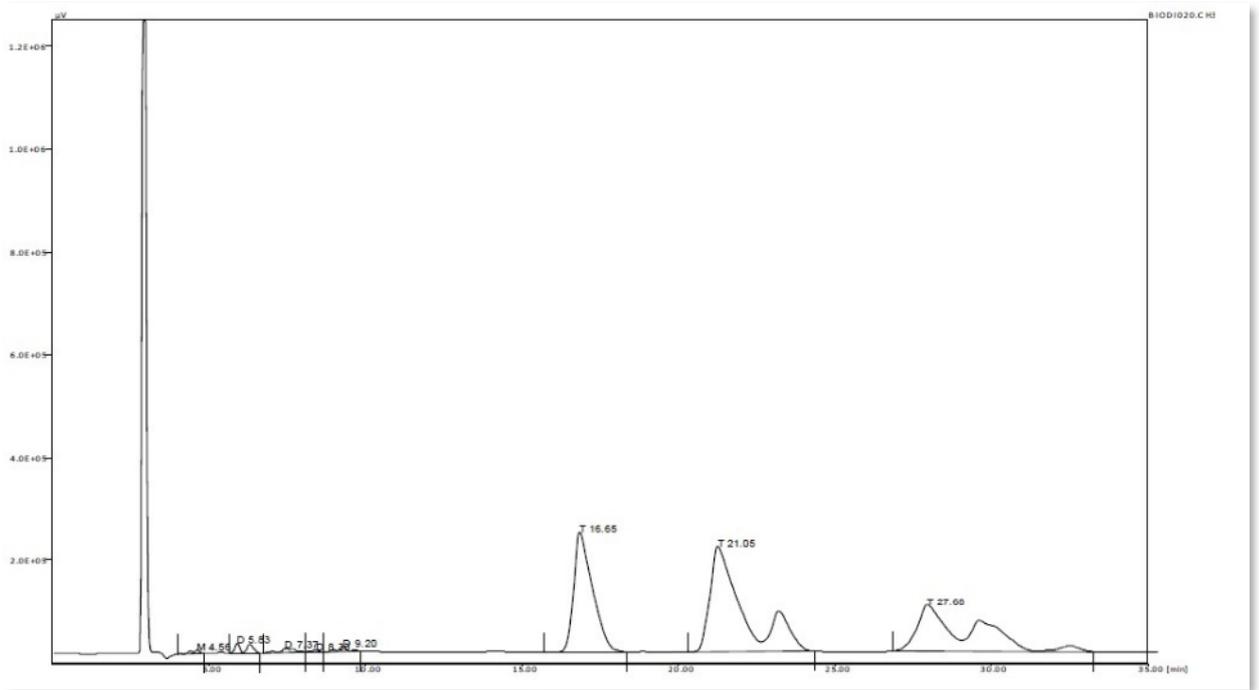


figura 3A.7: Cromatogramma relativo ad un campione di olio fresco Friol

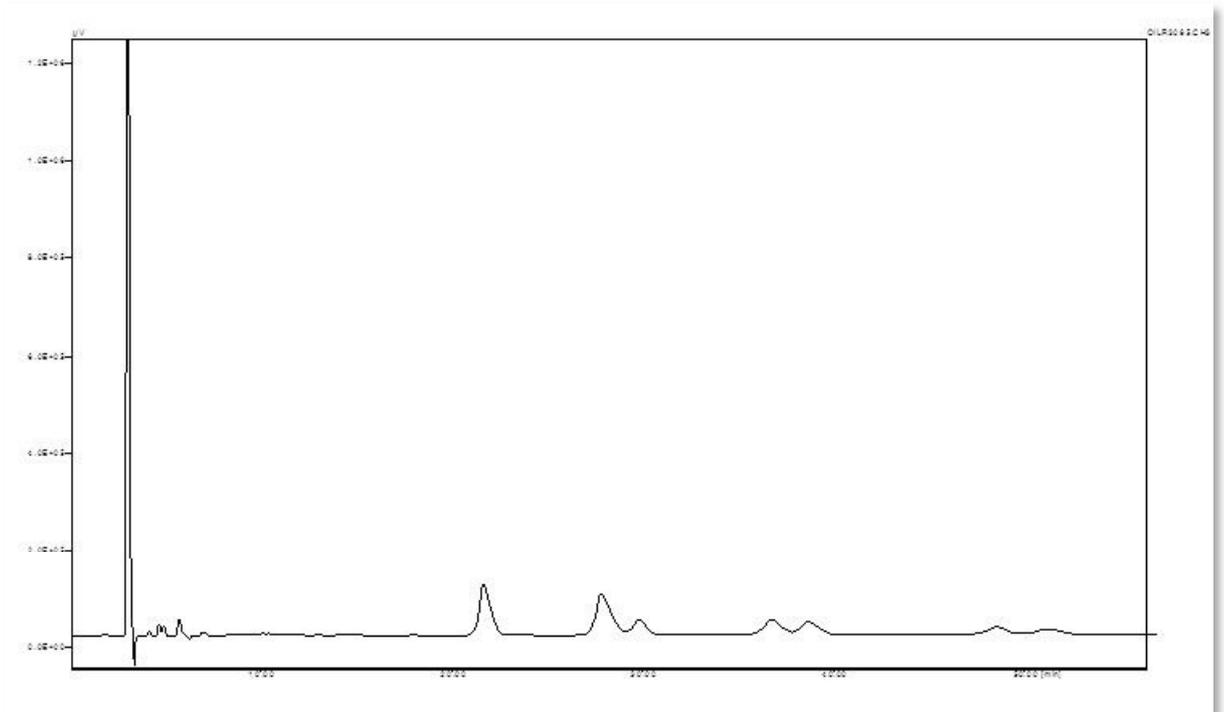


figura 3A.8: Cromatogramma relativo ad un campione di WCO da raccolta 3

Dai cromatogrammi nelle figure 3A.7 e 3A.8 si osserva che è mantenuta rispetto a quanto riportato in tabella 3A.1, una corrispondenza nell'ordine di uscita dei composti rilevati e nei valori dei tempi.

Dall'analisi degli standard e il conseguente confronto con i campioni intermedi di miscela prodotta, oltre che con i tempi di eluizione riportati in tabella 3A.1, si sono individuate nove famiglie di picchi caratteristici, di cui: la prima riconducibile ai monogliceridi, le due successive agli esteri e altre due ai digliceridi, e le restanti quattro ai trigliceridi. Si osserva che i picchi dei trigliceridi sono distanziati tra di loro di diversi minuti; questo conferma la presenza di trigliceridi misti nel campione di olio di partenza; gli altri composti presentano valori molto vicini nei tempi di eluizione, in particolare per gli esteri le curve del C18:1 e C16:0 risultano parzialmente sovrapposte.

In entrambi i casi delle figure 3A.7 e 3A.8 l'olio, fresco o esausto pretrattato, mostra una elevata quantità di trigliceridi (97% circa è il valore riscontrato da tutte le analisi di un campione di FRIOL) e restanti quantità di digliceridi e monogliceridi (questi ultimi si riscontrano nel caso di oli esausti soprattutto).

Per valutare le quantità in peso dei composti della "fase organica" o "lipidica" si ricorre al metodo della normalizzazione, individuando quelle miscele di composti che abbiano le intensità dei picchi nello stesso range. Questo metodo non ha bisogno di curve di calibrazione e perciò risulta semplice da applicare. L'area sottesa ad ogni picco è rapportata all'area totale dei picchi da analizzare; questa percentuale in massa dell'iesimo composto è la misura della sua quantità relativa nella miscela ed è, appunto, indicata in termini di "% w/w". Si individua l'area sottesa da ciascun picco e si integra. I dati ottenuti possono essere così successivamente rielaborati.

### 3.3.2A Analisi in GC

Il gas cromatografo utilizzato è mostrato in figura 3A.9:

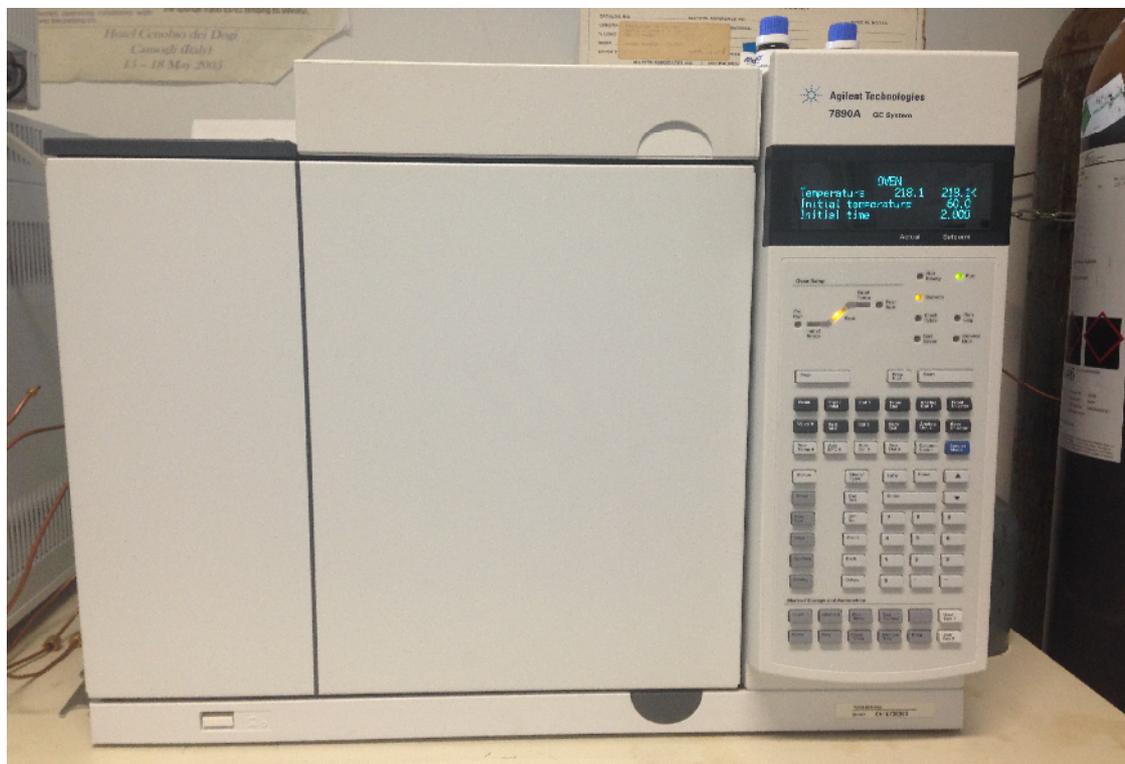


figura 3A.9: Fotografia del Gas Cromatografo

La cromatografia in fase gassosa si basa sui meccanismi di adsorbimento e ripartizione. Per quanto riguarda l'adsorbimento, le molecole del campione analizzato sono adsorbite su un materiale solido, i cui siti attivi sono in grado di legare chimicamente o fisicamente queste molecole. Per la ripartizione, invece, si sfrutta la diversa solubilità tra le molecole adsorbite e l'eluente mobile. La fase stazionaria è generalmente costituita da un liquido o un solido disposto come strato di finissimo spessore che ricopre la superficie interna, generalmente, di una colonna impaccata lunga più di 10/20 metri; tale fase stazionaria varia in base alla diversità delle sostanze da analizzare. La fase mobile è invece un gas inerte, detto *carrier*, a bassa viscosità e alta purezza: generalmente vengono usati He o N<sub>2</sub>.

Fisicamente il campione, iniettato in testa alla colonna e sottoposto al flusso costante del *carrier*, viene separato nelle sue componenti in funzione di quanto queste siano affini (di solito per polarità) alla fase stazionaria; un'ulteriore variabile su cui si agisce spesso per migliorare la separazione è la temperatura della colonna, che può essere tenuta costante o fatta variare secondo un gradiente desiderato. Dopo aver percorso la colonna, il campione è eluito e raccolto da un rilevatore. Il segnale del rilevatore è rappresentato in funzione del tempo, per un range che va dal tempo zero, quando il campione è immesso all'interno dell'apparecchiatura, fino alla sua eluizione al tempo finale di analisi fissato. In queste condizioni si ottiene un cromatogramma, costituito da una sequenza di picchi di varia ampiezza e altezza. Ciascun picco identifica uno specifico composto: ha un'area e un'altezza, da cui è valutato un valore medio del tempo di ritenzione di ogni composto, ovvero il tempo che trascorre dal momento in cui si inietta il campione al momento in cui una sostanza viene rilevata e mostrata all'utente sottoforma di picco nel cromatogramma. Perciò, tale analisi, attraverso la lettura del cromatogramma, fornisce preziose informazioni: il tipo di composto, il suo tempo di ritenzione e la quantità.

E' fondamentale stabilire un iter di preparazione del campione, in relazione al metodo di analisi implementato. Il campione, generalmente introdotto in colonna in quantità dell'ordine di pochi microgrammi tramite un'apposita siringa, è stato precedentemente disciolto in un opportuno solvente, insieme con una sostanza di riferimento. L'introduzione del campione può avvenire direttamente in testa alla colonna o può essere "depositato" in un iniettore; qui è vaporizzato ed eventualmente ripartito in modo che una sola parte di esso vada nella colonna analitica, mentre la restante parte è eliminata dalla linea dello *split*. L'iniettore, assente in caso di analisi "on column", insieme alla colonna ed al rilevatore completa la struttura del gas cromatografo, il quale è costituito esternamente da una scatola chiusa e termicamente stabilizzata, ma al suo interno trova alloggio un inserto di vetro e un blocco riscaldante. E' necessario che il campione durante l'analisi sia allo stato gassoso e in condizioni omogenee; l'iniettore serve a garantire queste condizioni.

Per quanto riguarda la tipologia di iniezioni, ne esistono due tipi: *split* e *splitless*. La modalità *split* è solitamente adoperata quando il campione, a causa della sua alta concentrazione, potrebbe saturare la risposta del rilevatore e, uscendo fuori scala, falsare

il risultato dell'analisi. Lo *split*, perciò, diluisce il campione nel gas di trasporto, liberandone una parte (programmabile) all'esterno mediante uno sfiatatoio e, dopo un certo periodo di tempo (misurato per via empirica), lo immette in colonna. L'iniezione in modalità *splitless*, invece, invia direttamente in colonna tutto il campione e in tal caso il solvente dovrebbe essere sempre il primo ad arrivare al rilevatore e presentarsi nel cromatogramma come un picco visibile e dalle caratteristiche facilmente individuabili.

All'interno del gas cromatografo è alloggiata la colonna. In generale, le colonne si dividono in due classi: impaccate e capillari (figura 3A.10).

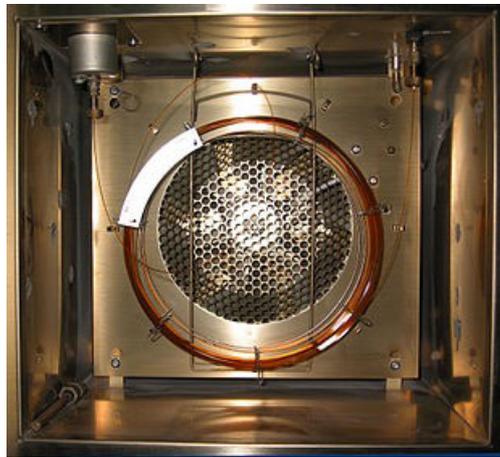


figura 3A.10: Fotografia del particolare interno del GC: colonna capillare utilizzata

Le colonne impaccate sono simili a quelle impiegate nelle tradizionali tecniche di cromatografia su colonna: sono costituite da tubi di teflon, acciaio o vetro borosilicato disattivato, di diametro dell'ordine del centimetro e con una lunghezza che può variare dal metro fino a dieci metri. Possono presentarsi piegate a spirale o a U, e riempite con una fase stazionaria costituita da un solido, come gel di silice, di supporto ed un liquido non volatile, come lo squalene o la trietanolammina. Le colonne capillari sono invece sottilissimi tubi di silice fusa di diametro generalmente non superiore ai 0,53 mm e di lunghezza non inferiore ai 10 metri (arrivano anche fino a 150 - 200 metri), avvolte a spirale su un supporto metallico. La fase stazionaria è spalmata in maniera uniforme sulla superficie interna della colonna, dove forma un film di spessore costante che, a seconda della capacità di carico della colonna, varia tra 0,5 e 2,5  $\mu\text{m}$ . Il film è spesso

costituito da metil-silossani modificati su cui sono inseriti vari gruppi funzionali, in funzione perciò della classe dei composti da analizzare.

I rilevatori possono essere suddivisi in due classi: distruttivi (FID) e non distruttivi (ECD, TCD). I rilevatori non distruttivi permettono alle molecole del campione di poter essere analizzate successivamente con altre tecniche ed apparecchiature.

Il rilevatore utilizzato in queste analisi è un FID, ovvero un *flame ionization detector*, in cui il gas di trasporto in uscita dalla colonna viene mescolato a idrogeno e ossigeno (o aria). Nella fiamma, quando una sostanza è eluita, i vapori combustibili vengono caricati elettricamente producendo ioni, che sono poi raccolti sulla superficie del rilevatore, e una corrente elettrica che, amplificata, rappresenta il segnale del rilevatore. Nonostante il suo essere cieco a tutte le sostanze che non bruciano (ad esempio l'acqua), il FID è uno dei rilevatori più diffusi, perché molto robusto (il suo limite di rilevabilità resta basso anche dopo molte ore di lavoro).

Le analisi effettuate al termine del processo su campioni purificati di FAMES fanno riferimento alle direttive presentate dalla norma UNI EN 14214. In base a questa si è quindi implementato un metodo di analisi, considerato il tipo di GC presente in laboratorio. Nella norma appena citata si prende in esame il metodo specifico per l'individuazione qualitativa e quantitativa dei diversi esteri presenti in miscela, riportata nella UNI EN 14103. In particolare, essa impone di implementare un metodo nella memoria programmabile del gas cromatografo, basato su livelli di temperatura e tempi operativi stabiliti. Inoltre le apparecchiature con cui lo strumento è equipaggiato devono rispettare tali vincoli. Perciò, dopo aver valutato le caratteristiche della strumentazione e considerato le direttive della normativa, attraverso una serie di prove di analisi preliminari si è giunti all'implementazione di un metodo specifico. Questo tiene conto di ogni fase nella procedura di analisi, dalla preparazione del campione fino alla rielaborazione dei dati ricavati dal cromatogramma. Per quanto riguarda la preparazione del campione, si impiega uno standard interno come il C19, in rapporto massico 1:1 con il campione di prodotto da analizzare. Standard e campione sono solubilizzati in un solvente inerte, come l'isooctano, l'esano o il decano. Un microlitro di questa soluzione è poi iniettato nel gas cromatografo, in modalità *splitless*. Per quanto riguarda il solvente, si rende necessario effettuare un'analisi preliminare su un campione per

verificare se eventuali tracce di impurezze possano essere rilevate dalla colonna e successivamente essere annoverate come esteri, falsando così la misura.

La funzione dello standard interno - si tratta di un estere non presente nella miscela di FAMES ottenuta per metanolisi degli oli - è di fondamentale importanza per la valutazione quantitativa della miscela esterea prodotta: dalla quantità di C19 e di campione di biodiesel introdotti si ricava, attraverso rielaborazione dei dati del cromatogramma, la quantità degli esteri ottenuti dal processo.

La temperatura del forno è impostata a 280°C e la durata di ciascuna analisi è di 35 minuti. Nelle figure 3A.11 e 3A.12 sono riportati i cromatogrammi relativi a miscele di FAMES, ottenuti dalla transesterificazione di olio fresco FRIOL e un campione di olio esausto Recoil rispettivamente:

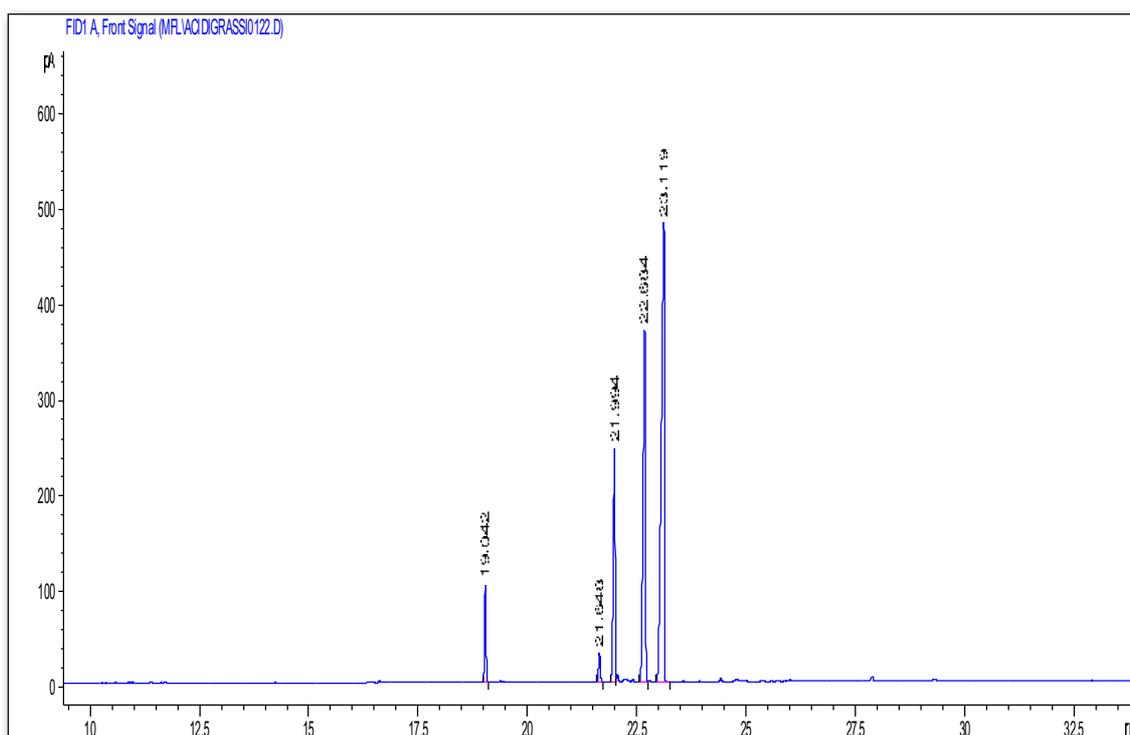


figura 3A.11: Cromatogramma di un campione di esteri ottenuti partendo da olio fresco Friol

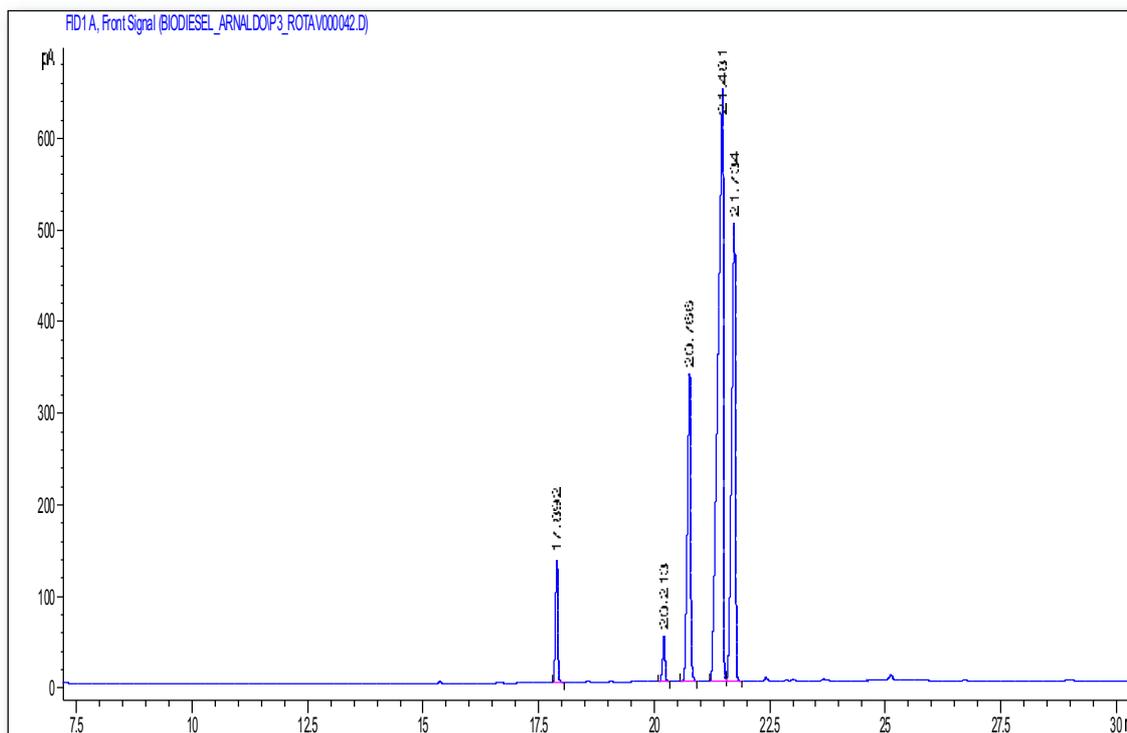


fig 3A.12: Cromatogramma di un campione di esteri ottenuti partendo da WCO2

Lo studio del cromatogramma restituito dal software e il confronto con i dati dei tempi di ritenzione, oltre che dell'ordine di uscita dei diversi composti, forniti dal metodo di riferimento, consente di ottenere importanti informazioni. Gli esteri con peso molecolare inferiore hanno tempi di ritenzione inferiori; a parità di peso molecolare, maggiore è il grado di insaturazione, più alto è il tempo di ritenzione. Per ogni prova è stato identificato ciascun picco e il suo tempo di ritenzione, e verificato tempo e posizione del picco relativo allo standard interno. Inoltre, per la corretta identificazione di ciascun estere si è fatto riferimento al cromatogramma di un campione di olio d'oliva esterificato, ottenuto nelle prove preliminari e da riferimenti bibliografici (fig. 3A.13). Questo cromatogramma presenta un'ampia tipologia di esteri, da cui oltre che i tempi, se ne considera l'ordine di uscita e la forma di ciascun picco.

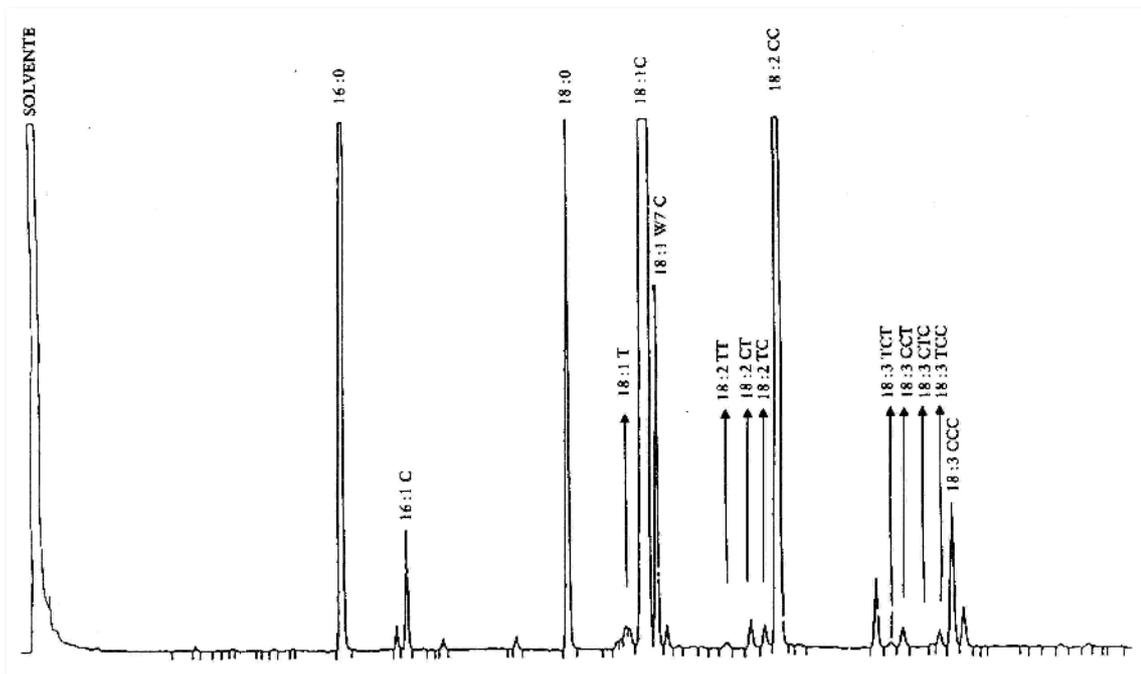


figura 3A.13: Cromatogramma di un campione di olio d'oliva esterificato

Alla luce di queste considerazioni nei cromatogrammi delle figure 3A.11 e 3A.12 si è effettuato uno zoom sui picchi relativi agli esteri, escludendo il primo picco del solvente. In queste analisi, così come in tutte le altre, il solvente è il primo composto ad eluire in quantità molto più grandi rispetto a tutti gli esteri che saranno rilevati.

Nello specifico si è riscontrato che per un tempo di ritenzione pari a circa 22,3 minuti si ritrova il picco riguardante lo standard interno, il quale ha un'area sottesa alla curva, e quindi, una quantità relativa maggiore di ciascun estere presente nel campione considerato. Ciò era prevedibile, se si considera la modalità di preparazione del campione. Si tengono in conto tutte le informazioni acquisite finora e il metodo di analisi, riportandole su un cromatogramma "rielaborato" di più facile lettura (figura 3A. 14):

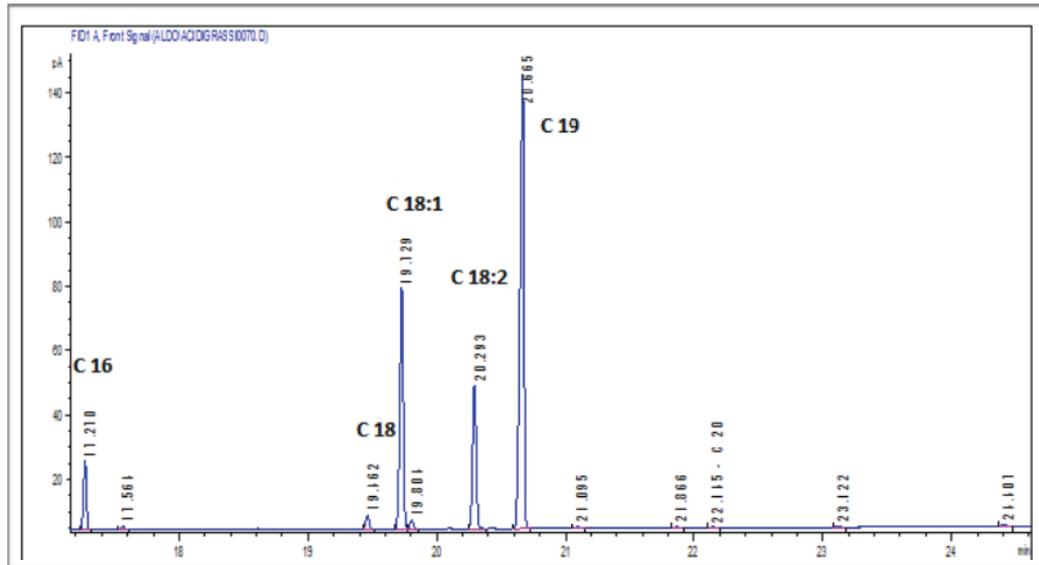


figura 3A.14: Cromatogramma di un campione di esteri ottenuti da WCO5

Associato ad ogni picco il suo estere e valutata per integrazione manualmente l'area sottesa ad ogni curva, si ottengono le quantità relative dei singoli esteri e dello standard interno. Da questi dati e dalle quantità di peso del campione e standard interno preparati, applicando una proporzione, si può risalire alla quantità degli esteri nel campione analizzato. Per cui si può calcolare la resa in esteri, data dal rapporto tra la quantità di esteri prodotti nel processo rispetto alla quantità di campione di biodiesel analizzato, secondo l'equazione 3A.1:

$$C_{est} = \frac{\sum A - A_{EI}}{A_{EI}} \cdot \frac{W_{EI}}{W} \cdot 100$$

equazione 3A.1

in cui  $C_{est}$  rappresenta la concentrazione di esteri nel campione di biodiesel analizzato come percentuale ponderale [%w/w];  $A_{EI}$  è l'area sottesa al picco dello standard, caricato in quantità nota pari a  $W_{EI}$ ; il campione di massa  $W$  sottoposto ad analisi ha un'area totale data dalla sommatoria delle aree di tutti i picchi, C19 compreso. Questo parametro è fondamentale sia nella definizione e valutazione della qualità del biocarburante prodotto, che nella stima della performance della transesterificazione e del processo nella globalità delle sue fasi produttive.



## *Parte IA: Transesterificazione basica di oli esausti per produzione di biodiesel*

### **Capitolo 4A: Risultati**

In questo capitolo sono illustrati e commentati i dati ottenuti e i risultati elaborati dalle prove sperimentali, le cui modalità sono state spiegate e descritte nel capitolo 3A. In primo luogo si riportano le specifiche degli oli freschi ed esausti, soprattutto in termini della loro composizione iniziale nei diversi gliceridi. Successivamente è mostrato l'andamento e la performance delle reazioni nelle diverse condizioni operative adoperate. La resa finale della transesterificazione in catalisi basica, insieme con le fasi di pretrattamento degli oli esausti e post-trattamento del biodiesel grezzo, è valutata per tutte le prove; nell'ultima sezione si concentra l'attenzione sulla bontà di tutto il processo, esaminando anche diverse condizioni operative per i pre- e post-trattamenti, su specifici campioni di olio esausto.

#### **4.1A Specifiche degli oli**

Come si è già discusso nei precedenti capitoli, si intende finalizzare il trattamento degli oli esausti raccolti alla produzione di biodiesel secondo le normative europee imposte. Si è optato per un processo costituito principalmente da tre fasi: pretrattamento degli oli

esausti, transesterificazione basica degli oli in FAMES, post-trattamento del biodiesel grezzo prodotto. Per poter esaminare gli aspetti relativi alla reazione e, quindi, ai trattamenti a valle di questa, si è pianificato di condurre inizialmente delle prove su olio fresco commerciale FRIOL - olio di frittura vegetale, costituito principalmente da olio di girasole - variando alcune condizioni operative e poi proseguire con le prove sugli oli esausti. In particolare, nella tabella 4A.1 si riporta l'elenco dei diversi campioni di olio utilizzato e le informazioni relative alla sua composizione iniziale. Per l'olio fresco FRIOL si considera un campione tal quale, mentre per i WCOs si analizzano solo campioni a valle dei pretrattamenti. Per tale motivo l'olio esausto da raccolta 5, sottoposto solo a filtrazione dei residui grossolani ma non a tutti i pretrattamenti previsti, non è stato analizzato.

<i>tipo di olio</i>	<i>monogliceridi [%w/w]</i>	<i>digliceridi [%w/w]</i>	<i>trigliceridi [%w/w]</i>
Friol	0,36	2,00	97,64
WCO da raccolta 1	1,57	4,41	94,02
WCO da raccolta 2	0,56	4,78	94,67
WCO da raccolta 3, lotto 1	1,25	0,98	97,77
WCO da raccolta 3, lotto 2	5,12	5,83	89,05
WCO da raccolta 3, lotto 3	0,47	3,78	95,75
WCO da raccolta 3, lotto 4	2,70	4,29	93,01
WCO da raccolta 3 (miscela dei lotti 1-2-3-4)	4,71	3,43	91,86
WCO da raccolta 4, lotto 1	0,57	4,72	94,71
WCO da raccolta 4 (miscela di lotti 1-2)	2,70	4,29	93,01
WCO da raccolta 5	NA	NA	NA

tabella 4A.1: *Composizione dei diversi campioni di olio*

Per le raccolte 1 - 2 - 5 l'olio esausto è stato fornito in un'unica soluzione, mentre nell'ambito delle raccolte 3 e 4 sono stati consegnati lotti di WCO in più momenti; per

cui si è proceduto sia con l'impiego dei singoli lotti in alcune prove che con l'olio ottenuto come miscela di tutti i lotti nell'ambito della stessa raccolta in altre prove (WCO da raccolta 3 e WCO da raccolta 4).

L'olio fresco FRIOL presenta una composizione iniziale costante nei diversi gliceridi. L'analisi in cromatografia liquida di un campione di tale olio, così come quella dei diversi campioni di WCO, è stata ripetuta in diversi momenti nell'arco di tutto il progetto e conferma il risultato qui presentato. La scelta di tale olio non è casuale: esso rappresenta un olio vegetale fresco destinato alla frittura, facilmente reperibile e con caratteristiche note e costanti; ciò lo rende un buon termine di paragone per i campioni di olio esausto che saranno analizzati e impiegati nel processo. Per quanto riguarda gli oli esausti, sono stati realizzati 5 momenti diversi di raccolta, identificati con "raccolte 1 - 2 - 3 - 4 - 5". Per le raccolte 1 e 5, le quantità di WCOs disponibili sono modeste e, considerando le aliquote perse nei pretrattamenti, quelle da impiegare per la valutazione della qualità del prodotto e quelle da destinare alla produzione dei 30 litri di biocarburante, si è deciso di impiegare tali oli direttamente nello studio della performance di tutto il processo, ma non nell'analisi puntuale dell'andamento della reazione. Nell'ambito delle raccolte 2 - 3 - 4, invece, la materia prima è stata fornita in diversi momenti e apprezzabili quantità, per cui si è proceduto con l'analisi e l'utilizzo dei diversi campioni. Come precedentemente affermato, la raccolta dell'olio avviene a domicilio nell'ambito del comune di Castrolibero; non è noto l'olio vegetale di partenza da cui i WCOs sono stati ottenuti, per cui ci si vuole svincolare da questo e caratterizzare, ed eventualmente confrontare, i vari campioni di olio sulla base delle loro composizioni in termini di quantità ponderali di trigliceridi, digliceridi e monogliceridi; si seguirà l'evoluzione di tali composti e degli esteri prodotti durante la transesterificazione.

Dai cromatogrammi rielaborati nei dati presentati in tabella 4A.1 si evince che l'olio vegetale fresco è costituito principalmente da trigliceridi e in minima parte da digliceridi e monogliceridi. Per i WCOs la valutazione della composizione di ciascun olio nei diversi gliceridi mostra una differente situazione: tali risultati sono legati sia alla tipologia degli oli di partenza, che ai processi di frittura subiti dall'olio; infatti le elevate temperature a cui sono sottoposti determinano l'indebolimento delle molecole di trigliceridi in digliceridi e monogliceridi (Alireza et al., 2010). Tuttavia la quantità ponderale dei trigliceridi si mantiene elevata, pari o superiore al 90% w/w. Tali analisi

dimostrano, inoltre, che per un campione di olio esausto la quantità dei trigliceridi presenti può essere uguale, in un caso anche di poco superiore, a quella dell'olio fresco FRIOL.

## 4.2A Piano sperimentale

Gli oli presentati in tabella 4A.1 sono impiegati nella produzione di biodiesel secondo un piano di prove sperimentali indicato qui di seguito:

<i>Nome prova</i>	<i>tipo di olio</i>	<i>metanolo:olio [m/m]</i>	<i>KOH [%w/w]</i>
<b>F1</b>	Friol	6:1	1,5
<b>F2</b>	Friol	9:1	1,5
<b>F3</b>	Friol	6:1	2,0
<b>WCO1</b>	WCO da raccolta 3, lotto 2	6:1	1,5
<b>WCO2</b>	WCO da raccolta 3, lotto 1	6:1	1,5
<b>WCO3</b>	WCO da raccolta 3, lotto 3	6:1	1,5
<b>WCO4</b>	WCO da raccolta 3, lotto 4	6:1	1,5
<b>WCO5</b>	WCO da raccolta 4, lotto 1	9:1	1,5
<b>WCO5b</b>	WCO da raccolta 4, lotto 1	6:1	2,0
<b>Pro1</b>	WCO da raccolta 2	6:1	1,5
<b>Pro2</b>	WCO da raccolta 3	6:1	1,5
<b>Pro3</b>	WCO da raccolta 4	6:1	1,5

tabella 4A.2: Condizioni operative delle prove sperimentali

Le prove **F** sono relative all'olio vegetale fresco, mentre tutte le altre a campioni di WCO raccolti nel corso del progetto; in questo modo si intende valutare la performance di tutto il processo inizialmente sugli oli freschi (prove **F1**, **F2** e **F3**), poi su diversi

campioni di olio esausto (prove **WCO1**, **WCO2**, **WCO3**, **WCO4**, **WCO5** e **WCO5b**) ed infine sui WCOs impiegati per la valutazione della qualità del biodiesel e per la produzione dei 30 litri di biocarburante (prove **Pro1**, **Pro2** e **Pro3**). Per le prove Pro 2 - 3 si sono impiegati gli oli di raccolta 3 e 4 rispettivamente, ciascuno dei quali è stato ottenuto come miscela dei lotti forniti nell'ambito della specifica raccolta. Ciò è stato fatto anche allo scopo di valutare la prestazione di tutto il processo e la qualità del biocarburante prodotto dai WCOs di tutte e cinque le raccolte. Come già ricordato, gli oli esausti dalle raccolte 1 e 5 saranno impiegati per la valutazione della qualità del biodiesel (paragrafo 4.5A) e per la produzione di biocarburante su larga scala. Per le prove sui WCOs si è considerato di volta in volta un campione di olio esausto diverso, allo scopo di valutare le caratteristiche del processo implementato su diversi tipi di olio. Ogni prova è stata condotta in doppio, tutte le analisi in doppio (HPLC) o triplo (GC). Le prove sperimentali indicate in tabella 4A.2 sono state effettuate nell'impianto descritto nel capitolo 3A, alla temperatura di 55°C, velocità di agitazione pari a 3000 rpm e per un tempo di 90 minuti. Si è valutato l'effetto di alcune condizioni operative sulla reazione in catalisi basica e, quindi, in generale sul processo nella globalità delle sue fasi produttive: il rapporto molare metanolo/olio, la quantità ponderale del catalizzatore rispetto all'olio utilizzato e il particolare campione di WCO. Nello specifico, sulla base delle informazioni di letteratura precedentemente indicate nel capitolo 1, si ritiene che un rapporto molare metanolo:olio pari a 6:1 dia rese elevate in diversi lavori, dal momento che l'alcol in eccesso sposta la reazione all'equilibrio verso la formazione dei prodotti. Per ciascuna delle tre reazioni in serie - parallelo ciò si traduce in una maggiore formazione della miscela di esteri metilici di acidi grassi. Riguardo alla quantità di catalizzatore, prove preliminari con 0,5 e 1% w/w di KOH hanno portato a rese in esteri modeste (< 90% sul campione di biodiesel purificato) nello stesso impianto. Per cui si programmano le prove con l'1,5% w/w e il 2%w/w, sia in accordo con dati di letteratura che con l'intenzione di lavorare con quantità contenute di KOH, dal momento che il catalizzatore si ritrova in soluzione nella miscela prodotta ed eventualmente come impurezza anche nel biodiesel purificato.

#### 4.2.1A Prove su olio fresco

Le prove, effettuate nelle condizioni sopra indicate, su olio vegetale fresco presentano nel tempo l'andamento nei gliceridi e negli esteri mostrato nelle figure 4A.1, 4A.2 e 4A.3:

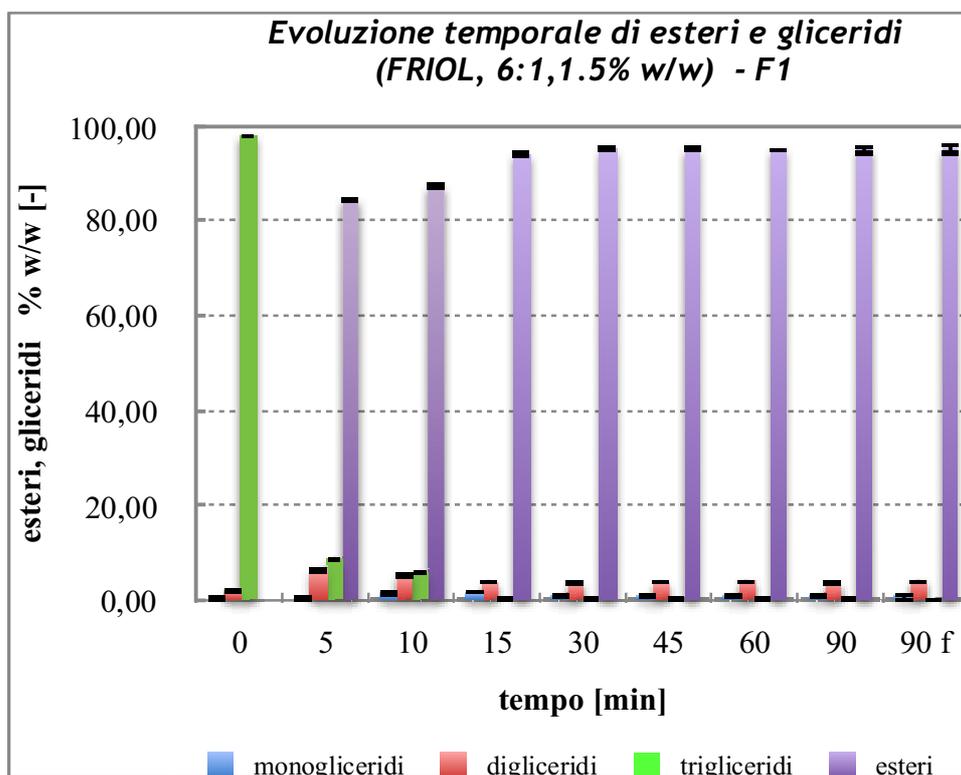


figura 4A.1: *Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova F1*

La reazione di transesterificazione dei gliceridi, prevalentemente trigliceridi, in esteri è molto veloce: dopo i primi 5 minuti si ottiene una quantità in esteri pari a circa 84% (valore su fase organica) e diminuisce in maniera significativa la quantità di trigliceridi. Successivamente si registra ancora una diminuzione dei trigliceridi e un aumento degli esteri; per entrambi i composti, dopo 15 minuti di reazione, le quantità ponderali si assestano attorno ad un valore costante. Si può ritenere che la reazione di scomparsa dei trigliceridi e conseguente formazione di esteri abbia raggiunto, nelle condizioni previste, l'equilibrio. Nei primi minuti di reazione appare evidente che la formazione degli esteri è dovuta alla scomparsa dei trigliceridi con conseguente formazione anche dei digliceridi; la quantità di questi ultimi aumenta per poi portarsi ad un valore pressoché costante dopo 15 minuti.

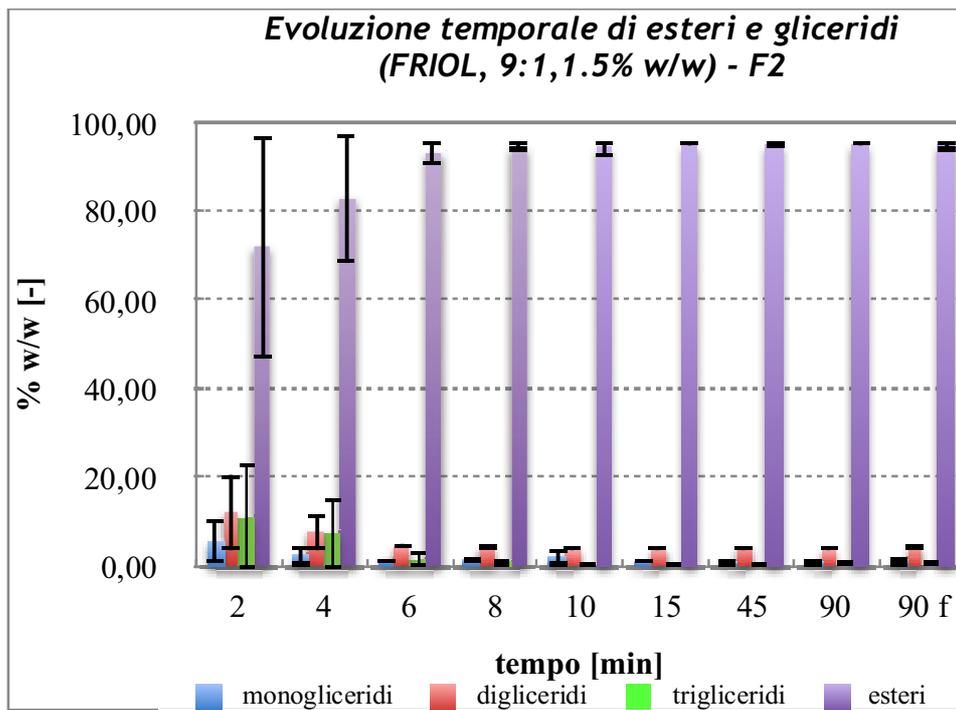


figura 4A.2: Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova F2

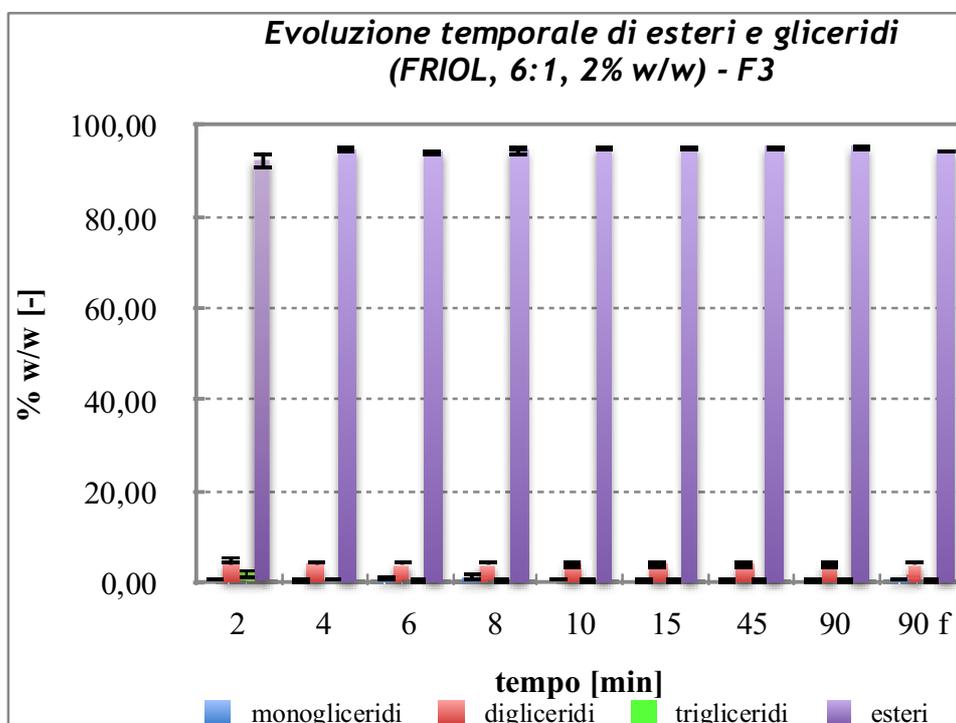


figura 4A.3: Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova F3

Nella figura 4A.1 è stata riportata anche la composizione iniziale dell'olio, cioè prima che a questo si aggiunga il metanolo e parta la reazione. Ciò è stato fatto allo scopo di mostrare come i trigliceridi sono velocemente convertiti in esteri, oltre che essere decomposti in digliceridi e questi successivamente in monogliceridi. Nelle prove che seguiranno si riporteranno in figura i dati rielaborati relativi ai campioni prelevati durante la reazione e al termine di questa, mentre si rimanda alle tabelle delle prossime pagine il confronto con le composizioni nei gliceridi tra olio, campioni di miscela reagita e biodiesel grezzo o purificato.

Dai risultati ottenuti nella prova **F1** emerge che la reazione di metanolisi con catalizzatore alcalino conferma le attese: ha luogo rapidamente; è spostata verso la formazione dei prodotti (esteri in particolare), visto l'eccesso di alcol alimentato; è una reazione all'equilibrio, costituita a sua volta da 3 reazioni in serie - parallelo. Considerata l'elevata velocità di reazione nei primi minuti, si ritiene opportuno ridefinire i tempi di campionamento per tutte le altre prove che seguono, infittendo il prelievo dei campioni nei primi 15 minuti e diradandolo da qui fino al termine della reazione.

La prova **F2** (figura 4A.2) mostra un alto valore di deviazione standard nei campioni prelevati a 2 e 4 minuti: ciò è legato principalmente alla rapidità del prelievo. Essendo la reazione molto veloce, un ritardo di pochi secondi nel campionamento può tradursi in errore sperimentale, falsando così la misura. Nelle prove successive si è tenuto conto di questo aspetto e della necessità di procedere con accurata celerità. Questa prova è condotta con un eccesso di alcol superiore rispetto a quello previsto per la **F1**. L'andamento dei diversi composti nel tempo segue quanto già descritto per la **F1**, ma si nota come i trigliceridi siano consumati ancora più rapidamente nei primi 6 - 8 minuti di reazione. Ciò è dovuto all'alcol in eccesso 9:1 rispetto al valore stechiometrico 3:1, oltre che alle condizioni operative adottate e all'impianto utilizzato. Proprio riguardo all'impianto è fondamentale sottolineare il ruolo del condensatore. Già nelle prove con rapporto molare di alimentazione 6:1 si osserva l'evaporazione del metanolo nei primi minuti di reazione, ma con un eccesso di alcol pari a 9:1 tale fenomeno è più accentuato: l'evaporazione riguarda una quantità maggiore di alcol e la condensazione del metanolo evaporato procede per 15 - 20 minuti, circa il doppio del tempo registrato nelle condizioni con 6:1. Anche per la prova **F2** l'andamento degli esteri e quello dei trigliceridi segue l'evoluzione già riscontrata nella **F1**.

Per la prova **F3** (figura 4A.3) si valuta l'effetto dell'aumento di quantità di catalizzatore: dopo 2 minuti di reazione si registra una produzione di esteri elevata (>90%) e maggiore rispetto ai casi precedenti; in seguito nei primi 15 minuti continua ad aumentare, ma di poco. Conseguentemente la diminuzione dei trigliceridi è marcata già nei primi minuti, così come la variazione di digliceridi e monogliceridi. La maggiore quantità di catalizzatore si traduce in una più alta velocità di reazione nei primi già significativi minuti della transesterificazione; mentre un rapporto di alimentazione molare 9:1, rispetto al 6:1, in queste condizioni porta ad un aumento della quantità di metanolo evaporato, per cui nell'ambiente di reazione il rapporto effettivo sarà di molto inferiore.

Dall'analisi di queste prove su olio vegetale fresco si sono dedotte alcune importanti informazioni sulla performance della reazione al variare delle condizioni operative considerate. Nella tabella 4A.3 si riportano alcuni valori delle quantità di esteri e gliceridi a momenti stabiliti: 0 (prima che il metanolo e il KOH in esso disciolto siano alimentati all'impianto), 15 minuti (tempo entro il quale si formano i FAMES in quantità elevate), 90 minuti (cioè al termine della reazione e prima dei trattamenti di purificazione sul biodiesel grezzo).

<b>composto</b>	<b>prova F1</b>			<b>prova F2</b>			<b>prova F3</b>		
	<b>t [min]</b>			<b>t [min]</b>			<b>t [min]</b>		
	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>90</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>90</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>90</b>
<i>esteri</i> [%w/w]	0,00	93,97	94,81	0,00	94,94	95,06	0,00	95,08	95,20
<i>trigliceridi</i> [%w/w]	97,64	0,47	0,27	97,64	0,35	0,37	97,64	0,38	0,36
<i>digliceridi</i> [%w/w]	2,00	3,94	3,82	2,00	3,92	3,91	2,00	4,09	4,03
<i>monogliceridi</i> [%w/w]	0,36	1,63	1,10	0,36	0,79	0,67	0,36	0,45	0,42

tabella 4A.3: Confronto delle quantità di esteri e gliceridi a tempi stabiliti  
 (prove F1, F2 e F3)

Dallo studio dei dati, riportati nei grafici e nelle tabelle finora presentati, si evince che la reazione ha luogo principalmente nei primi 15 minuti in tutte e tre le prove;

successivamente si registra: una piccola variazione nella quantità degli esteri, già ottenuti in notevoli quantitativi, e dei trigliceridi; un lieve aumento della quantità di digliceridi che raggiungono un valore finale pari al doppio di quello iniziale. Ciò si ritiene legato al raggiungimento delle condizioni di equilibrio nel sistema e nelle particolari condizioni operative implementate per ogni singola prova. Nella transesterificazione di oli vegetali, oltre all'ottenimento della miscela di FAMES e al consumo dei trigliceridi inizialmente presenti, si producono e si consumano digliceridi e monogliceridi in quantità significative, soprattutto se valutate rispetto a quelle inizialmente presenti nell'olio. Lo studio approfondito dell'equilibrio termodinamico, sebbene importante ed interessante, potrebbe arricchire la comprensione della transesterificazione degli oli in FAMES, ma non rientra negli scopi specifici di questo lavoro di tesi.

#### 4.2.2A Prove sui WCOs

Per quanto riguarda la reazione di metanolisi dei WCOs qui si riportano i risultati, la loro rielaborazione e discussione, di alcune prove significative nelle figure 4A.4 e 4A.5:

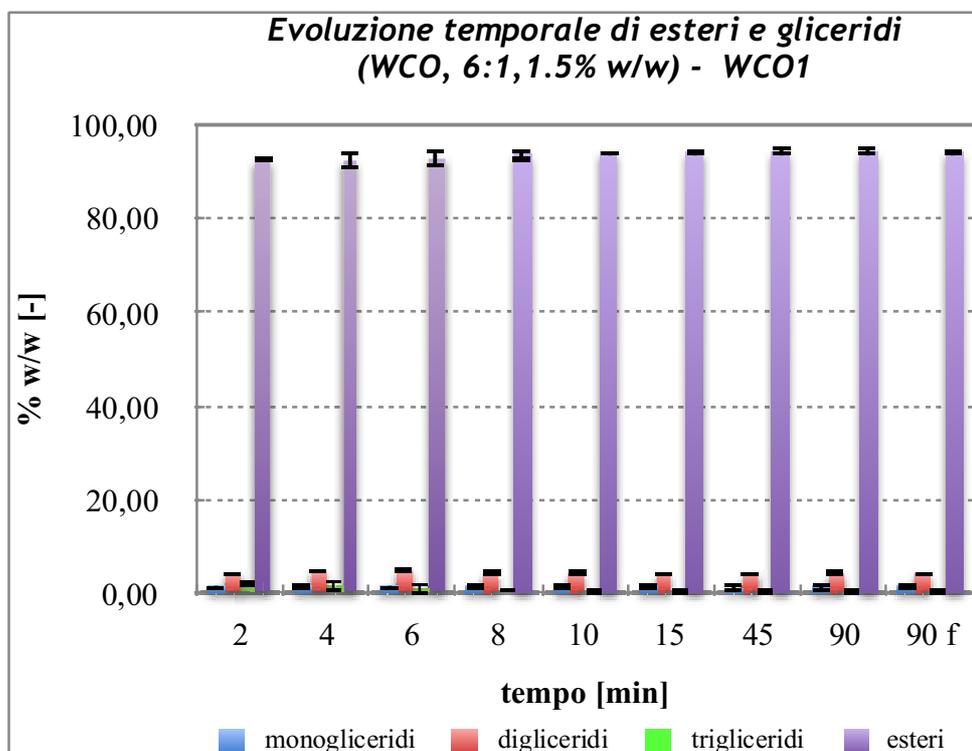


figura 4A.4: Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova WCO1

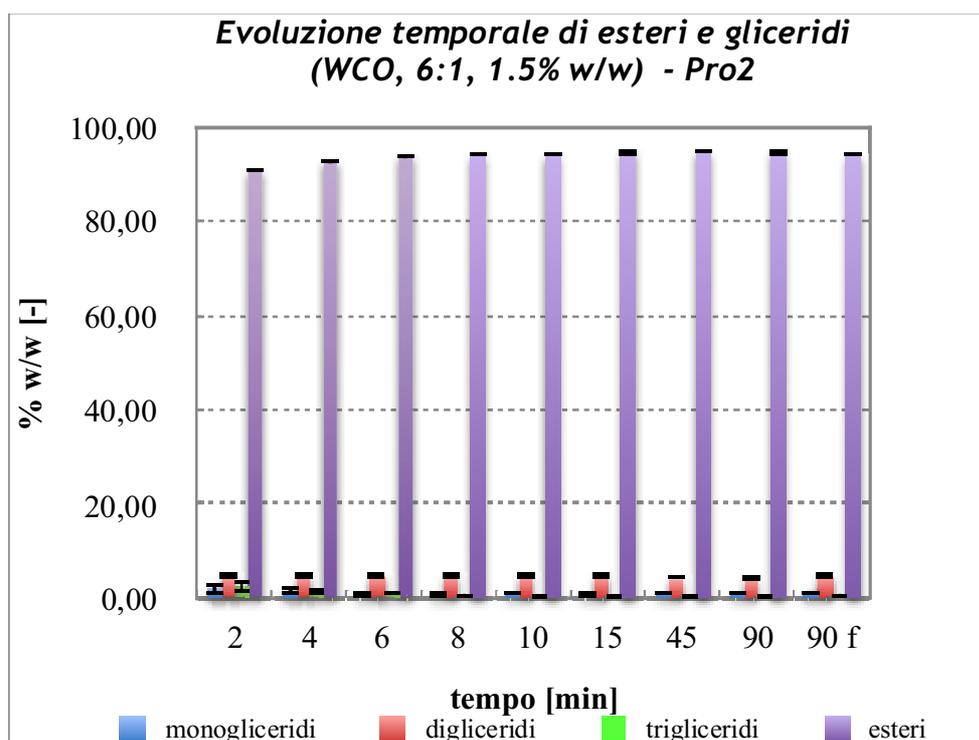


figura 4A.5: Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova Pro2

Anche sul campione di olio esausto impiegato nella prova **WCO1** (figura 4A.4) si procede con la transesterificazione nell'impianto e nelle condizioni previste per l'olio fresco e riportate in tabella 4A.2. La performance della reazione è simile a quella già vista per l'olio vegetale fresco: la reazione è molto veloce e nei primi minuti si ottiene una quantità, su base massica di frazione lipidica, degli esteri di poco superiore al 90%, aumentando di qualche punto percentuale nei successivi 10 minuti. Parallelamente i trigliceridi vengono velocemente consumati nei primi 5 - 6 minuti di reazione con conseguente formazione di digliceridi e monogliceridi. Per le altre prove sui WCOs l'evoluzione dei diversi composti nel tempo segue l'andamento della **WCO1**; in figura 4A.5 si riportano ad esempio i risultati della **Pro2** e in *Appendice IA* sono riportati i dati rielaborati di tutte le prove in catalisi basica.

La tabella 4A.4 riassume i risultati della composizione dell'olio fresco o esausto e della miscela ottenuta dopo 15 e 90 minuti di reazione, per le prove con la transesterificazione effettuata nelle stesse condizioni operative, cioè con rapporto molare alcol/olio pari a 6:1 e KOH pari all'1,5% w/w:

Prova	<b>Alcol/olio = 6:1 KOH = 1,5% w/w</b>				
	<i>tempo [min]</i>	esteri [%w/w]	trigliceridi [%w/w]	digliceridi [%w/w]	monogliceridi [%w/w]
<b>F1</b>	<b>0</b>	0,00	97,64	2,00	0,36
	<b>15</b>	93,97	0,47	3,94	1,63
	<b>90</b>	94,81	0,27	3,82	1,10
<b>WCO1</b>	<b>0</b>	0,00	89,05	5,83	5,12
	<b>15</b>	94,19	0,26	4,14	1,41
	<b>90</b>	94,23	0,44	4,05	1,28
<b>WCO2</b>	<b>0</b>	0,00	97,77	0,98	1,25
	<b>15</b>	93,88	0,88	4,31	0,94
	<b>90</b>	95,07	0,28	4,27	0,39
<b>WCO3</b>	<b>0</b>	0,00	95,75	3,78	0,47
	<b>15</b>	94,75	0,41	4,20	0,65
	<b>90</b>	94,17	0,34	4,13	1,37
<b>WCO4</b>	<b>0</b>	0,00	93,01	4,29	2,70
	<b>15</b>	94,55	0,28	4,45	0,73
	<b>90</b>	94,80	0,32	4,15	0,74
<b>Pro1</b>	<b>0</b>	0,00	94,67	4,78	0,56
	<b>15</b>	94,46	0,39	4,25	0,90
	<b>90</b>	94,64	0,47	4,00	0,90
<b>Pro2</b>	<b>0</b>	0,00	91,86	3,43	4,71
	<b>15</b>	94,48	0,28	4,55	0,71
	<b>90</b>	94,64	0,26	4,26	0,85
<b>Pro3</b>	<b>0</b>	0,00	93,01	4,29	2,70
	<b>15</b>	94,49	0,49	4,06	0,97
	<b>90</b>	94,91	0,30	4,01	0,78

tabella 4A.4: *Confronto delle quantità di esteri e gliceridi a tempi stabiliti in diverse prove con olio fresco ed esausto*

In tutte le prove riportate in tabella si confronta l'andamento dei gliceridi e degli esteri valutato nel corso della reazione in corrispondenza di tre momenti importanti: al tempo iniziale prima dell'alimentazione dell'alcol - si misura qui la composizione del

campione di olio considerato -, dopo 15 minuti di reazione e a 90 minuti, cioè al termine della transesterificazione e prima della purificazione nelle condizioni valutate. Pertanto i valori, che l'analisi in cromatografia liquida restituisce, si riferiscono a campioni di olio fresco tal quale o esausto pretrattato, alla miscela dopo 15 minuti di reazione e al biodiesel grezzo, rispettivamente.

Per gli esteri si nota che questi vengono prodotti già entro i primi 15 minuti e, in particolare già dopo 5 - 6 minuti si ottengono quantità superiori al 90% w/w. Dopo 15 minuti e per tutta la durata della reazione tale valore rimane costante e intorno al 95%. Di contro i trigliceridi si consumano velocemente nei primi minuti di reazione, per poi continuare in una modesta variazione o in alcuni casi mantenendosi costanti fino al termine della reazione stessa. Per quanto riguarda i digliceridi, dai dati si evince che nelle prove con olio vegetale fresco da una quantità iniziale pari al 2% w/w si ottiene un raddoppiamento di tale valore già dopo 15 minuti, aumentando poi di poco fino al termine della reazione. Per le prove con olio esausto la quantità iniziale di digliceridi (circa il 4% in media) è maggiore che nell'olio fresco e durante la reazione si verifica un modesto aumento di tale valore nei primi minuti e una contenuta variazione successivamente, sottolineando come i digliceridi si formino per effetto della decomposizione dei trigliceridi, ma anche si consumano successivamente reagendo con l'alcol e formando esteri e monogliceridi. Nella prova **WCO2** il campione di olio è costituito principalmente da trigliceridi, per cui si ha la formazione di digliceridi nella stessa misura della prova **F1** su olio fresco. Nelle prove fin qui esaminate si osserva che la quantità finale di digliceridi si assesta intorno a valori di 4,20 - 4,50% w/w, indipendentemente dalle caratteristiche del campione di olio utilizzato.

Riguardo ai monogliceridi si nota che il loro andamento è variabile nelle diverse prove considerate, in cui si sono utilizzati dei campioni con composizioni iniziali diverse soprattutto in termini di monogliceridi; si considera che il range di valori è compreso tra 0,36% (olio vegetale fresco) e 4,71% w/w (campione di olio esausto raccolta 3). Il valore finale della quantità di monogliceridi si assesta attorno all'1% in diverse prove, mentre in alcune prove è poco più alto, ma sempre inferiore all'1,5%.

La prova **WCO1** merita una valutazione a sé per quanto riguarda la discussione dei dati relativi ai gliceridi: l'olio esausto di partenza è costituito da trigliceridi in misura pari all'89%, ma presenta uguali quantità di monogliceridi e digliceridi. Queste ultime, se confrontate a quelle degli altri campioni di olio fresco o esausto, sono sicuramente

maggiori; durante la reazione si verifica sempre una drastica riduzione dei trigliceridi, una sostanziale riduzione dei digliceridi e una modesta diminuzione dei monogliceridi.

Dall'analisi dei dati relativi alle prove fin qui presentate si può affermare che, indipendentemente dal tipo di olio, valutato in termini della sua composizione iniziale in gliceridi, nelle condizioni previste dal processo si raggiunge una quantità finale di esteri prodotti di circa il 94% - 95% w/w.

Nelle figure 4A.6 e 4A.7 si riportano i dati rielaborati delle prove **WCO5** e **WCO5b**, eseguite sullo stesso lotto di olio esausto, ma in condizioni operative diverse rispetto a quelle viste finora.

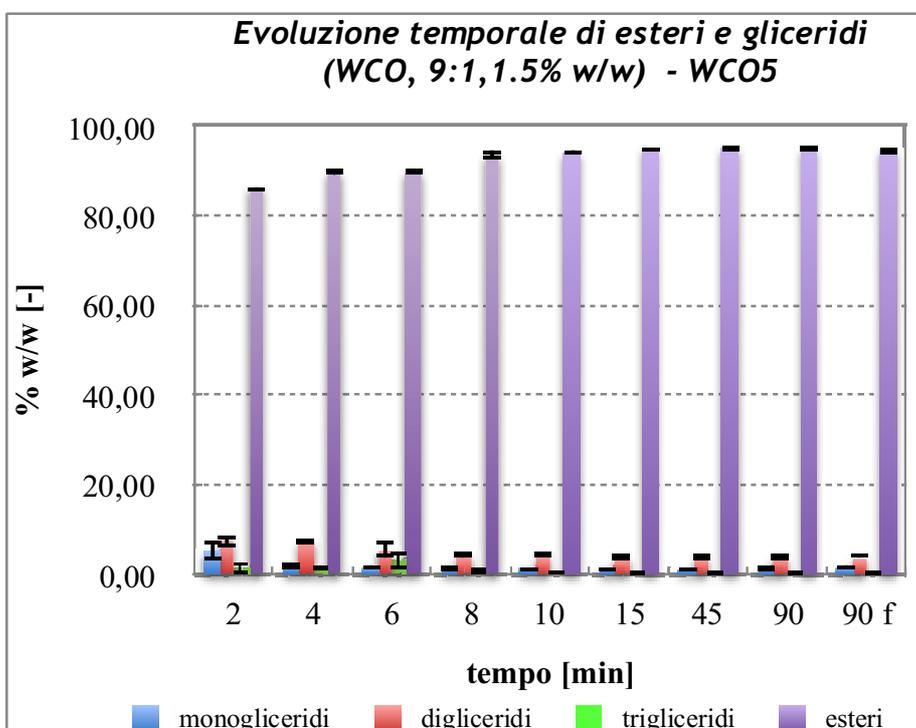


figura 4A.6: Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova WCO5

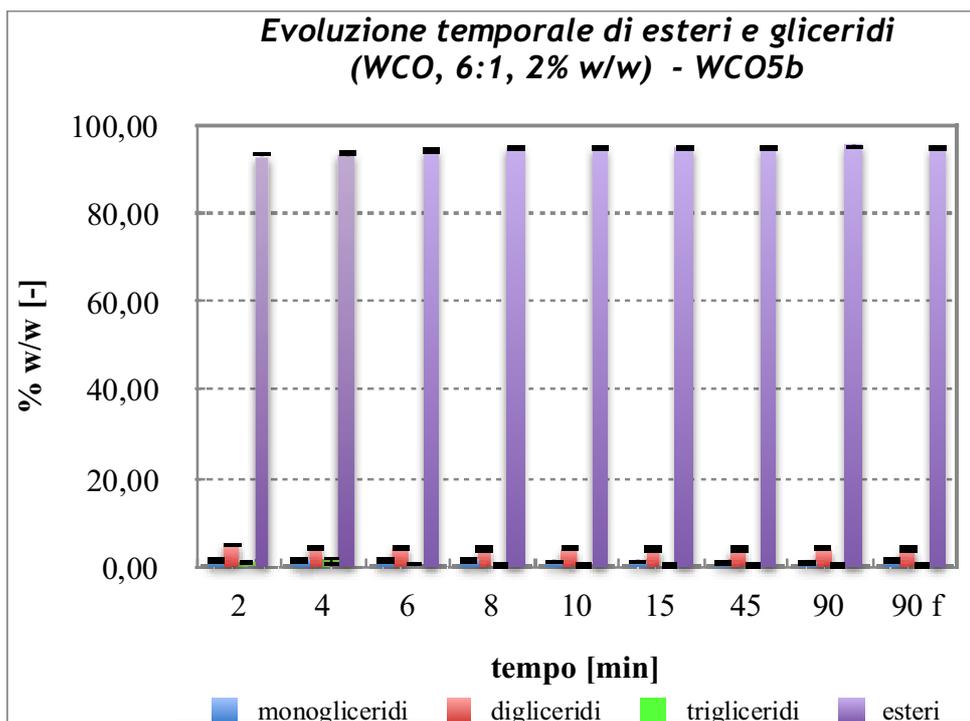


figura 4A.7: Evoluzione temporale di esteri e gliceridi, prova WCO5b

La performance della reazione, seguita da purificazione del biodiesel grezzo, mostra lo stesso andamento delle prove precedenti. Per un'analisi puntuale dell'andamento dei diversi composti si riportano alcuni dati significativi nella tabella 4A.5:

composto	prova WCO5 Alcol/olio = 9:1 KOH = 1,5% w/w			prova WCO5b Alcol/olio = 6:1 KOH = 2,0% w/w		
	t [min]			t [min]		
	0	15	90	0	15	90
esteri [%w/w]	0,00	94,99	95,02	0,00	94,91	94,99
trigliceridi [%w/w]	94,71	0,21	0,19	94,71	0,17	0,20
digliceridi [%w/w]	4,72	3,78	3,73	4,72	3,93	3,98
monogliceridi [%w/w]	0,57	1,02	1,07	0,57	1,00	0,84

tabella 4A.5: Confronto delle quantità di esteri e gliceridi a tempi stabiliti (prove WCO5 e WCO5b)

Sullo stesso lotto di olio esausto sono state condotte due prove caratterizzate da condizioni operative diverse nei due parametri, allo scopo di valutare quale situazione possa portare ad una maggiore quantità di esteri prodotti. Dai dati rielaborati e riassunti nella tabella 4A.5 si evince che in entrambi i casi la composizione della miscela dopo 15 minuti e di quella al termine della reazione presentano valori piuttosto vicini. Per cui si ritiene che non sia necessario lavorare con un eccesso di alcol pari a 9:1 né con quantità di KOH maggiori di 1,5%w/w; i valori dei parametri delle prove illustrate in tabella 4A.2 consentono di ottenere soddisfacenti risultati impiegando quantità di catalizzatore più contenute e volumi di metanolo che, sebbene sempre in eccesso, non siano tali da determinare una cospicua evaporazione, ed eventuale perdita, di alcol dall'ambiente di reazione, con conseguenti problemi di sicurezza e costi maggiori, tanto per citare gli aspetti più significativi. Risultato analogo si era riscontrato anche per le prove **F2** e **F3**, come evidenziato nella tabella 4A.3, condotte sullo stesso campione di olio e nelle condizioni operative delle **WCO5** e **WCO5b**.

Pertanto, per la produzione del biodiesel da utilizzare come carburante a scopo dimostrativo, si procederà con rapporto di alimentazione alcol/olio pari a 6:1 e quantità di KOH di 1,5% w/w. Per la produzione dei 30 litri richiesti si miscelano le quantità di biodiesel ottenuto dalla transesterificazione degli oli di raccolta 1 - 2 - 3 - 4 - 5, i cui campioni saranno analizzati e discussi nel paragrafo 4.5A.

### **4.3A Rese del processo**

Nel paragrafo precedente è stata studiata la transesterificazione in catalisi basica su diversi campioni di olio esausto pretrattato e su un olio fresco commerciale; per ogni caso è stata analizzata la performance della reazione attraverso la misura di gliceridi ed esteri (FAMES), in particolare al termine dei 90 minuti di reazione si è valutata la quantità di esteri alchilici, cioè di biodiesel grezzo prodotto. Segue ora la fase dei post-trattamenti allo scopo di purificare i FAMES da glicerolo, metanolo, gliceridi, acqua, KOH e altre impurezze presenti nell'olio di partenza o eventuali prodotti di reazioni secondarie indesiderate. Tale fase è costituita da due momenti distinti, entrambi della durata di 30 minuti ciascuno: sedimentazione del glicerolo e successiva separazione,

distillazione sottovuoto di metanolo e acqua dalla miscela esterea. In questo modo si otterrà la miscela di esteri metilici purificata, i cui campioni sono denominati dalla sigla “90 f”, dove *f* si riferisce ai parametri misurati alla fine di tutto il processo. In questo modo allo studio della reazione si affianca anche la valutazione dell’efficacia dei post-trattamenti sul biodiesel prodotto, attraverso il confronto delle quantità di esteri e gliceridi al termine della reazione, prima (90 minuti) e dopo i trattamenti di purificazione (90 *f*), e successivamente mediante il calcolo della resa % in esteri metilici, secondo il metodo riportato nel capitolo 3A.

Le tabelle 4A.6, 4A.7 e 4A.8 riportano i valori dei diversi composti dopo i 90 minuti di reazione previsti, prima e dopo i post-trattamenti, nelle prove previste in tabella 4A.2. Tali valori sono ottenuti da analisi cromatografica in HPLC, che restituisce nelle condizioni implementate una misura di esteri e gliceridi, ma non di metanolo e glicerolo. Per cui le quantità riportate sono delle percentuali massiche su una frazione lipidica totale, costituita appunto da esteri, trigliceridi, digliceridi e monogliceridi.

Prova	composto	tempo [min]	
		90	90 f
F1	esteri [%w/w]	94,81	94,85
	trigliceridi [%w/w]	0,27	0,18
	digliceridi [%w/w]	3,82	4,07
	monogliceridi [%w/w]	1,10	0,91
F2	esteri [%w/w]	95,06	94,50
	trigliceridi [%w/w]	0,37	0,37
	digliceridi [%w/w]	3,91	4,00
	monogliceridi [%w/w]	0,67	1,13
F3	esteri [%w/w]	95,20	94,54
	trigliceridi [%w/w]	0,36	0,36
	digliceridi [%w/w]	4,03	4,23
	monogliceridi [%w/w]	0,42	0,87

tabella 4A.6: *Confronto dei valori di esteri e gliceridi prima e dopo i trattamenti di purificazione del biodiesel (prove F1, F2 e F3)*

Prova	composto	tempo [min]	
		90	90 f
WCO1	esteri [%w/w]	94,23	93,88
	trigliceridi [%w/w]	0,44	0,48
	digliceridi [%w/w]	4,05	4,16
	monogliceridi [%w/w]	1,28	1,48
WCO2	esteri [%w/w]	95,07	94,55
	trigliceridi [%w/w]	0,28	0,29
	digliceridi [%w/w]	4,27	4,38
	monogliceridi [%w/w]	0,39	0,79
WCO3	esteri [%w/w]	94,17	93,82
	trigliceridi [%w/w]	0,34	0,29
	digliceridi [%w/w]	4,13	4,21
	monogliceridi [%w/w]	1,37	1,69
WCO4	esteri [%w/w]	94,80	94,36
	trigliceridi [%w/w]	0,32	0,31
	digliceridi [%w/w]	4,15	4,32
	monogliceridi [%w/w]	0,74	1,02
WCO5	esteri [%w/w]	95,02	94,37
	trigliceridi [%w/w]	0,19	0,21
	digliceridi [%w/w]	3,73	3,92
	monogliceridi [%w/w]	1,07	1,51
WCO5b	esteri [%w/w]	94,99	94,61
	trigliceridi [%w/w]	0,20	0,20
	digliceridi [%w/w]	3,98	3,88
	monogliceridi [%w/w]	0,84	1,32

tabella 4A.7: Confronto dei valori di esteri e gliceridi prima e dopo i trattamenti di purificazione del biodiesel (prove WCO1, WCO2, WCO3, WCO4, WCO5 e WCO5b)

Prova	composto	tempo [min]	
		90	90 f
Pro1	esteri [%w/w]	94,64	94,17
	trigliceridi [%w/w]	0,47	0,19
	digliceridi [%w/w]	4,00	4,44
	monogliceridi [%w/w]	0,90	1,21
Pro2	esteri [%w/w]	94,64	94,17
	trigliceridi [%w/w]	0,26	0,33
	digliceridi [%w/w]	4,26	4,50
	monogliceridi [%w/w]	0,85	1,01
Pro3	esteri [%w/w]	94,91	94,53
	trigliceridi [%w/w]	0,30	0,26
	digliceridi [%w/w]	4,01	4,20
	monogliceridi [%w/w]	0,78	1,02

tabella 4A.8: Confronto dei valori di esteri e gliceridi prima e dopo i trattamenti di purificazione del biodiesel (prove WCO1, WCO2, WCO3, WCO4, WCO5 e WCO5b)

Il confronto di questi campioni di miscela esterea al termine della reazione e del biodiesel purificato consente anche di valutare l'efficacia degli *steps* di trattamento sul biodiesel grezzo. Infatti i campioni 90 e 90 f si riferiscono al biodiesel grezzo e a quello dopo la separazione di glicerolo e metanolo (e acqua) rispettivamente. I dati mostrano che per quanto riguarda gli esteri, in tutte le prove con gli oli esausti, i valori a 90 minuti risultano, anche se di poco, maggiori di quelli a 90f; il risultato della purificazione del biodiesel grezzo è una redistribuzione nei diversi gliceridi ed esteri. Tali quantità sono calcolate sulla massa totale di frazione lipidica, ma - come già ricordato in alcune occasioni - non tengono in conto delle quantità di alcol e glicerolo eventualmente presenti. Si può dedurre che una piccola parte di esteri si allontana con il glicerolo libero separato. La percentuale massica dei trigliceridi si mantiene costante nei due momenti considerati, tranne che nelle prove **F1** e **Pro1**; in queste ultime si può ritenere che i trigliceridi si siano allontanati con il glicerolo libero nel primo *step* di post-trattamento. I digliceridi e i monogliceridi presentano valori maggiori a valle della purificazione in tutte le prove presentate, tranne che per la prova **WCO5b** per i digliceridi e nella **F1** per i monogliceridi.

La ridistribuzione di questi composti, oltre che all'efficacia dei metodi di purificazione effettuati, può essere legata anche ad altri fattori. Ad esempio, si considera che al termine della reazione il biodiesel grezzo è sottoposto direttamente ai processi di post-trattamento, senza cioè subire raffreddamento istantaneo, portandosi lentamente dalla temperatura di reazione di 55°C fino alla temperatura ambiente, per cui il catalizzatore non allontanatosi con il glicerolo è ancora attivo nei primi momenti di questa fase. Tracce di metanolo sono ancora presenti nella miscela esterea, mentre parte di esso si è allontanato con il glicerolo, e la transesterificazione dei trigliceridi non convertiti, con conseguente produzione e consumo di digliceridi e monogliceridi, può ancora aver luogo. E' da sottolineare come il glicerolo può, anche se in piccole quantità, sciogliersi nella miscela di esteri metilici, in quanto l'alcol funge da cosolvente (Knothe et al., 2015), soprattutto nelle prove in cui si è impiegato un forte eccesso di alcol.

Per gli scopi preposti si intende, inoltre, valutare la qualità del biodiesel prodotto in base ai valori dei parametri presenti nella normativa UNI EN 14214; tra questi è da considerare in primo luogo il calcolo della resa % in esteri metilici. La valutazione della resa % in esteri, derivata dalla rielaborazione dei dati ottenuti in cromatografia gassosa secondo la formula riportata nel capitolo 3A, si riferisce alla misura della quantità di esteri metilici in un campione di biodiesel di peso noto, cioè è definita dal rapporto tra la massa di esteri e la massa totale di un dato campione di biodiesel purificato. Perciò la massa totale tiene conto anche delle quantità di metanolo e glicerolo, per le quali non è possibile la valutazione mediante analisi in HPLC nelle condizioni impiegate.

Nella tabella 4A.9 si riportano i valori di resa ottenuti in ciascuna prova, per un particolare tipo di olio di composizione nota e per le condizioni operative indicate:

Prova	Composizione olio			condizioni operative della reazione	resa in esteri [%w/w] UNI EN 14214
	monogliceridi [%w/w]	digliceridi [%w/w]	trigliceridi [%w/w]		
<b>F1</b>	0,36	2,00	97,64	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	93,25
<b>F2</b>	0,36	2,00	97,64	9:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	91,84
<b>F3</b>	0,36	2,00	97,64	6:1 [m/m] 2,0 [%w/w]	96,56
<b>WCO1</b>	5,12	5,83	89,05	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	95,27
<b>WCO2</b>	1,25	0,98	97,77	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	98,02
<b>WCO3</b>	0,47	3,78	95,75	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	95,22
<b>WCO4</b>	2,70	4,29	93,01	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	95,54
<b>WCO5</b>	0,57	4,72	94,71	9:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	95,75
<b>WCO5b</b>	0,57	4,72	94,71	6:1 [m/m] 2,0 [%w/w]	96,01
<b>Pro1</b>	0,56	4,78	94,67	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	96,59
<b>Pro2</b>	4,71	3,43	91,86	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	95,89
<b>Pro3</b>	2,70	4,29	93,01	6:1 [m/m] 1,5 [%w/w]	97,23

tabella 4A.9: Confronto tra la composizione iniziale dell'olio, le condizioni operative della transesterificazione e la resa finale in esteri ottenuta al termine del processo per le prove della tabella 4.2.1A

I valori di resa sono superiori al 90% per ogni prova effettuata, raggiungendo anche il 98% nella **WCO2**. Questi risultati dimostrano che le condizioni operative, in termini di rapporto molare di alimentazione e quantità di catalizzatore, i pretrattamenti sull'olio esausto e i post-trattamenti sul biodiesel grezzo, sono stati valutati nella giusta misura nell'impianto considerato; non si riscontra invece una correlazione tra la composizione dei gliceridi nell'olio di partenza e il valore di resa finale. A tal proposito si può dedurre che la performance del processo, espressa mediante valutazione della resa % in esteri metilici, tiene conto dell'effetto di più fattori concomitanti, tra questi i più importanti sono: la qualità e le caratteristiche dell'olio, le condizioni operative implementate e l'efficacia dei pretrattamenti sull'olio esausto e post-trattamenti sul biodiesel grezzo.

Inoltre, per ogni prova dal cromatogramma ottenuto in GC, si ottengono informazioni riguardo alla quantità % totale degli esteri ottenuti dalla transesterificazione e a valle della purificazione, ma anche quelle relative alla distribuzione dei diversi tipi di esteri in ogni campione. Nella tabella 4A.10 si riportano le quantità % dei diversi tipi di esteri metilici, differenziandoli perciò in base alla catena idrocarburica del corrispondente acido grasso:

<i>Prova</i>	<i>esteri metilici</i>					
	<i>C 16:0</i> [%w/w]	<i>C 16:1</i> [%w/w]	<i>C 18:0</i> [%w/w]	<i>C 18:1</i> [%w/w]	<i>C 18:1 (v)</i> [%w/w]	<i>C 18:2</i> [%w/w]
<b>F1</b>	9,35	—	3,43	31,49	—	55,73
<b>F2</b>	9,32	—	3,41	31,30	—	55,98
<b>F3</b>	9,73	—	3,53	29,42	—	57,32
<b>WCO1</b>	8,31	—	4,04	30,61	0,89	56,51
<b>WCO2</b>	8,00	—	3,79	28,72	—	59,49
<b>WCO3</b>	7,49	—	3,65	29,67	—	59,19
<b>WCO4</b>	7,90	—	3,82	29,94	—	58,34
<b>WCO5</b>	10,50	—	22,50	45,94	1,65	18,54
<b>Pro1</b>	8,31	—	4,04	30,61	0,89	56,15

tabella 4A.10: *Distribuzione dei diversi tipi di esteri metilici nei campioni di biodiesel prodotti*

In questa tabella sono stati riportati i dati che hanno mostrato buona ripetibilità in tutte e tre le analisi effettuate per ciascuna prova. Qui si sono differenziati gli esteri metilici ottenuti in base alla catena dell'acido grasso; la sequenza di questi acidi nel cromatogramma è: palmitico, palmitoleico, stearico, oleico, vaccenico e linoleico. La catena alifatica dell'acido grasso nell'estere dipende da quella dei trigliceridi di partenza nel campione di olio impiegato. Nel capitolo 1 si è riportata la distribuzione di tali acidi grassi in diversi oli di uso comune; qui si è valutato che sia dall'olio fresco commerciale che dai diversi campioni di olio esausto si ottengono miscele di esteri metilici, costituite - nella maggior parte dei casi - per metà da esteri dell'acido linoleico, per il 30% dall'acido oleico e poi la restante parte dall'estere dell'acido palmitico con tracce di

esteri di C16:1, C 18:0 e C18:1v (vaccenico), a seconda dei vari tipi di olio utilizzato. Uguali quantità di acido linoleico si ritrovano negli oli, e presumibilmente negli esteri ottenuti per transesterificazione, di girasole, mais, soia e cotone (tabella 1.7). L'olio vegetale fresco FRIOL è costituito da olio di girasole e altri oli vegetali frazionati solitamente impiegati nella frittura. Perciò la distribuzione degli esteri in termini degli acidi grassi è piuttosto simile nelle prove **F1**, **F2** e **F3**.

Per i campioni di WCO non si conosce la provenienza dell'olio vegetale fresco usato nei processi di frittura o in generale nella preparazione degli alimenti; pertanto gli esteri metilici ottenuti nelle diverse prove risentono dalle diverse caratteristiche degli oli di partenza. Considerevoli quantità di esteri di C18:1 si riscontrano nell'olio di oliva, mais, arachide e palma principalmente; mentre per simili quantità di C16:0 si considerano gli oli di mais e arachidi. L'impiego dell'olio d'oliva è dimostrato anche dalla presenza di esteri metilici dell'acido vaccenico, isomero presente solitamente proprio in campioni esterificati o transesterificati dell'olio di oliva. Il biodiesel prodotto nella prova **WCO5** è stato ottenuto da un campione di olio esausto con caratteristiche diverse dagli altri campioni impiegati, risultando in una miscela costituita principalmente dall'estere dell'acido oleico piuttosto che del linoleico, e in buona parte (circa 30%) da esteri saturi, cioè ottenuti dal C16:0 e C18:0. Si ottiene così una miscela di esteri insaturi per circa il 70% e monoinsatura per il 50%; mentre per le altre prove si producono miscele esteree di insature al 50% e monoinsatura al 30%,

Sempre nel capitolo 1 si sono evidenziati alcuni aspetti del livello di insaturazione in relazione ai composti considerati e alle loro successive applicazioni. Nell'ambito di questo lavoro di ricerca è fondamentale tener conto del legame tra il livello di insaturazione e le proprietà del biocarburante prodotto, come si discuterà nel seguente paragrafo.

#### **4.4A Qualità del biodiesel**

Altre prove sono state condotte sui campioni delle raccolte 1 - 2 - 3 - 4 - 5. Come già ricordato nei precedenti paragrafi, nelle prove finora presentate si sono impiegati sia i campioni di olio esausto ottenuti dai singoli lotti che quelli derivanti dalla miscelazione

in parti uguali di tutti i lotti relativa ad una fase di raccolta (è il caso delle raccolte 3 e 4). Questi ultimi saranno qui impiegati nelle prove **Racc 1 - 2 - 3 - 4 - 5** allo scopo di valutare la qualità del biodiesel, ottenuto dal processo considerato. Ognuna delle prove è caratterizzata dalle stesse condizioni relative alla reazione, ma da un diverso campione di olio e alcune differenze nei pretrattamenti sull'olio e post-trattamenti sulla miscela esterea prodotta. In ogni caso, ad eccezione del WCO di raccolta 5, l'olio esausto è stato pretrattato secondo le modalità e condizioni presentate nel capitolo 3A e la reazione è stata condotta con rapporto di alimentazione metanolo/olio di 6:1, KOH pari all'1,5% w/w, 55°C e 3000 rpm, e per un tempo di 90 minuti. Le fasi produttive del processo, pur essendo uguali nella metodologia a quelle delle prove mostrate finora, presentano qui una differenza nella durata dei trattamenti di purificazione della miscela esterea prodotta; inoltre la prova **Racc 5** sarà caratterizzata anche dall'assenza di pretrattamenti specifici sull'olio esausto di partenza. La tabella 4A.11 presenta le diverse prove, per ciascuna delle quali si riportano il tipo di l'olio esausto di partenza e le condizioni operative nella fase di purificazione della miscela di esteri metilici prodotta:

Prova	Tipo di olio	Pretrattamenti			Post - trattamenti	
		Filtrazione	Rimozione acqua	Filtrazione sottovuoto	sedimentazione glicerolo tempo [h]	distillazione metanolo e acqua tempo [min]
<b>Racc 1</b>	WCO, raccolta 1	sì	sì	sì	1	20
<b>Racc 2</b>	WCO, raccolta 2	sì	sì	sì	24	30
<b>Racc 3</b>	WCO, raccolta 3	sì	sì	sì	1	30
<b>Racc 4</b>	WCO, raccolta 4	sì	sì	sì	24	40
<b>Racc 5</b>	WCO, raccolta 5	sì	no	no	1	20

tabella 4A.11: *Descrizioni delle prove sperimentali Racc 1-2-3-4-5*

Tutte le prove sono state condotte in doppio e ciascuna analisi in triplo.

La prova **Racc 5** merita un'analisi a parte, in quanto si è voluto valutare l'efficacia non solo dei post-trattamenti condotti per tempi diversi, ma anche quella dei pretrattamenti. Per cui sul campione di olio della raccolta 5 si è eseguita solo una filtrazione da residui

grossolani e si è proceduto con la transesterificazione nelle condizioni operative uguali a tutte le altre prove e post-trattamenti come per la prova **Racc 1**.

Affinché il biodiesel prodotto possa essere impiegato come *fuel*, è necessario che campioni del prodotto finale siano sottoposti alle analisi preposte e i parametri misurati rientrino nei range previsti dagli standard internazionali, come la normativa europea UNI EN 14214 e americana ASTM D-6751. Qui di seguito, come già ricordato, si farà riferimento alla legislazione europea. Pertanto, i campioni di biodiesel purificato ottenuti da ogni prova saranno analizzati in un laboratorio esterno certificato, quale è il laboratorio RECORD dell'Università di Firenze. Le figure dalla 4A.8 alla 4A.12 indicano i parametri misurati per ogni campione di biodiesel prodotto e la specifica metodologia standard applicata, insieme con il range o il valore minimo o massimo consentito.

Già dallo studio dell'andamento della reazione e dalla valutazione delle rese % in esteri metilici si è focalizzata l'attenzione sul contenuto finale in esteri (*ester content*), ma anche sulla misura dei gliceridi non convertiti, nonché sulla possibilità qui di valutare i residui di metanolo, glicerolo libero e catalizzatore (*potassium*) presenti nella miscela di biodiesel purificato; tra questi, nel lavoro in esame, risultano particolarmente importanti le quantità di metanolo e glicerolo libero. A questo proposito tramite la valutazione di tali parametri si valuta l'efficacia dei post-trattamenti. Il metanolo è alimentato in eccesso rispetto a quello stechiometrico (6:1 anziché 3:1): ciò garantisce che le tre reazioni in serie - parallelo siano spostate verso la formazione dei prodotti, cioè l'estere, ma nello stesso tempo la quantità di alcol non reagito si ritrova nella miscela finale al termine della reazione. Il metanolo è esplosivo e corrosivo, per cui oltre che nella fase di ignizione del carburante, questo può essere pericoloso già nella fase di stoccaggio, trasporto e accumulo di notevoli quantità di biodiesel; può inoltre modificare il valore di *flash point* della miscela esterea.

Il contenuto di glicerolo libero nel biodiesel è legato sia alla sua produzione nel processo che all'efficacia dei metodi di separazione a valle della reazione. Nei motori questo sedimenta sul fondo, trascinando altre sostanze polari come l'acqua, monogliceridi e saponi, e causando danni al sistema di iniezione del veicolo (Mittelbach, 1996).

Altri parametri da considerare sono: la viscosità e il corrispondente effetto sull'iniezione del combustibile; la densità del biodiesel; il numero di iodio come indice del livello di

insaturazione della miscela esterea, come illustrato nel capitolo 1. L'*oxidation stability*, invece, tiene conto della “sensibilità” del biodiesel alla degradazione ossidativa in ragione della sua composizione chimica, soprattutto in presenza di elevate quantità di esteri insaturi. Un altro parametro importante per i *fuels* è il *flash point* (FP), definito come la temperatura più bassa alla quale dal combustibile si ottiene una quantità sufficienti di vapori che, miscelati con aria, danno luogo all’iniezione; all’aumentare delle quantità residue di alcol, il *flash point* diminuisce, per cui tale parametro può essere considerato come indice della presenza di metanolo nel biodiesel (Sarin, 2012). Il numero di cetano (CN) costituisce un parametro legato alla qualità del combustibile, tramite il suo tempo di ritardo di accensione, e alla qualità stessa della combustione: maggiore è il CN, migliori sono le proprietà di ignizione del combustibile; più è basso il CN, maggiore è l’emissione di idrocarburi e particolati. Il CN aumenta con l’aumentare della lunghezza della catena degli acidi grassi e dei gruppi alchilici degli esteri, mentre è inversamente proporzionale al numero dei doppi legami. Sono da considerare anche le proprietà del fluido e quindi la sua performance a basse temperature tramite il *cloud point* (CP), il *pour point* (PP) e il *cold filter plugging point* (CFPP). Il CP rappresenta la temperatura alla quale nel campione di carburante cominciano a formarsi i primi cristalli di cera, che possono causare otturazione delle linee e dei filtri. Il PP è definito come la temperatura alla quale il fluido cessa di scorrere; ciò è solitamente legato ad un aumento della viscosità o alla formazione di cristalli. Il CFPP, la cui determinazione è prevista dalla UNI EN 14214, è la temperatura alla quale il *fuel* causa l’otturazione del filtro; per questo motivo è considerato come la temperatura alla quale la miscela esterea cristallizza.

Si considerano inoltre sia il valore di acidità (nella definizione fornita nel capitolo 1) che il contenuto di acqua, la quale può essere presente con l’olio non pretrattato e parzialmente rimossa da questo, ma anche essere assorbita dal biodiesel igroscopico nella fase di stoccaggio, portando ad inconvenienti quale reazioni di idrolisi, formazione di emulsioni in presenza di detergenti, corrosione di serbatoi ed apparecchiature, sporcamento del *fuel* e problemi al motore. La “contaminazione totale” è definita come la quantità di materiale insolubile trattenuto dopo la filtrazione di un campione di biodiesel sotto condizioni standardizzate; rappresenta cioè un importante criterio di qualità, perché misura la concentrazione delle impurità insolubili che causano il blocco dei filtri e delle pompe del sistema di iniezione dei veicoli. Sono, inoltre, misurate le

concentrazioni di zolfo, ceneri, fosforo (solitamente presente nei WCO nei sali inorganici), sodio, calcio e magnesio.

Si riporta l'analisi nel dettaglio dei campioni di biodiesel ottenuti dalle cinque raccolte dei WCOs nelle figure 4A.8 -9-10-11-12, riportate nelle seguenti pagine:



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**Renewable Energy Consortium for Research and Demonstration**  
**Consorzio per la Ricerca e la Dimostrazione sulle Energie Rinnovabili**

Laboratorio Chimico

Telefono: +39 055 8431096 Email: [lab@re-cord.org](mailto:lab@re-cord.org) Indirizzo: viale Kennedy 182, 50038, Scarperia (FI)

Campione: **Biodiesel\_ campione 4**

Esame visivo: colore giallo paglierino, opaco, acqua libera non visibile, no sospensioni.

Parametri	Valore	Unità	Limiti	Norma
Viscosity at 40°C	3,55	mm <sup>2</sup> /s	min. 3,50 – 5,00	UNI EN ISO 3104
Density at 15°C	873	kg/m <sup>3</sup>	max.	UNI EN 12185
Acid value	0,037	mg KOH/g	max 0,50	UNI EN 14104
Ester content	97,8	%(m/m)	min.96,5	EN 14103
Water content	680	mg/kg	max. 500	EN ISO 12937
Total contamination	72	mg/kg	max 24	UNI EN 12662
Iodine number	104,1	g Iodine/100 g	max. 120	EN 14111
Flash Point	169,0	°C	min. 101	EN ISO 3679
Cetane number (DCN)	54,3	-	min.51,0	EN 15195
Sulphur content	<5	mg/kg	max. 10	EN ISO20884
Sulfated ash (775°C)	0,029	%(m/m)	max. 0,02	ISO 3987
Phosphorus content	0,30	mg/kg	max. 8	UNI EN ISO 14107
Copper strip corrosion	1	corr°	max. 1	EN ISO 2160
Oxidation stability	0,9	h	min. 8	DIN EN 14112
Linoleic acid content	0,4	%(m/m)	max. 12,0	EN 14103
Polyunsaturated Methyl Esters	<0,6	%(m/m)	max. 1,00	EN 15779/A1
Methanol content	0,88	%(m/m)	max. 0,20	DIN EN 14110
Free glycerol content	0,148	%(m/m)	0,02	DIN EN 14105
Monoglyceride content	0,50	%(m/m)	0,70	DIN EN 14105
Diglyceride content	0,14	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Triglyceride content	0,22	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Total glycerol content	0,317	%(m/m)	0,25	DIN EN 14105
CFPP	-6	°C	-	EN 116
Carbon residue (10% Dist.)	1,04	%(m/m)	0,30	EN ISO 10370
Sodium	1,98	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14108
Potassium	172,2	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14109
Calcium	4,8	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538
Magnesium	0,27	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538

\* u.m.l. = under measurable limit

Scarperia, 16/04/2015

Laboratorio RE-Cord

Dr.ssa Ilaria Marsili Libelli, Dr. Lorenzo Bettucci, Dr.ssa Giulia Lotti

Sede Legale: Consorzio RE-CORD c/o Azienda Agricola Villa Montepaldi Srl. – Università degli Studi di Firenze - Via di Mucciana 25, 50026, San Casciano Val di Pesa (Firenze) - P.IVA 06099990480  
 Sede Operativa: CREAR, c/o Dipartimento di Energetica "S.Stecco", Univ.di Firenze, Via S.Maria 3, 50139 Firenze  
 Laboratorio chimico (Pianvallico): viale J.F.Kennedy 182, Scarperia (FI) 50038

figura 4A.8: Analisi dei parametri previsti dalla UNI EN 14214 per il biodiesel da Racc 4

Il campione 4 è caratterizzato da un contenuto in esteri piuttosto buono, superiore al minimo previsto e con un livello di polinsaturazione accettabile; sono ammissibili anche i valori dei gliceridi non convertiti e non separati con la sedimentazione e successivo allontanamento del glicerolo. Eccedono i limiti imposti i valori di metanolo e glicerolo libero; per questi si dovrebbe provvedere con un ulteriore *step* di purificazione, ad esempio mediante lavaggio con acqua della miscela esterea. Sono buoni i valori di densità e viscosità, così come quello di acidità. Quest'ultimo, in particolare, è ben al di sotto dei limiti, per cui si ritiene che non siano necessari trattamenti sul biodiesel o sull'olio di partenza per ridurre il contenuto dei FFAs. Supera il valore di riferimento sia il contenuto di acqua che la contaminazione totale; mentre entro i limiti sono le concentrazioni di zolfo, ceneri, sodio, calcio e magnesio. Eccede il limite la quantità di potassio, cioè il catalizzatore residuo nella miscela purificata. Si è calcolato che, per una quantità di KOH iniziale di 1,5%w/w rispetto all'olio caricato, in questo processo si sia allontanato il 98,3% del catalizzatore alimentato, mentre dovrebbe essere rimosso il 99,95%. Come precedentemente affermato, il KOH mostra affinità soprattutto con l'alcol e il glicerolo, per cui promuovere una più efficace separazione di questi composti consentirebbe di realizzare una migliore purificazione anche dal catalizzatore residuo. Per avere un quadro completo della qualità del biocombustibile prodotto si considera, ad esempio, il numero di iodio; questo indica il livello di insaturazione della miscela, individuando un valore massimo consentito. Il campione 4, pur mostrando un buon grado di insaturazione della miscela esterea - risultato atteso vista la composizione del biodiesel ottenuto processando lo stesso olio nelle prove **WCO5** e **WCO5b** -, si mantiene entro il limite. Questo campione ha, inoltre, buone qualità di combustione, come si evince dai valori del FP e CN, e cristallizza alla temperatura di -6°C; ciò è legato alla tipologia e grado di insaturazione degli esteri, come discusso nel capitolo 1. Basso è, invece, il valore legato alla stabilità all'ossidazione.

Si riporta, qui di seguito, il dettaglio delle analisi sul campione di biodiesel da **Racc 2**:



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**Renewable Energy Consortium for Research and Demonstration**  
**Consorzio per la Ricerca e la Dimostrazione sulle Energie Rinnovabili**

Laboratorio Chimico

Telefono: +39 055 8431096 Email: [lab@re-cord.org](mailto:lab@re-cord.org) Indirizzo: viale Kennedy 182, 50038, Scarperia (FI)

## Report Analisi

Offerta di riferimento 000013/2015

Campione: **Biodiesel\_ campione 2**

Esame visivo: colore giallo paglierino, opaco, acqua libera non visibile, no sospensioni.

Parametri	Valore	Unità	Limiti	Norma
Viscosity at 40°C	3,43	mm <sup>2</sup> /s	min. 3,50 – 5,00	UNI EN ISO 3104
Density at 15°C	874	kg/m <sup>3</sup>	max.	UNI EN 12185
Acid value	0,047	mg KOH/g	max 0,50	UNI EN 14104
Ester content	97,5	%(m/m)	min.96,5	EN 14103
Water content	874	mg/kg	max. 500	EN ISO 12937
Total contamination	88	mg/kg	max 24	UNI EN 12662
Iodine number	124,7	g Iodine/100 g	max. 120	EN 14111
Flash Point	90,0	°C	min. 101	EN ISO 3679
Cetane number (DCN)	53,3	-	min.51,0	EN 15195
Sulphur content	<5	mg/kg	max. 10	EN ISO20884
Sulfated ash (775°C)	0,070	%(m/m)	max. 0,02	ISO 3987
Phosphorus content	u.m.l.	mg/kg	max. 8	UNI EN ISO 14107
Copper strip corrosion	1	corr°	max. 1	EN ISO 2160
Oxidation stability	2,1	h	min. 8	DIN EN 14112
Linoleic acid content	0,2	%(m/m)	max. 12,0	EN 14103
Polyunsaturated Methyl Esters	<0,6	%(m/m)	max. 1,00	EN 15779/A1
Methanol content	0,94	%(m/m)	max. 0,20	DIN EN 14110
Free glycerol content	0,212	%(m/m)	0,02	DIN EN 14105
Monoglyceride content	0,40	%(m/m)	0,70	DIN EN 14105
Diglyceride content	0,19	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Triglyceride content	0,09	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Total glycerol content	0,351	%(m/m)	0,25	DIN EN 14105
CFPP	-3	°C	-	EN 116
Carbon residue (10% Dist.)	1,17	%(m/m)	0,30	EN ISO 10370
Sodium	4,05	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14108
Potassium	196,5	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14109
Calcium	2,12	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538
Magnesium	0,56	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538

\* u.m.l. = under measurable limit

*Sede Legale: Consorzio RE-CORD c/o Azienda Agricola Villa Montepaldi Srl. – Università degli Studi di Firenze - Via di Mucciana 25, 50026, San Casciano Val di Pesa (Firenze) - P.IVA 06099990480*  
*Sede Operativa: CREAR, c/o Dipartimento di Energetica "S.Stecco", Univ.di Firenze, Via S.Marta 3, 50139 Firenze*  
*Laboratorio chimico (Pianvallico): viale J.F.Kennedy 182, Scarperia (FI) 50038*

figura 4A.9: Analisi dei parametri previsti dalla UNI EN 14214 per il biodiesel da **Racc 2**

Il campione 2 differisce dal 4, oltre che per il tipo di olio impiegato, anche per la durata della distillazione sottovuoto, 30 anziché 40 minuti. In entrambi i casi (**Racc 2 e Racc 4**) si ottiene una resa in esteri metilici maggiore del minimo previsto (96,5%), ma anche apprezzabili valori della viscosità, acidità, numero di cetano, oltre che delle quantità residue di impurezze quali calcio, magnesio, zolfo, ceneri e fosforo. Il campione **Racc 4** presenta un valore di *flash point* alto, mentre per il **Racc 2** è al di sotto del limite consentito. Inoltre, il numero di iodio è migliore nel **Racc 4** che nel **Racc 2**; quest'ultimo è, inoltre, caratterizzato da un elevato livello di insaturazione della miscela di FAMES. Anche per il campione 2 il contenuto di acqua eccede il limite, così come per le quantità di metanolo, glicerolo libero e potassio, ma - così come per il campione 4 - trigliceridi, digliceridi e monogliceridi non reagiti sono al di sotto dei limiti indicati; tali quantità sono legate alla performance della reazione principalmente oltre che dello *step* successivo di purificazione della miscela di esteri metilici.

Si può affermare che i campioni 2 e 4, pur partendo da oli esausti diversi, ma sottoposti allo stesso processo nelle sue tre fasi produttive (pretrattamenti dell'olio esausto, transesterificazione basica, post-trattamenti) con una differenza solo nella durata dell'ultimo *step* di purificazione, presentano per lo più caratteristiche vicine per il biocombustibile, soprattutto per quei parametri che dipendono dalla performance della reazione, ma ovviamente tengono in conto le diverse caratteristiche e specifiche degli oli di partenza.

Le figure 4A.10 e 4A.11 si riferiscono al quadro dettagliato dei parametri dei campioni 3 e 1 rispettivamente:



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**Renewable Energy Consortium for Research and Demonstration**  
**Consorzio per la Ricerca e la Dimostrazione sulle Energie Rinnovabili**

Laboratorio Chimico

Telefono: +39 055 8431096 Email: [lab@re-cord.org](mailto:lab@re-cord.org) Indirizzo: viale Kennedy 182, 50038, Scarperia (FI)

Campione: **Biodiesel\_ campione 3**

Esame visivo: colore giallo paglierino, opaco, acqua libera non visibile, no sospensioni.

Parametri	Valore	Unità	Limiti	Norma
Viscosity at 40°C	3,53	mm <sup>2</sup> /s	min. 3,50 – 5,00	UNI EN ISO 3104
Density at 15°C	873	kg/m <sup>3</sup>	max.	UNI EN 12185
Acid value	0,035	mg KOH/g	max 0,50	UNI EN 14104
Ester content	93,3	%(m/m)	min.96,5	EN 14103
Water content	863	mg/kg	max. 500	EN ISO 12937
Total contamination	3.435	mg/kg	max 24	UNI EN 12662
Iodine number	116,8	g Iodine/100 g	max. 120	EN 14111
Flash Point	46,0	°C	min. 101	EN ISO 3679
Cetane number (DCN)	52,8	-	min.51,0	EN 15195
Sulphur content	<5	mg/kg	max. 10	EN ISO20884
Sulfated ash (775°C)	0,070	%(m/m)	max. 0,02	ISO 3987
Phosphorus content	0,28	mg/kg	max. 8	UNI EN ISO 14107
Copper strip corrosion	1	corr°	max. 1	EN ISO 2160
Oxidation stability	1,6	h	min. 8	DIN EN 14112
Linoleic acid content	0,2	%(m/m)	max. 12,0	EN 14103
Polyunsaturated Methyl Esters	<0,60	%(m/m)	max. 1,00	EN 15779/A1
Methanol content	1,70	%(m/m)	max. 0,20	DIN EN 14110
Free glycerol content	0,438	%(m/m)	0,02	DIN EN 14105
Monoglyceride content	0,60	%(m/m)	0,70	DIN EN 14105
Diglyceride content	0,60	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Triglyceride content	1,88	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Total glycerol content	0,871	%(m/m)	0,25	DIN EN 14105
CFPP	-6	°C	-	EN 116
Carbon residue (10% Dist.)	2,40	%(m/m)	0,30	EN ISO 10370
Sodium	0,93	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14108
Potassium	71,56	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14109
Calcium	58,4	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538
Magnesium	1,07	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538

\* u.m.l. = under measurable limit

*Sede Legale: Consorzio RE-CORD c/o Azienda Agricola Villa Montepaldi SrL Università degli Studi di Firenze - Via di Mucciana 25, 50026, San Casciano Val di Pesa (Firenze) - P.IVA 06099990480*  
*Sede Operativa: CREAR, c/o Dipartimento di Energetica "S.Stecco", Univ.di Firenze, Via S.Marta 3, 50139 Firenze*  
*Laboratorio chimico (Pianvallico): viale J.F.Kennedy 182, Scarperia (FI) 50038*

figura 4A.10: Analisi dei parametri previsti dalla UNI EN 14214 per il biodiesel da **Racc 3**



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**Renewable Energy Consortium for Research and Demonstration**  
**Consorzio per la Ricerca e la Dimostrazione sulle Energie Rinnovabili**

Laboratorio Chimico

Telefono: +39 055 8431096 Email: [lab@re-cord.org](mailto:lab@re-cord.org) Indirizzo: viale Kennedy 182, 50038, Scarperia (FI)

## Report Analisi

Offerta di riferimento 000013/2015

Campione: **Biodiesel\_campione 1**

Esame visivo: colore giallo paglierino, opaco, acqua libera non visibile, no sospensioni.

Parametri	Valore	Unità	Limiti	Norma
Viscosity at 40°C	3,53	mm <sup>2</sup> /s	min. 3,50 – 5,00	UNI EN ISO 3104
Density at 15°C	877	kg/m <sup>3</sup>	max.	UNI EN 12185
Acid value	0,039	mg KOH/g	max 0,50	UNI EN 14104
Ester content	95,3	%(m/m)	min.96,5	EN 14103
Water content	257	mg/kg	max. 500	EN ISO 12937
Total contamination	72	mg/kg	max 24	UNI EN 12662
Iodine number	123,2	g Iodine/100 g	max. 120	EN 14111
Flash Point	102,5	°C	min. 101	EN ISO 3679
Cetane number (DCN)	53,7	-	min.51,0	EN 15195
Sulphur content	21,7	mg/kg	max. 10	EN ISO20884
Sulfated ash (775°C)	0,111	%(m/m)	max. 0,02	ISO 3987
Phosphorus content	0,1	mg/kg	max. 8	UNI EN ISO 14107
Copper strip corrosion	1	corr°	max. 1	EN ISO 2160
Oxidation stability	2,7	h	min. 8	DIN EN 14112
Linoleic acid content	0,3	%(m/m)	max. 12,0	EN 14103
Polyunsaturated Methyl Esters	<0,6	%(m/m)	max. 1,00	EN 15779/A1
Methanol content	0,75	%(m/m)	max. 0,20	DIN EN 14110
Free glycerol content	0,458	%(m/m)	0,02	DIN EN 14105
Monoglyceride content	0,45	%(m/m)	0,70	DIN EN 14105
Diglyceride content	0,17	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Triglyceride content	0,12	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Total glycerol content	0,610	%(m/m)	0,25	DIN EN 14105
CFPP	-2	°C	-	EN 116
Carbon residue (10% Dist.)	1,60	%(m/m)	0,30	EN ISO 10370
Sodium	1,9	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14108
Potassium	256,7	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14109
Calcium	u.m.l.	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538
Magnesium	0,01	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538

\* u.m.l. = under measurable limit

*Sede Legale: Consorzio RE-CORD c/o Azienda Agricola Villa Montepaldi Srl. Università degli Studi di Firenze - Via di Mucciana 25, 50026, San Casciano Val di Pesa (Firenze) - P.IVA 06099990480  
 Sede Operativa: CREAR, c/o Dipartimento di Energetica "S.Stecco", Univ.di Firenze, Via S.Marta 3, 50139 Firenze  
 Laboratorio chimico (Pianvallico): viale J.F.Kennedy 182, Scarperia (FI) 50038*

figura 4A.11: Analisi dei parametri previsti dalla UNI EN 14214 per il biodiesel da **Racc 1**

Le prove **Racc 1** e **Racc 3** sono entrambe caratterizzate da uno *step* di sedimentazione del glicerolo di un'ora e distillazione pari a 20 minuti. I campioni di biodiesel 1 e 3 presentano un valore di resa in esteri metilici inferiore al limite consentito e uguali criticità relative agli altri parametri sopra indicati per le precedenti prove **Racc 2** e **Racc 4**. Da ciò si evince come la durata dei post-trattamenti, oltre che la qualità dell'olio esausto di partenza, incide sulla qualità del biodiesel finale.

Il campione 1 mostra un contenuto di acqua inferiore al massimo consentito (unico campione dei cinque presentati), ma concentrazioni elevate di zolfo e ceneri; ha un buon valore di FP e CN, ma un numero di iodio maggiore del limite.

Il campione 3, caratterizzato da una maggiore concentrazione di impurezze insolubili, acqua, trigliceridi e digliceridi non convertiti, calcio residuo, mostra un basso valore di FP e alto valore di metanolo.

Il campione di WCO impiegato nella prova **Racc 5** (figura 4A.12) si differenzia dagli altri per i pretrattamenti soprattutto; si tratta cioè di un olio esausto purificato solo dai residui grossolani, ma che presenta ancora impurezze al suo interno. Si intende valutare l'effetto che queste possano avere durante il processo, nelle stesse condizioni di reazione delle altre prove e con uguali post-trattamenti della prova **Racc 1**. Si ottiene, pertanto, una miscela reagita ma parzialmente, con un contenuto in esteri inferiore al 90% e quindi quantità considerevoli di trigliceridi, ma anche digliceridi, monogliceridi, metanolo e glicerolo libero. Elevata è la quantità di KOH che resta nella miscela esterea anche dopo separazione del glicerolo per sedimentazione e purificazione da metanolo e acqua; si calcola che è stato allontanato circa il 92% del catalizzatore immesso nell'impianto. Questo è una sostanza affine al metanolo e al glicerolo, le cui quantità sono relativamente alte nella miscela di esteri metilici purificata. Inoltre, i valori di alcuni parametri come la densità, il numero di iodio e il *flash point* non rientrano nei range previsti. La miscela prodotta non ha, quindi, le caratteristiche del biocarburante che si vuole ottenere.



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**Renewable Energy Consortium for Research and Demonstration**  
**Consorzio per la Ricerca e la Dimostrazione sulle Energie Rinnovabili**

Laboratorio Chimico

Telefono: +39 055 8431096 Email: [lab@re-cord.org](mailto:lab@re-cord.org) Indirizzo: viale Kennedy 182, 50038, Scarperia (FI)

Campione: **Biodiesel\_campione 5**

Esame visivo: colore giallo paglierino, opaco, acqua libera non visibile, no sospensioni.

Parametri	Valore	Unità	Limiti	Norma
Viscosity at 40°C	5,52	mm <sup>2</sup> /s	min. 3,50 – 5,00	UNI EN ISO 3104
Density at 15°C	887	kg/m <sup>3</sup>	max.	UNI EN 12185
Acid value	0,06	mg KOH/g	max 0,50	UNI EN 14104
Ester content	<90(75,6)	%(m/m)	min.96,5	EN 14103
Water content	767	mg/kg	max. 500	EN ISO 12937
Total contamination	51	mg/kg	max 24	UNI EN 12662
Iodine number	122,4	g Iodine/100 g	max. 120	EN 14111
Flash Point	42,5	°C	min. 101	EN ISO 3679
Cetane number (DCN)	53,0	-	min.51,0	EN 15195
Sulphur content	31,9	mg/kg	max. 10	EN ISO20884
Sulfated ash (775°C)	0,140	%(m/m)	max. 0,02	ISO 3987
Phosphorus content	0,53	mg/kg	max. 8	UNI EN ISO 14107
Copper strip corrosion	1	corr°	max. 1	EN ISO 2160
Oxidation stability	3,1	h	min 8	DIN EN 14112
Linoleic acid content	0,2	%(m/m)	max. 12,0	EN 14103
Polyunsaturated Methyl Esters	<0,6	%(m/m)	max. 1,00	EN 15779/A1
Methanol content	1,17	%(m/m)	max. 0,20	DIN EN 14110
Free glycerol content	0,636	%(m/m)	0,02	DIN EN 14105
Monoglyceride content	1,70	%(m/m)	0,70	DIN EN 14105
Diglyceride content	3,96	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Triglyceride content	14,09	%(m/m)	0,20	DIN EN 14105
Total glycerol content	3,998	%(m/m)	0,25	DIN EN 14105
CFPP	-4	°C	-	EN 116
Carbon residue (10% Dist.)	0,75	%(m/m)	0,30	EN ISO 10370
Sodium	8,05	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14108
Potassium	842,7	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14109
Calcium	u.m.l.	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538
Magnesium	0,1	mg/kg	max. 5,0	UNI EN 14538

\* u.m.l. = under measurable limit

Scarperia, 04/05/2015

Laboratorio RE-Cord

Dr.ssa Ilaria Marsili Libelli, Dr. Lorenzo Bettucci, Dr.ssa Giulia Lotti

*Sede Legale: Consorzio RE-CORD c/o Azienda Agricola Villa Montepaldi Srl. Università degli Studi di Firenze - Via di Mucciana 25, 50026, San Casciano Val di Pesa (Firenze) - P.IVA 06099990480*  
*Sede Operativa: CREAR, c/o Dipartimento di Energetica "S.Stecco", Univ.di Firenze, Via S.Marta 3, 50139 Firenze*  
*Laboratorio chimico (Pianvallico): viale J.F.Kennedy 182, Scarperia (FI) 50038*

figura 4A.12: Analisi dei parametri previsti dalla UNI EN 14214 per il biodiesel da **Racc 5**

Le prove **Racc 1 - 2 - 3 - 4** differiscono tra di loro, oltre che per il tipo di olio esausto, per la durata delle fasi di purificazione della miscela prodotta tramite transesterificazione dei diversi WCOs, come mostrato in tabella 4A.12. Qui è riportata anche la resa finale in esteri, parametro impiegato anche nelle discussione dei risultati per tutte le prove viste finora ed indice della produttività del processo. Come già sottolineato precedentemente, la necessità e l'importanza dei post-trattamenti mirati alla purificazione dei FAMES da reagenti non convertiti, sottoprodotti, catalizzatore ed altre impurezze sono confermate dai risultati ottenuti anche in questa sede, dove si confrontano le performance di questi metodi di separazione anche in ragione della loro durata. Per cui si deduce che entrambi le fasi di post-trattamento adempiono al loro compito, ma ciascuna di esse porta a risultati migliori se condotta per tempi lunghi, cioè 24 ore per la sedimentazione e 30 - 40 minuti per la distillazione sottovuoto. In particolare, le prove Racc 2 e Racc 4 mostrano quanto appena affermato: indipendentemente dal tipo di olio esausto pretrattato e sottoposto a transesterificazione in catalisi basica, la resa in esteri raggiunge valori elevati (>97%). La sedimentazione del glicerolo ha luogo velocemente in imbuto separatore, infatti nei primi 10 minuti si realizza una buona stratificazione della fase esterea da quella del glicerolo che si deposita sul fondo. Tuttavia, è consigliabile lasciar proseguire la sedimentazione per almeno 24 ore per consentire una più efficace separazione e agevolare anche la successiva purificazione del biodiesel dalle tracce di alcol e acqua (anche di catalizzatore in questi disciolto). Nelle prove con durata inferiore di queste fasi, per le impurezze introdotte con l'olio e quelle ottenute nel corso della reazione, non si realizza una separazione così netta ed efficace, come accade per le prove Racc 2 e 4.

Prova	<b>Post - trattamenti</b>		<b>Resa in esteri [%w/w] UNI EN 14214</b>
	<i>sedimentazione glicerolo</i> <b>tempo [h]</b>	<i>distillazione metanolo e acqua</i> <b>tempo [min]</b>	
<b>Racc 1</b>	1	20	95,3
<b>Racc 2</b>	24	30	97,5
<b>Racc 3</b>	1	30	93,3
<b>Racc 4</b>	24	40	97,8

tabella 4A.12: *Confronto tra le condizioni delle fasi di post-trattamento e valutazione della resa finale in esteri (Racc 1 - 2 - 3 - 4)*

Nei paragrafi precedenti sono state trattate le prove **Pro 1 - 2 - 3** sugli oli esausti dalle raccolte 2 - 3 - 4 rispettivamente, i cui risultati sono ora confrontati in tabella 4A.13 con le prove **Racc 2 - 3 - 4**, che impiegano gli stessi oli. Pertanto sullo stesso olio, con uguali condizioni per i pretrattamenti e per la reazione, ma con durata differente dei post-trattamenti, si intende confrontare proprio l'effetto della durata dei post-trattamenti sulla performance del processo:

Tipo di olio	Prova	Post-trattamenti		Resa in esteri [%w/w] UNI EN 14214
		sedimentazione del glicerolo tempo	distillazione di metanolo e acqua tempo	
raccolta 2	Pro 1	30 min	30 min	96,59
	Racc 2	24 h	30 min	97,50
raccolta 3	Pro 2	30 min	30 min	95,89
	Racc 3	1 h	20 min	93,30
raccolta 4	Pro 3	30 min	30 min	97,23
	Racc 4	24 h	40 min	97,80

tabella 4A.13: *Confronto tra le condizioni delle fasi di post-trattamento e valutazione della resa finale in esteri per le prove Pro e Racc, che impiegano lo stesso campione di WCO*

Sull'olio di raccolta 2 (prove **Pro 1** e **Racc 2**) la differenza consiste nella durata del primo *step* di purificazione, cioè la sedimentazione e conseguente allontanamento del glicerolo e di altre impurezze in esso disciolte, nonché di tracce di esteri. Un tempo di 24 ore consente di realizzare una più efficace separazione del glicerolo libero e legato (gliceridi oltre al glicerolo libero), ma anche di metanolo e KOH, agevolando in questo modo anche la fase successiva di purificazione della miscela esterea. Tutto ciò si traduce in una maggiore resa finale in esteri, pur raggiungendo in entrambi i casi un valore di resa maggiore di 96,5%.

Sull'olio di raccolta 4 sono condotte le prove **Pro 3** e **Racc 4** che differiscono nella durata di entrambi gli *steps* di post-trattamento; in generale nella fase di purificazione in evaporatore rotante il range considerato è di 20 - 40 minuti, in quanto si è verificato che in queste condizioni per tutte le prove effettuate, interrompendo la distillazione prima di 20 minuti, si riduce significativamente l'efficacia del processo, poiché quantità

importanti di metanolo e acqua non hanno avuto il tempo di distillare; mentre per un tempo maggiore di 40 minuti il processo di distillazione può ritenersi concluso. Si è, inoltre, notato che da 30 a 40 minuti sono piccole le quantità di distillato raccolto, per cui si ritiene che l'efficacia del processo è legata, quindi, alla differenza nella durata della fase di sedimentazione del glicerolo, ma che in entrambi i casi si raggiunge un valore di resa elevato (>97%). L'efficacia dei post-trattamenti e l'importanza della loro durata sono state ampiamente verificate, ma a parità di condizioni tra le prove **Pro 1** e **Pro 3**, ma anche **Racc 2** e **Racc 4**, si deduce che il valore della resa finale in esteri è legato anche alla qualità dell'olio di partenza.

Confrontando le prove **Pro 2** e **Racc 3**, condotte sull'olio pretrattato di raccolta 3, si è visto come per la **Pro 2** il valore maggiore di resa sia legato all'effetto determinato da una maggiore durata della distillazione sottovuoto, mentre un'ora di sedimentazione non consente di allontanare il glicerolo e le altre impurezze con lo stesso efficacia del trattamento condotto per 24 ore.



## *Parte IA: Transesterificazione basica di oli esausti per produzione di biodiesel*

### **Capitolo 5A: Conclusioni**

Nella sezione *A* della parte *I* del presente lavoro di ricerca si è esaminata ed approfondita la transesterificazione basica di oli esausti ottenuti mediante la raccolta “porta a porta”, nell’ambito di un comune vicino al Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, con l’obiettivo di produrre del biodiesel dalle caratteristiche previste dalle norme europee in materia. A questo scopo si è implementato un processo articolato in tre fasi: pretrattamento degli oli esausti raccolti, reazione di transesterificazione in catalisi basica e post-trattamenti sul biodiesel grezzo. In primo luogo per poter studiare la performance della transesterificazione basica si sono effettuate delle prove su un olio fresco di frittura commerciale (FRIOL), di composizione nota e costante, nell’impianto realizzato in laboratorio; in questa fase del lavoro si sono individuate le condizioni operative più vantaggiose, valutate soprattutto in termini del rapporto molare di alimentazione alcol:olio e quantità di catalizzatore, ma anche considerando la temperatura e la velocità di agitazione della miscela reagente, il tempo di reazione e la procedura di conduzione delle prove. Al termine della reazione si rende necessario purificare la miscela di esteri metilici di acidi grassi (FAMEs) per rimuovere le impurezze residue quali il glicerolo, ottenuto come sottoprodotto di reazione, metanolo, gliceridi non convertiti, catalizzatore, eventualmente anche acqua ed altre sostanze già presenti in tracce nell’olio di partenza. Questo stadio è costituito da

due momenti distinti: sedimentazione e separazione del glicerolo, distillazione sottovuoto di metanolo ed acqua; per questa fase si sono esaminate e individuate le condizioni operative migliori per ottenere una più elevata resa in esteri. Questo primo set di prove apre il campo alla sperimentazione sugli oli esausti ottenuti nell'ambito delle diverse raccolte: alla loro caratterizzazione segue una fase di pretrattamento per rimuovere solidi grossolani in primo luogo, ma anche acqua e solidi fini in un secondo momento. L'olio così purificato può essere impiegato nella reazione e successivo post-trattamento, nelle modalità presentate per la transesterificazione dell'olio fresco.

Per ogni campione di olio utilizzato si osserva che la reazione è molto veloce già nei primi minuti, anche variando i parametri principali considerati, e la fase dei post-trattamenti rappresenta un momento cruciale per l'ottenimento di un biocarburante di buona qualità. Per questo motivo si sono approfonditi gli aspetti legati alla purificazione della miscela esterea e si è accertata la necessità di predisporre tempi lunghi (anche superiori a 24 ore) per la sedimentazione del glicerolo e durata di 30 - 40 minuti per la distillazione sottovuoto, nelle specifiche condizioni operative che garantiscono un'efficace separazione del metanolo e dell'acqua residui nel biodiesel. Sebbene esuli dal presente lavoro, risulterebbe interessante una più ampia discussione sulle tecniche di separazioni adottate e i loro effetti, con particolare attenzione all'implementazione del processo su scala industriale.

Mediante il processo, descritto e presentato nelle sue fasi sperimentali nei capitoli 2 - 3A - 4A, si è prodotto del biocarburante di buona qualità per alcuni aspetti, indipendentemente dal tipo di olio esausto impiegato. Infatti, i valori di resa finale in esteri metilici raggiungono e superano in alcuni casi il limite previsto, così come quelli dei gliceridi residui, del *flash point* e numero di cetano rientrano nel rispettivo range indicato. Tuttavia, altri interventi per purificare ulteriormente il biodiesel da impurezze, quali l'alcol residuo e il catalizzatore soprattutto, e migliorare in alcuni casi i parametri legati alle prestazioni del biocarburante possono essere individuati ed esaminati. La natura "modulare" del processo lo rende suscettibile di modifiche e aggiunte senza stravolgere le varie fasi presentate; inoltre, per una più dettagliata comprensione dei vari aspetti relativi alla reazione si potrebbe, ad esempio, esaminare il ruolo del trasporto di materia in questo sistema bifasico.

La fase dei pretrattamenti dei WCOs dipende dal campione di olio considerato, valutato nella sua composizione in termini dei diversi gliceridi, ma anche nelle quantità di acqua

e FFAs eventualmente presenti. La transesterificazione in catalisi basica si conferma come un buon metodo per produrre del biofuel da oli vegetali freschi o esausti; nell'impianto considerato, infatti, le prestazioni della reazione, valutate in termini di resa % di esteri metilici prodotti, sono confrontabili con quelle ottenute nella pratica industriale. In particolare i tempi di reazione sono contenuti, poiché nei 90 minuti considerati si è osservato che la transesterificazione ha luogo nei primi 20 - 30 minuti; nonostante l'eccesso di alcol alimentato si predispone il suo recupero con successiva condensazione e ricaduta in ambiente di reazione; la quantità di catalizzatore alcalino può mantenersi entro l'1,5% w/w rispetto all'olio processato. Tuttavia, come già presentato nel capitolo 2, la catalisi basica presenta alcuni aspetti svantaggiosi, rispetto ad esempio, alla transesterificazione enzimatica: la temperatura di reazione è più alta, rendendo così il processo energivoro; la presenza di FFAs e acqua nell'olio possono dar luogo a reazione indesiderate, come la saponificazione e l'idrolisi rispettivamente; nella fase dei post-trattamenti si constata che sia la purificazione degli esteri che il recupero del glicerolo necessitano di diversi *steps* soprattutto per allontanare l'alcol residuo e il catalizzatore impiegato in fase omogenea. Tuttavia il basso costo del catalizzatore, l'elevata resa in esteri alchilici di acidi grassi prodotti e i bassi tempi di reazione fanno sì che il processo in catalisi basica rappresenti ancora una buona tecnologia di produzione del biodiesel.

Pertanto la transesterificazione enzimatica si propone come valida alternativa alla catalisi basica, dal momento che la temperatura di esercizio è compresa nel range di 30 - 40°C; le impurezze nell'olio come gli acidi grassi liberi e l'acqua non danno luogo ad interferenza nell'ambiente di reazione; con lipasi immobilizzata il recupero del catalizzatore è più agevole, facilitando anche la purificazione della fase esterea e del glicerolo prodotto. L'elevato costo del biocatalizzatore e i lunghi tempi di reazione per raggiungere elevate rese finali costituiscono gli aspetti meno vantaggiosi del processo. A questo scopo nella parte *IB* si intende esaminare il caso della transesterificazione enzimatica condotta con due diverse lipasi da *Pseudomonas cepacia*, su oli vegetali freschi ed esausti, con particolare riferimento all'alimentazione a *step* dell'etanolo, alla quantità di lipasi impiegata e al suo recupero e riutilizzo in nuovi cicli di reazione, all'impiego di diversi solventi per il lavaggio del biocatalizzatore.

*Parte IB*

## Parte IB: Transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti

### Capitolo 3B: Materiali e metodi

La parte *IB* di questo lavoro di ricerca affronta lo studio della transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti. Come descritto nel paragrafo 2.2, la fase sperimentale è contraddistinta da tre momenti: in *A* e *B* si studia ed esamina la transesterificazione di un olio vegetale fresco (FRIOL), catalizzata sia dalla Lipo *Pseudomonas cepacia* che dalla Epobond *Pseudomonas cepacia*, al variare di alcune condizioni: durata della reazione, quantità e stato del biocatalizzatore, numero di *steps* di alimentazione dell'etanolo, riutilizzo della lipasi in assenza di lavaggio e dopo lavaggio con acqua o esano. Le prove relative alla fase *C* impiegano due tipi di olio esausto UCO e WCO - le cui caratteristiche sono illustrate tra breve - ed estende così ai WCOs in generale lo studio della transesterificazione enzimatica, al variare della quantità di biocatalizzatore.

#### 3.1B: Materiali utilizzati

Nelle prove sperimentali delle fasi *A*, *B* e *C* sono state usate le seguenti sostanze:

- olio commerciale fresco FRIOL, costituito prevalentemente da olio di semi di girasole e da oli vegetali frazionati;
- UCO (*used cooking oil*): ottenuto a partire dal FRIOL fresco in seguito alla frittura a 190°C di patate fresche per 30 minuti. In questo modo si cerca di simulare un olio vegetale esausto di uso domestico;
- WCO (*waste cooking oil*): ottenuto dall'UCO dopo riscaldamento in forno a 250°C per due ore. Così si intende ottenere un olio esausto da ristorante, ritenendo che per

questi valori di temperatura, prossimi a quella di fumo, nell'olio si possano indurre le stesse alterazioni dovute all'uso prolungato e ripetuto degli oli nei ristoranti e catene *fast food*;

- etanolo prodotto dalla Fluka (purezza > 99,8%);
- due tipi di lipasi da *Pseudomonas cepacia*: Lipo (*P. cepacia* immobilizzata su resina di polistirene, in *cross-linking* col copolimero divinilbenzene) ed Epobond (*P. cepacia* legata covalentemente a un supporto costituito da una resina epossidica-acrilica), entrambe fornite dalla SPRIN Technologies di Trieste.

Ci si è avvalsi delle seguenti apparecchiature e strumentazione:

- pallone di vetro pirex da 250 ml, dotato di tappo e supporto;
- bilancia digitale Sartorius CP225D-OCE;
- bagno termico OSL-200 Grant;
- termocoppia pH 700, Eutech Instrument;
- HPLC costituito da: pompa Jasco PU-980, un rivelatore all'indice di rifrazione Jasco RI-930, un autocampionatore Jasco AS-1555, un degasatore Gastorr GT-103, un miscelatore Jasco LG-980-02, una colonna Alltech Adsorbosphere HS (C18);
- attrezzature varie e vetreria da laboratorio (micropipette Kartel da 1-10 ml, 20-200  $\mu$ L e 10-1000  $\mu$ L beakers, beute, beute codate, cilindri, essiccatore, stufa, ecc...);
- pompa da vuoto prodotta da KNF, modello N811KT.18;
- friggitrice De Longhi.

### **3.2B: Modalità di esecuzione delle prove**

Ciascuna prova delle fasi sperimentali *A*, *B* e *C* è articolata in due momenti:

1. preparazione dei campioni
2. esecuzione delle prove

### 3.2.1B Preparazione dei campioni

Per garantire una completa miscelazione del sistema reagente il pallone è stato riempito in modo tale che il livello della miscela di liquido non superasse il diametro massimo; da precedenti prove (Naccarato, 2012) si è valutato che la massa totale dovesse pesare circa 70 g. Quest'ultima è ottenuta dalla somma delle quantità dei reagenti (olio ed etanolo) e catalizzatore da caricare; fissata la quantità totale, si tiene conto delle percentuali ponderali della lipasi sull'olio - da valutare per ciascuna reazione come indicato nelle tabelle 2.8, 2.9 e 2.10 - e la percentuale massica di trigliceridi nel campione di olio, ottenuta dalla rielaborazione dei dati del cromatogramma di un campione di olio fresco FRIOL e riportata in tabella 2.1. Inoltre, si tiene conto del rapporto molare stechiometrico di alimentazione alcol:olio e dei valori dei pesi molecolari di ciascun composto. L'impostazione e la risoluzione del bilancio di materia sono riportati in dettaglio nella mia tesi specialistica e, qui di seguito nell'equazione 3B.1, si ricorda la formula per il calcolo delle moli di trigliceridi:

$$N_{tri} = \frac{M_{tot}}{\frac{MW_{tri}}{x} + \frac{y}{x} MW_{tri} + 3MW_{EtOH}}$$

equazione 3B.1

Dalle moli dei trigliceridi così calcolate, in ogni prova, si valuterà la massa di olio e di catalizzatore, il numero di moli e successivamente il volume dell'etanolo.

Le condizioni operative di ciascuna prova sono state determinate sulla base di alcune considerazioni: la temperatura di 37°C costituisce il valore medio del range di lavoro ottimale per le lipasi da *Pseudomonas cepacia* (35 - 40°C), e la velocità di agitazione di 200 rpm garantisce l'omogeneità del sistema senza compromettere la stabilità del biocatalizzatore immobilizzato, come individuato in un precedente lavoro sulla stessa

lipasi (Albo, 2013). Inoltre, la *Pseudomonas cepacia* mostra buone attività catalitiche senza solvente organico in soluzione (Liu et al., 2010), per cui si opta per l'alimentazione dell'alcol in diversi *steps* per scongiurare l'inibizione della lipasi e garantire migliori prestazioni del processo. Per la preparazione di ciascun campione nel pallone vengono caricati prima l'olio e poi il catalizzatore nelle quantità determinate dalla risoluzione del bilancio di materia per ogni valore del rapporto % catalizzatore-olio considerato. Il pallone, dotato di un tappo che evita l'eventuale fuoriuscita della miscela reagente, è posto nel bagno termostato (figura 3B.1) per 15 minuti e qui mantenuto alla temperatura di 37°C e alla velocità di agitazione di 100 rpm. In questo modo l'agitazione garantisce la dispersione del catalizzatore nell'olio (altrimenti la lipasi tenderebbe a sedimentare) e nello stesso tempo si raggiunge la temperatura di reazione. La misura della temperatura della miscela reagente è affidata ad una termocoppia. Nelle prove della fase C, prima della transesterificazione si ottengono i campioni di olio UCO e WCO, il primo dalla frittura di patate fresche per 30 minuti in friggitrice a 190°C, il secondo riscaldando l'UCO in stufa fino alla temperatura di 250°C per due ore.



figura 3B.1: Bagno termostato ed agitato per le prove di transesterificazione in catalisi enzimatica

### 3.2.2B Esecuzione delle prove

Al campione costituito da olio e catalizzatore, raggiunta la temperatura di 36,5°C, si aggiunge una quantità di etanolo complessiva pari a quella stechiometrica, ma in ogni caso si tiene conto del numero degli *steps* e della loro durata: ad esempio nelle prove in cui l'alcol è alimentato in 3 *steps* di uguale durata, al tempo iniziale si inietta 1/3 della quantità totale calcolata; in questo caso all'inizio di ogni *step* si introduce una quantità di etanolo relativa al rapporto molare alcol:olio di 1:1. Quindi in ogni sperimentazione è garantito il rapporto molare di alimentazione alcol:olio di 3:1, ma la quantità di alcol presente nell'ambiente di reazione dipende dal numero degli *steps* e dalla durata della reazione e, quindi, del singolo *step*. Alimentando l'etanolo al campione di olio e catalizzatore, si avvia la reazione e il pallone è riposto nel bagno termico, che continua a garantire una temperatura costante di 37°C, ma che è ora impostato ad una velocità di agitazione di 200 rpm. Tali condizioni operative, temperatura e velocità di agitazione, sono state scelte in seguito ad alcune prove preliminari nell'impianto considerato. Per ognuno degli *steps* i prelievi dei campioni, da 200 µl ciascuno, sono effettuati ad intervalli di tempo stabiliti: 0, 10, 20, 30, 60 e 100 minuti per le reazioni di durata pari a 5 ore; 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minuti per le reazioni di 9 ore. Si è evitato di prelevare dei campioni nei primi minuti della prova, dal momento che le lipasi tendono facilmente a sedimentare; infatti la sospensione dell'agitazione, sebbene per i pochi istanti necessari al prelievo, avrebbe falsificato la prova stessa, non essendo più garantita l'omogeneità delle condizioni dell'ambiente di reazione. La tendenza del catalizzatore a sedimentare velocemente fa sì che durante i prelievi la lipasi non si trovi in sospensione, prelevando in questo modo solo la fase liquida. E' importante che non vi siano particelle di catalizzatore nei vials contenenti i campioni da inviare alle successive analisi in HPLC, dal momento che queste potrebbero causare dei problemi di intasamento della colonna cromatografica. Si è calcolato che per prelievi di ciascun campione pari a 200 µl è trascurabile l'effetto della diminuzione di volume, dal momento che questa si mantiene al di sotto del 5%. Al termine di ciascuna prova il catalizzatore è separato dalla miscela reagita, versando il prodotto ottenuto in opportuno contenitore e lasciando il catalizzatore umido all'interno del pallone. Nelle prove che prevedono il riutilizzo del catalizzatore (prove "R"), si testerà la performance della lipasi senza lavaggio e dopo lavaggio con acqua o esano. Nel caso in cui si intende

valutare le prestazioni del biocatalizzatore senza lavaggio e purificazione (fase sperimentale *A*) prima del riutilizzo si aggiunge al catalizzatore umido nel reattore la quantità di olio per il successivo ciclo di reazione (prove “R1”) e al termine di questa si procede con la separazione del prodotto dal catalizzatore umido, al quale è aggiunta una piccola quantità di olio tale da ricoprire la lipasi nel pallone. Il motivo di ciò risiede nel fatto che la prova con lipasi fresca (“F”) è seguita subito dal primo riutilizzo (“R1”), mentre il secondo riutilizzo (“R2”) è effettuato il giorno seguente. Il reattore è posto nel bagno termico alle stesse condizioni di temperatura e velocità di agitazione per circa 12 ore; si è verificato che l’aggiunta di olio alla lipasi e l’agitazione della miscela evita che il catalizzatore si agglomeri o sedimenti; inoltre, non si verifica rilascio di enzima nell’olio (Lopresto, 2014). Le prove “R2” seguono lo stesso iter dei cicli “F” e “R1”. Nel caso delle prove con riutilizzo delle lipasi lavata con esano o acqua (fase sperimentale *B*, prove dalla #16 alla #21) si procede con la filtrazione della miscela prodotta e rimasta sul catalizzatore e poi il lavaggio vero e proprio utilizzando 20 ml di esano e ripetendo l’operazione tre volte. Quando il solvente è stato filtrato, si ripone la lipasi in una navicella posta all’interno di un essiccatore, attraverso cui far allontanare dalla lipasi le ultime quantità di solvente. Utilizzando acqua distillata (fase sperimentale *B*, prove dalla # 26 alla #28, e #29 con esano) per la pulizia della lipasi, l’essiccamento ha luogo a temperatura ambiente; si è osservata una perdita di circa il 5% di catalizzatore durante il lavaggio e prima del riutilizzo.

Diversi riferimenti in letteratura evidenziano la necessità di lavare con acetone le lipasi dopo la transesterificazione e prima di essere riutilizzate in successivi cicli di reazione. Ad esempio, Wu et al. (2004) hanno verificato che soprattutto il glicerolo e l’olio non reagito aderiscono alla lipasi durante la reazione, perciò hanno impiegato proprio dell’acetone per il lavaggio del catalizzatore prima del successivo riutilizzo. Li et al. (2006) hanno invece constatato che l’utilizzo del tert-butanolo come solvente consente al glicerolo prodotto dalla reazione di non aderire sulla superficie catalitica e per questo motivo non hanno previsto metodi di purificazione della lipasi prima del suo riuso. Invece si è ottenuto che il lavaggio della lipasi con un solvente non polare come l’esano causa una brusca diminuzione dell’attività catalitica (Bajaj et al., 2010). L’attività dell’enzima diminuisce per il riutilizzo a causa del desorbimento, dell’inattivazione del supporto e del prodotto di inibizione; in questa sede si vuole verificare se il lavaggio

con un solvente consente di ottenere un biocatalizzatore purificato in grado di essere reimpiegato in successivi cicli di reazione e la differenza di prestazioni della lipasi, se lavata con solvente polare o apolare. Attraverso indagini preliminari si era anche verificata la possibilità di separare il biocatalizzatore mediante filtrazione ed effettuare un successivo lavaggio con acetone. Si è visto, però, che, con gli stessi filtri utilizzati nelle altre prove, la lipasi aderiva alle superfici filtranti. Per questo motivo l'ipotesi della filtrazione, seguita dal lavaggio con acetone, come tecnica di separazione è stata scartata in questa sede.

### 3.3B Analisi in HPLC e metodo di rielaborazione dei dati

I campioni prelevati sono analizzati in HPLC secondo il metodo presentato nel capitolo 3A, ma diversa è la fase di preparazione dei campioni: questi sono diluiti con 1 ml di acetone e posti nell'autocampionatore, anziché iniettarli manualmente. Anche in questo caso si prevede di analizzare periodicamente i campioni di standard di gliceridi ed esteri, per confrontare i tempi di eluizione misurati di volta in volta con quelli delle analisi iniziali a colonna pulita; un eventuale ritardo è da attribuire ad un parziale intasamento della colonna, che sarà ripulita in *backflush*. Si riportano di seguito i cromatogrammi relativi ad un campione di olio fresco Friol, uno di UCO e infine di WCO, dal quale si osserva che tali oli sono costituiti principalmente da trigliceridi, mentre la percentuale dei digliceridi e monogliceridi è maggiore negli esausti in cui è avvenuta già una parziale degradazione dell'olio, quindi dei trigliceridi, di partenza.

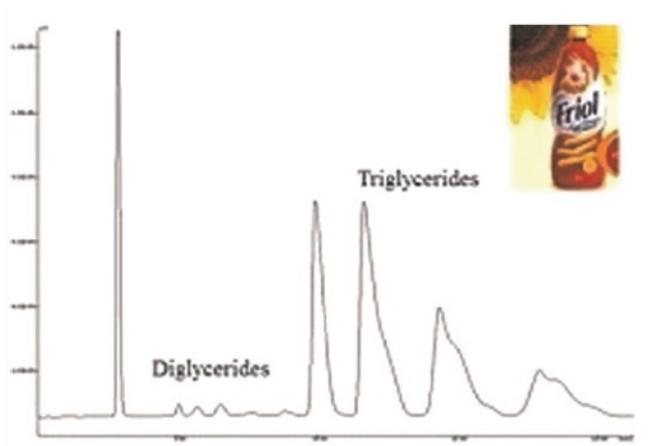


figura 3B.2: Cromatogramma di un campione di olio fresco Friol

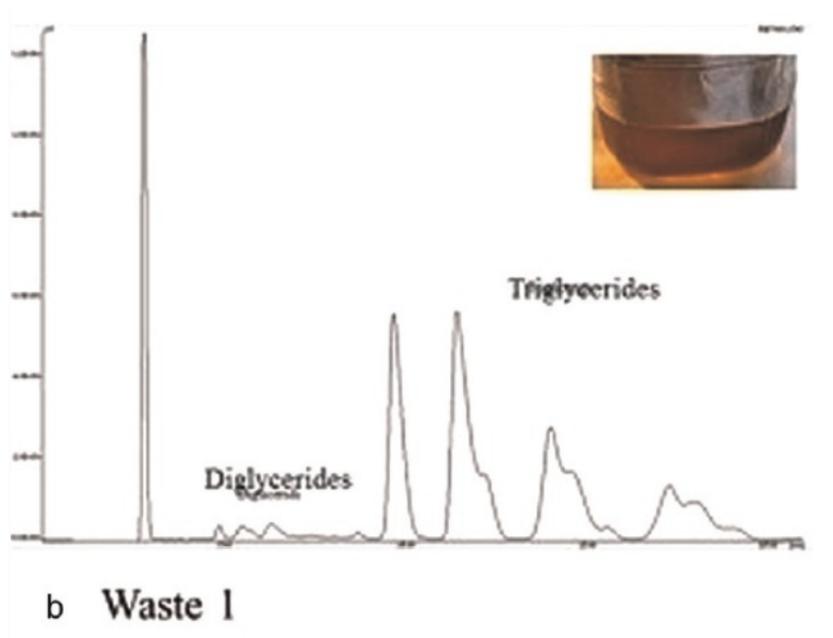


figura 3B.3: Cromatogramma di un campione di olio esausto UCO

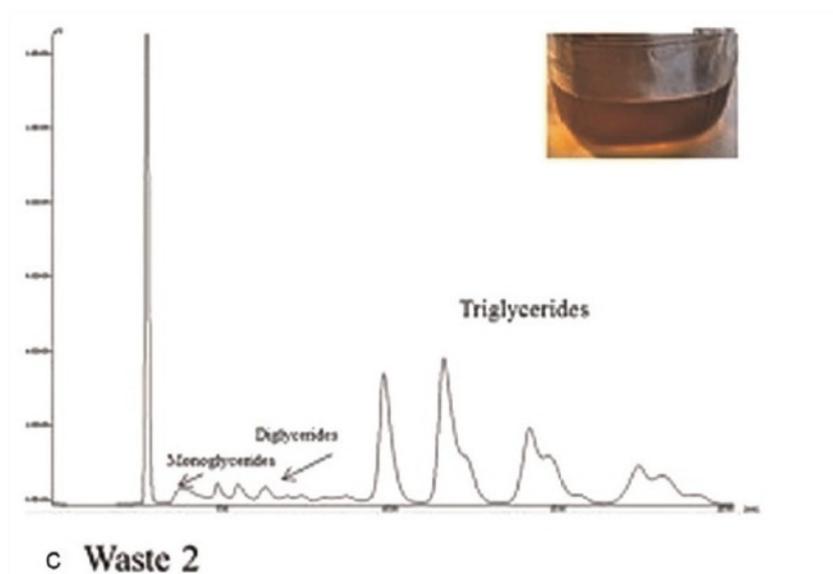


figura 3B.4: Cromatogramma di un campione di olio esausto WCO

Un cromatogramma su un campione di miscela dopo 60 minuti di reazione si presenta nel seguente modo:

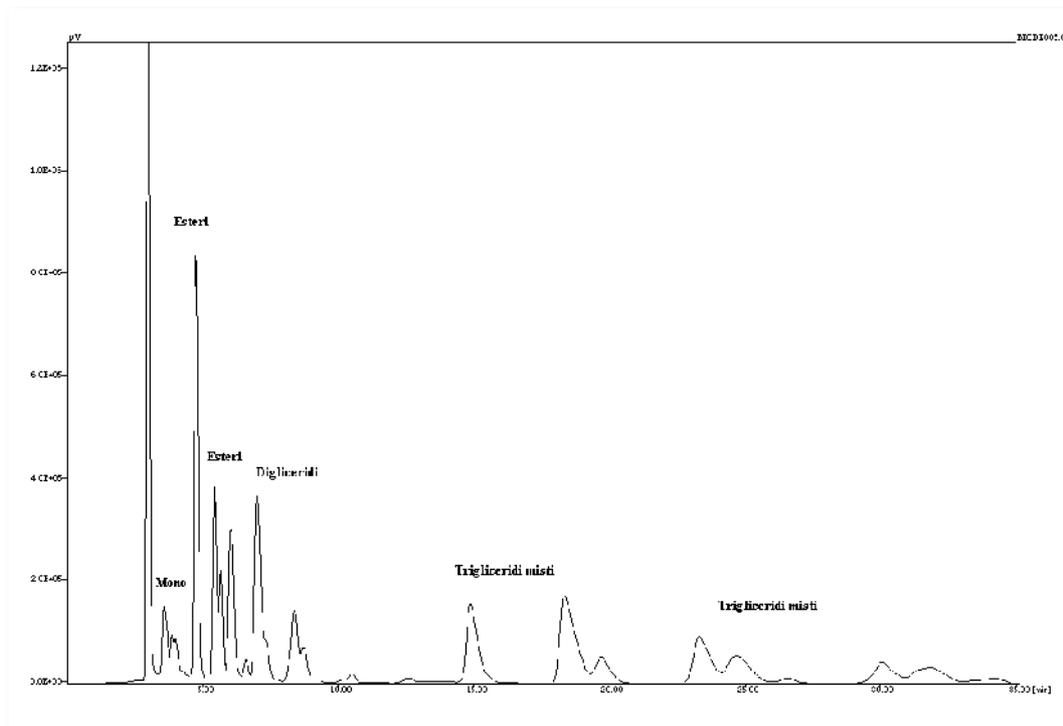


figura 3B.5: Campione di miscela dopo 60 min di reazione (prova #4: 3% cat/olio, F, 1°step, olio fresco Friol)

Si distinguono in figura 3B.5 i diversi picchi caratteristici: monogliceridi, diversi tipi di esteri (linoleato, oleato, palmitato e stearato), digliceridi e i trigliceridi misti. Questi ultimi sono caratterizzati da un intervallo dei tempi di uscita piuttosto ampio, pari a circa 20 minuti. Come si è illustrato nel capitolo 3A, la conferma di queste deduzioni è stata ottenuta confrontando la sequenza dei cromatogrammi dei campioni dell'olio e dei prodotti di reazione ai diversi tempi, insieme con i cromatogrammi degli standard di alcuni gliceridi ed esteri.

L'integrazione dell'area sottesa ad ogni picco è manuale e da questa si ottiene il corrispondente valore della percentuale del componente *i*-esimo su base massica (%w/w). In base alle caratteristiche della colonna utilizzata i composti analizzabili sono quelli appartenente alla "frazione lipidica", cioè i gliceridi e gli esteri. Per ottenere informazioni riguardo alla quantità di etanolo residuo e glicerolo prodotto si scriveranno e risolveranno, per ogni *step* e tempo, dei bilanci di materia. Si assume una base di calcolo di 100 g di frazione lipidica e, dai dati di %w/w dei gliceridi e degli esteri, si calcola il corrispondente valore della massa e delle moli, considerati i pesi molecolari riportati in tabella 2.3. Considerato il numero degli *steps* per una data prova, si scrive il

bilancio di materia per l'etanolo e il glicerolo, da cui si ricavano le moli e poi le masse di tali composti. Nelle equazioni seguenti si considera il caso dell'alimentazione dell'alcol in tre momenti di uguale durata:

Etanolo

1° step)

$$N_{EtOH}(t) = N_{EtOH}(t=0) |_{1^{\circ}step} - [N_{est}(t) - N_{est}(t=0) |_{1^{\circ}step}]$$

*equazione 3B.2*

2° step)

$$N_{EtOH}(t) = [ N_{EtOH} |_{residue, 1^{\circ}step} + N_{EtOH}(t=0) |_{2^{\circ}step} ] - [N_{est}(t) - N_{est}(t=0) |_{2^{\circ}step}]$$

*equazione 3B.3*

3° step)

$$N_{EtOH}(t) = [ N_{EtOH} |_{residue, 2^{\circ}step} + N_{EtOH}(t=0) |_{3^{\circ}step} ] - [N_{est}(t) - N_{est}(t=0) |_{3^{\circ}step}]$$

*equazione 3B.4*

Glicerolo:

1° step)

$$N_{gli}(t) = [N_{tri}(t=0) - N_{tri}(t)]|_{1^{\circ}step} + [N_{di}(t=0) - N_{di}(t)]|_{1^{\circ}step} + [N_{mono}(t=0) - N_{mono}(t)]|_{1^{\circ}step}$$

*equazione 3B.5*

2° step)

$$N_{gli}(t) = N_{gli,residue\ 1^{\circ}step} + [N_{tri}(t=0) - N_{tri}(t)]|_{2^{\circ}step} + [N_{di}(t=0) - N_{di}(t)]|_{2^{\circ}step} + [N_{mono}(t=0) - N_{mono}(t)]|_{2^{\circ}step}$$

*equazione 3B.6*

3° step)

$$N_{gli}(t) = N_{gli,residue\ 2^{\circ}step} + [N_{tri}(t=0) - N_{tri}(t)]|_{3^{\circ}step} + [N_{di}(t=0) - N_{di}(t)]|_{3^{\circ}step} + [N_{mono}(t=0) - N_{mono}(t)]|_{3^{\circ}step}$$

*equazione 3B.7*

A questo punto si ha un quadro completo delle moli e le quantità in peso di tutti i componenti ad ogni istante di tempo considerato, nonché la massa totale di ciascun campione. Si intende, inoltre, valutare la concentrazione molare  $C$  [mol/l] di ciascun componente, considerando la densità di 920 g/l, calcolata come la media aritmetica dei valori di densità iniziale e finale. Si calcola anche una resa finale della transesterificazione ( $y$  %), in analogia con quanto fatto in catalisi basica e quindi in linea con i parametri calcolati dalle normative europee ed americane, qui definita come

il rapporto tra la massa esterea prodotta e la massa totale del campione, come risulta nell'equazione 3B.8:

$$y\% = \frac{m_{est,prod}}{m_{tot,camp}}$$

*equazione 3B.8*

In questo caso si produce una miscela di estere etilici (FAEEs), anziché metilici (FAMEs), per cui la valutazione della resa è ottenuta solo da analisi in cromatografia liquida, ma non è confrontabile con i valori ricavabili dal Gas Cromatografo, dal momento che il metodo UNI EN 14214, nelle condizioni della strumentazione utilizzata, è strettamente previsto per gli esteri metilici.

I dati rielaborati, presentati e discussi nel capitolo 4B e in *Appendice IB*, sono presentati in grafici e tabelle, in cui si intende analizzare e confrontare l'evoluzione temporale della reazione nelle diverse condizioni esaminate. Queste, illustrate già nelle tabelle 2.8 - 2.9 - 2.10, sono sinteticamente riassunte in ciascun grafico per una più agevole lettura e comprensione.

Con le prove delle fasi sperimentali *A*, *B* e *C* si intende valutare, oltre alla performance di ciascuna reazione, l'influenza dei seguenti fattori: la quantità catalizzatore/olio, la tipologia di lipasi e la possibilità di riciclo, la tipologia di olio.

## *Parte IB: Transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti*

### **Capitolo 4B: Risultati**

In questo capitolo si presentano i dati, e la loro rielaborazione e discussione, relativi alle prove sperimentali delle fasi *A*, *B* e *C* della transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti, così come indicato nel paragrafo 2.2. Per ciascuna fase si riporta l'elenco delle prove numerate, specificandone le condizioni operative in termini di tipo di olio e di lipasi, durata della transesterificazione, stato (fresco o riutilizzato) e quantità dell'enzima, e numero di *steps* di alimentazione dell'etanolo. Questi rappresentano i parametri rispetto ai quali si valuterà qui la performance della reazione in catalisi enzimatica. I dati in cromatografia liquida sono stati ottenuti secondo il metodo implementato e presentato nel capitolo 3A, mentre la loro rielaborazione è stata esposta nel capitolo 3B. Si riportano ora i risultati ricavati, mostrati in grafici a dispersione ed istogramma, per le prove più significative. Di tutte le prove si presentano risultati e confronti in *Appendice IB*. Come precedentemente affermato, tutte le prove sono state condotte in doppio.

#### **4.1B Fase sperimentale A**

Le prove sperimentali della fase *A* sono condotte con la Lipo *Pseudomonas cepacia* su olio vegetale fresco FRIOL, la cui composizione è stata riportata nella tabella 2.1, ed etanolo alimentato in tre *steps* consecutivi dalla durata di 100 o 180 minuti, nella reazione di transesterificazione a 5 o 9 ore rispettivamente. Si richiama e si riporta qui la tabella 2.8 per una lettura più agevole e chiara dell'elenco delle prove con relative condizioni operative:

Fase sperimentale A (FRIOL, lipo <i>P. cepacia</i> )				
Prova	durata [h]	stato enzima	quantità enzima [%w/wolio]	N° steps alimentazione alcol
<b>1</b>	5	F, fresco	1%	3
<b>2</b>	5	R1, riutilizzato da #1 (senza lavaggio)	1%	3
<b>3</b>	5	R2, riutilizzato da #2 (senza lavaggio)	1%	3
<b>4</b>	5	F, fresco	3%	3
<b>5</b>	5	R1, riutilizzato da #4 (senza lavaggio)	3%	3
<b>6</b>	5	R2, riutilizzato da #5 (senza lavaggio)	3%	3
<b>7</b>	5	F, fresco	5%	3
<b>8</b>	5	R1, riutilizzato da #7 (senza lavaggio)	5%	3
<b>9</b>	5	R2, riutilizzato da #8 (senza lavaggio)	5%	3
<b>10</b>	9	F, fresco	1%	3
<b>11</b>	9	F, fresco	3%	3
<b>12</b>	9	F, fresco	5%	3

tabella 2.8: Prove sperimentali della fase A

In un primo momento si considerano le prove dalla #1 alla #9, dalla durata complessiva di 5 ore e caratterizzate dall'alimentazione dell'alcol in tre diversi momenti (0, 100 e 200 minuti), diversa quantità di biocatalizzatore (1%, 3% e 5%w/w) e stato dell'enzima (fresco, riutilizzato R1, separato e riutilizzato nuovamente in un ultimo ciclo di reazione R2). Per le prove "R" non è previsto il lavaggio del catalizzatore, ma si provvede a separare la miscela prodotta e reimpiegare la lipasi "umida" in nuovi cicli di reazione, così come illustrato nel paragrafo 2.2. Le prove successive, dalla #10 alla #12, così come quelle delle fasi sperimentali **B** e **C**, sono state condotte mesi dopo e, perciò, si è testata nuovamente l'attività catalitica della lipasi e si è valutato di portare il tempo di reazione a 9 ore.

Prove sperimentali 1 - 9

Per questo gruppo di prove in prima istanza si riportano i dati rielaborati relativi alla #1, in cui con le frecce si indicano i momenti di alimentazione dell'etanolo. Nei successivi grafici queste si ometteranno, ma in ogni caso si farà riferimento al numero della prova e alle indicazioni della tabella per indicare il numero e la durata di ciascuno *step*.

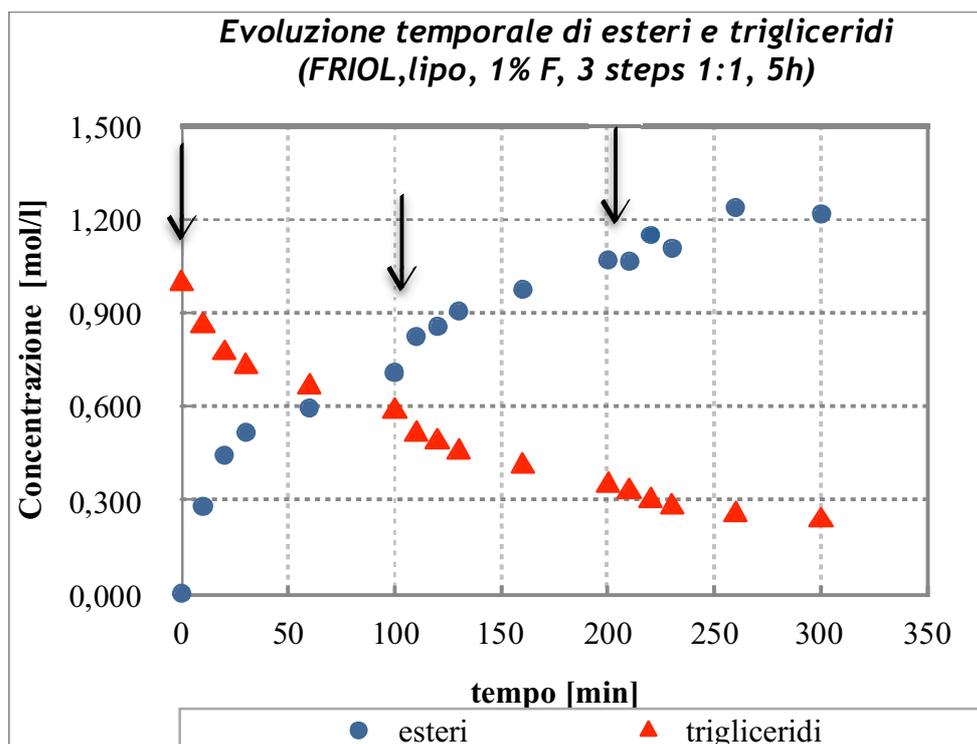


figura 4B.1: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #1)

La composizione dell'olio fresco FRIOL è nota già dalle analisi relative alla parte IA e ripetute anche in queste sede: i trigliceridi costituiscono il 97 - 98 % w/w dell'olio impiegato, la restante parte è costituita da digliceridi e monogliceridi in piccole quantità. I dati ottenuti dalle analisi cromatografiche (HPLC) sono espressi in termini di percentuali ponderali (%w/w) sulla frazione lipidica; tramite la rielaborazione illustrata nel capitolo 3B si calcolano le loro concentrazioni e, dai bilanci di materia per ciascuno *step*, anche le moli e, quindi, le concentrazioni di glicerolo prodotto ed etanolo residuo. Dalla figura 4B.1 si vede che il consumo dei trigliceridi e la successiva formazione degli esteri procede secondo il tipico andamento della transesterificazione in catalisi enzimatica con alimentazione a *step* dell'alcol, mostrata nel capitolo 2. Nel primo *step* è significativo l'aumento della concentrazione della miscela di esteri, che continueranno a

formarsi anche nel secondo e terzo *step*, sebbene in misura minore. Nel primo e nel secondo *step* non si raggiunge una condizione di plateau per la concentrazione di esteri, mentre con buona approssimazione si può ritenere che nel terzo stadio in queste condizioni non possano più formarsi altre molecole di esteri, la cui concentrazione si assesta attorno al valore di 1,2 mol/l. Perciò, è interessante riportare l'andamento degli esteri insieme con tutti i gliceridi e il glicerolo calcolato, come riportato in figura 4B.2:

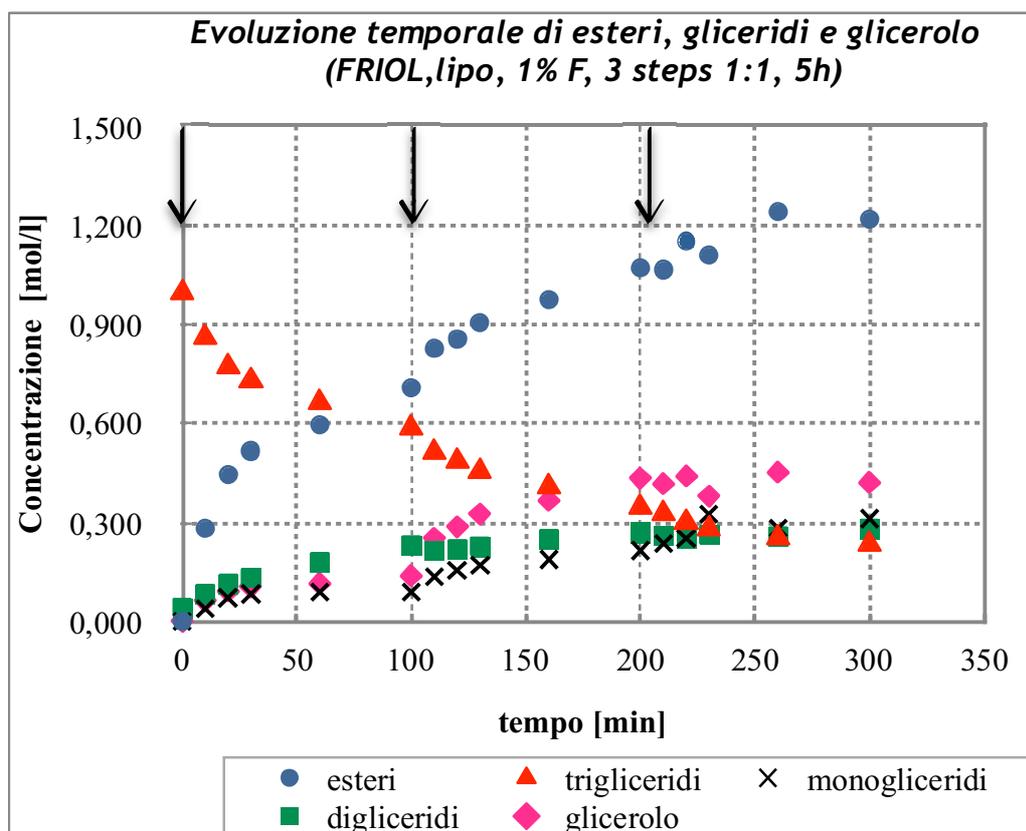


figura 4B.2: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #1)

I trigliceridi si decompongono in digliceridi, e questi successivamente in monogliceridi, in tutti e tre gli *steps*, ma in misura maggiore nel primo *step*. I digliceridi continuano a formarsi durante il corso della reazione, rallentando poi nel terzo *step*. I monogliceridi mostrano un aumento di concentrazione in tutti e tre gli *steps*, anche nell'ultimo. Per il glicerolo si sono calcolate le moli e poi i valori di concentrazione in tutti gli istanti di tempo e *steps* considerati, ottenendosi un andamento crescente lungo il corso della reazione. Il glicerolo, sottoprodotto della transesterificazione, ottenuto dalla reazione tra monogliceridi e alcol, è legato alle moli di monogliceridi convertite direttamente

dall'ultima reazione e di conseguenza alle moli dei digliceridi e trigliceridi reagiti, così come gli esteri prodotti sono legati alle moli dei gliceridi convertiti. La figura 4B.3 fotografa istante dopo istante l'andamento temporale dei digliceridi, monogliceridi e glicerolo, mentre la 4B.4 mostra l'evoluzione della concentrazione di etanolo dai valori calcolati dalla risoluzione del bilancio di materia, presentato nel capitolo 3B:

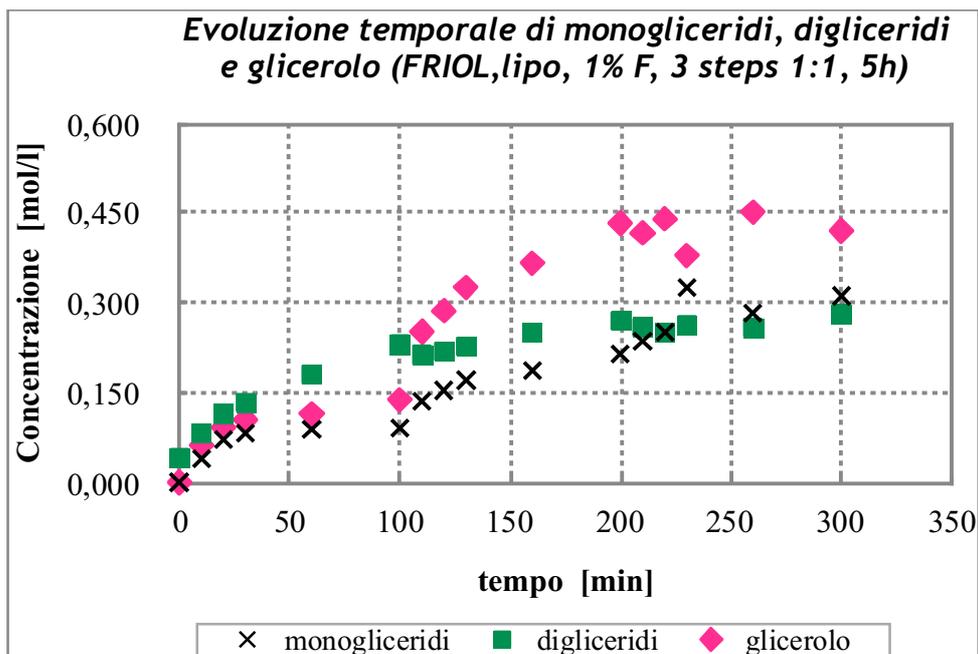


figura 4B.3: Andamento temporale di glicerolo, digliceridi e monogliceridi (prova #1)

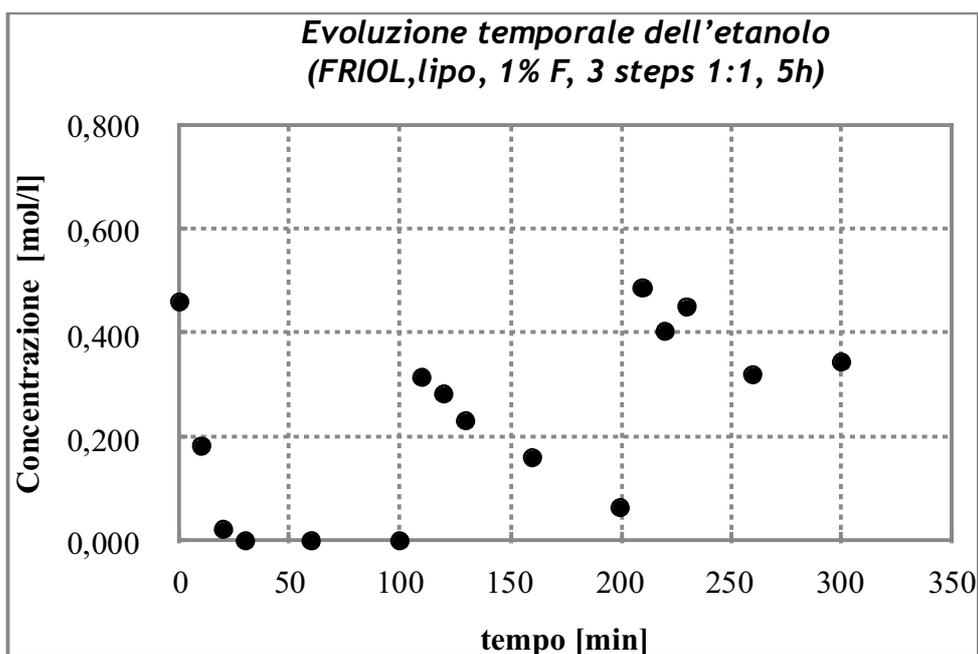


figura 4B.4: Andamento temporale dell'etanolo (prova #1)

In ogni *step* si rileva un andamento decrescente della concentrazione di etanolo, in misura più marcata nel primo *step*, lineare nel secondo stadio e poco accentuata nel terzo e ultimo *step*. La reazione di transesterificazione è più veloce soprattutto nei primi 30 minuti di reazione, come si evince dagli andamenti di esteri prodotti e dei gliceridi misurati in figura 4B.2; di conseguenza anche le concentrazioni di glicerolo ed etanolo confermano questi risultati. Inoltre, l'alimentazione a *step* dell'alcol consente di limitare l'effetto inibitorio sulla lipasi, garantendo la quantità di alcol necessaria alla transesterificazione, anche se in rapporto di 1:1 (in difetto rispetto allo stechiometrico di 3:1). Tuttavia il glicerolo prodotto durante la reazione e l'alcol presente negli istanti prima che questo reagisca, causano una parziale inibizione del biocatalizzatore, determinando una riduzione della velocità di reazione o un arresto della transesterificazione.

Riguardo alla figura 4B.4 si vuole precisare che le concentrazioni molto basse o nulle di etanolo nell'ambiente di reazione possono riferirsi sia ad una condizione di effettivo consumo di alcol impiegato per l'etanolisi dell'olio, sia alle approssimazioni legate al bilancio di materia sull'etanolo stesso.

All'inizio di ogni *step* si alimenta la stessa quantità di alcol, qui pari a 1/3 di quello stechiometrico e garantendo un rapporto molare di alimentazione pari a 1:1; nel secondo e nel terzo *step* non si prelevano campioni all'istante iniziale di reazione (cioè a 100 e 200 minuti), perché questi valori sono già ottenuti al termine dello *step* precedente a quello in esame e anche perché l'alcol alimentato deve essere subito sottoposto ad agitazione in modo da massimizzare l'interfaccia alcol-olio nella reazione di transesterificazione. In caso contrario si otterrebbe una miscela liquida bifasica. Pertanto i campioni sono prelevati dopo 10 minuti dall'inizio del secondo e terzo *step* e tengono perciò conto del consumo di alcol in questo intervallo di tempo.

La prova #1, effettuata con quantità di lipasi pari all'1% w/w, fornisce perciò importanti informazioni: la transesterificazione procede velocemente nel primo *step*, rallentando nel secondo ma soprattutto nel terzo *step*. Ciò nonostante, la produzione degli esteri continua secondo un andamento crescente tipico della catalisi enzimatica con alimentazione a *step* dell'alcol; si misurano valori di concentrazione finale molto vicini nei gliceridi non convertiti; il glicerolo prodotto e l'etanolo residuo al termine della reazione sono presenti in quantità maggiori rispetto ai gliceridi dopo 5 ore di transesterificazione.

Conclusasi la reazione, si procede con la separazione della miscela reagita e il recupero della lipasi, da reimpiagare in successivi cicli di reazione senza che si effettui un lavaggio degli eventuali componenti trattenuti sull'enzima; in questa prima fase si vuole valutare la performance del biocatalizzatore non lavato in successivi cicli di reazione, nelle prove #2 e #3, nelle stesse condizioni operative della #1. Nella figura 4B.5 si riportano i risultati relativi agli andamenti degli esteri per le tre prove, mentre le concentrazioni di tutti i composti della transesterificazione sono riportate nel dettaglio nei grafici in *Appendice IB*.

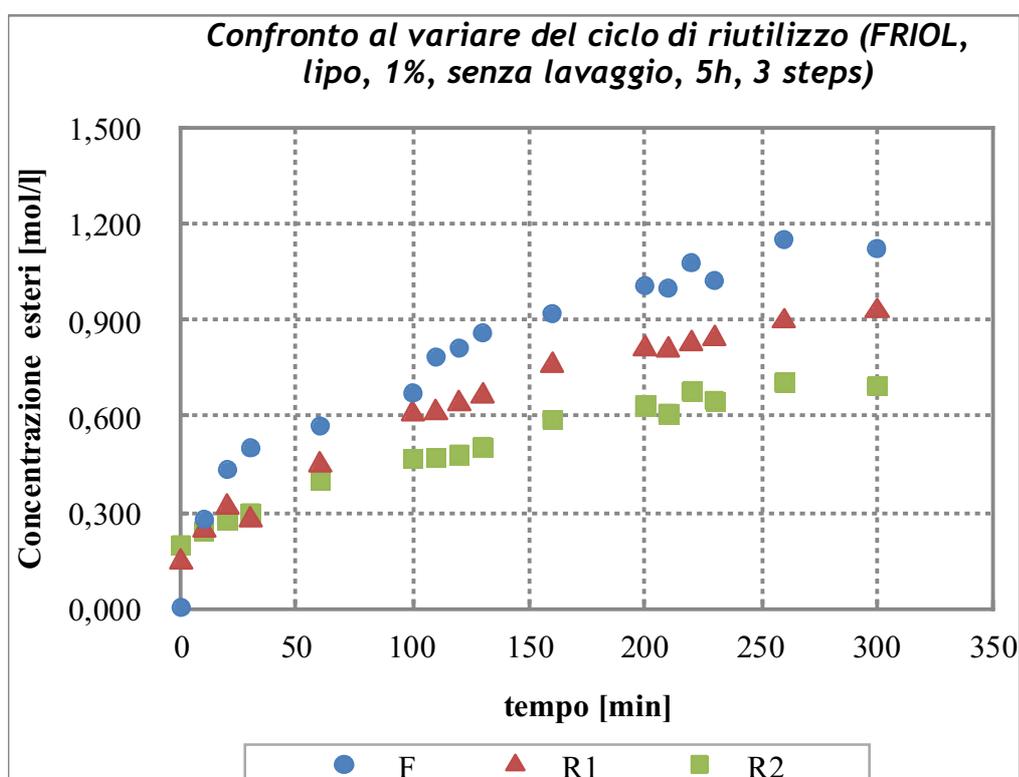


figura 4B.5: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del ciclo di riutilizzo (prove #1, #2 e #3)

La prova #2, indicata con la sigla "R1", mostra come inizialmente sulla lipasi e, quindi nell'ambiente di reazione, si trovi una quantità di esteri residua dalla #1. Alimentando l'etanolo all'inizio di ciascuno *step* si avvia la reazione che, sebbene proceda verso la formazione degli esteri, mostra una velocità di reazione e una quantità minore degli esteri prodotti ad ogni istante considerato. Inoltre, il valore effettivo degli esteri prodotti è inferiore a quello misurato e mostrato nel grafico 4B.5, dal momento che quest'ultimo è ottenuto dalla somma di quello prodotto dalla reazione in corso e della concentrazione

di esteri residui inizialmente presente. Analoghe considerazioni possono farsi per la prova #3, identificata anche dalla sigla “R2”, in cui la lipasi, oltre ad essere al suo terzo utilizzo, è stata sottoposta a 12 ore di agitazione in olio prima di essere reimpiegata. Su questa si presenterà l’effetto combinato di quantità residuali dei vari componenti dalle prove #1 e #2, l’azione inibitoria dell’etanolo alimentato nei vari momenti ed eventualmente lo stress legato all’agitazione nel bioreattore. In questa ultima prova la transesterificazione procede, ma producendo quantità contenute di esteri e convertendo parzialmente i gliceridi. Attraverso il calcolo della resa secondo il metodo proposto nel capitolo 3B, cioè valutata come il rapporto tra la massa di esteri prodotti e quella del campione analizzato, si possono rivedere e confrontare su base quantitativa le considerazioni appena presentate in forma grafica:

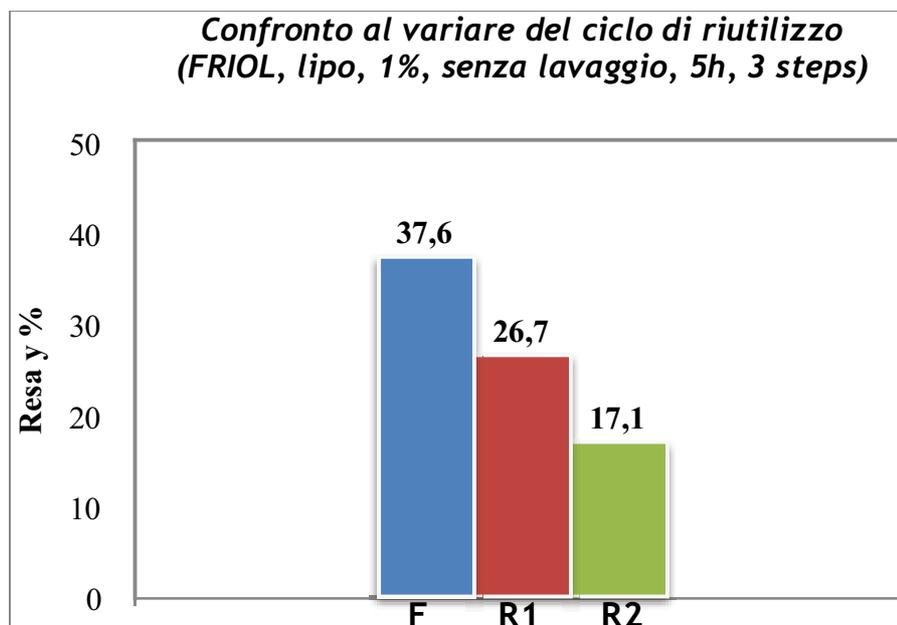


figura 4B.6: Confronto dei valori di resa al variare del ciclo di riutilizzo (prove #1, #2 e #3)

La sostanziale riduzione del valore di resa, e quindi della concentrazione di esteri, è evidente già passando dalla transesterificazione con catalizzatore fresco (“F”) al primo ciclo di riutilizzo (“R1”). Ciò suggerisce di prevedere il lavaggio della lipasi con un opportuno solvente prima di poter essere impiegata in nuove prove di transesterificazione. Inoltre, nella prova #3 (“R2”) la riduzione nelle prestazioni della lipasi nella transesterificazione in queste condizioni è ancora più marcato, rafforzando la necessità di una procedura accurata di separazione dei componenti dall’enzima e sua

successiva purificazione. Come si è già evidenziato, uno *step* della durata di 100 minuti nelle condizioni presentate non garantisce il raggiungimento del plateau per la produzione degli esteri con quantità di lipasi pari all'1% w/w. Perciò si vuole effettuare una serie di prove con quantità maggiori di enzima, in analogia al ciclo di prove #1, #2, #3. Le figure 4B.7-8-9, relative alla prova #7, descrivono l'andamento della transesterificazione nelle stesse condizioni della #1, ma con quantità differente di catalizzatore:

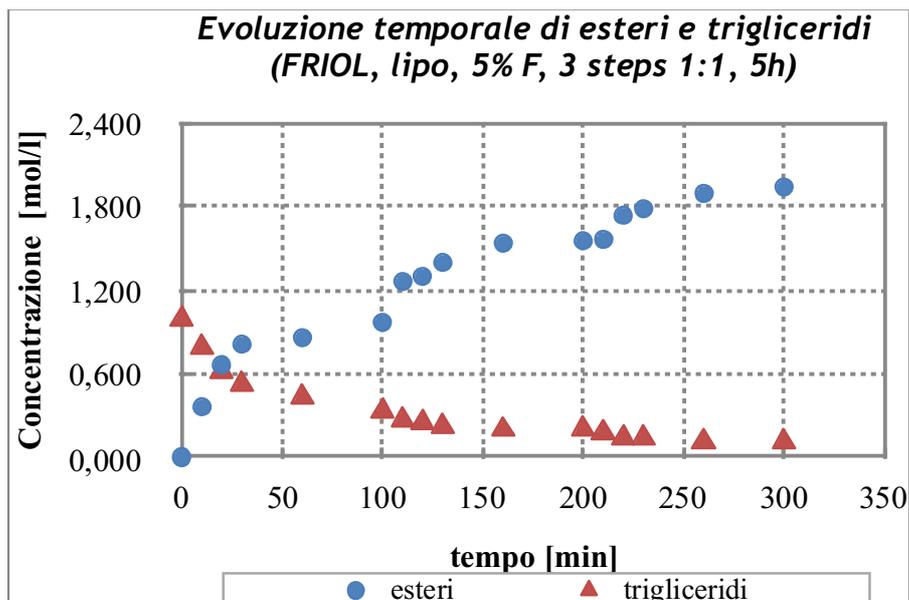


figura 4B.7: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #7)

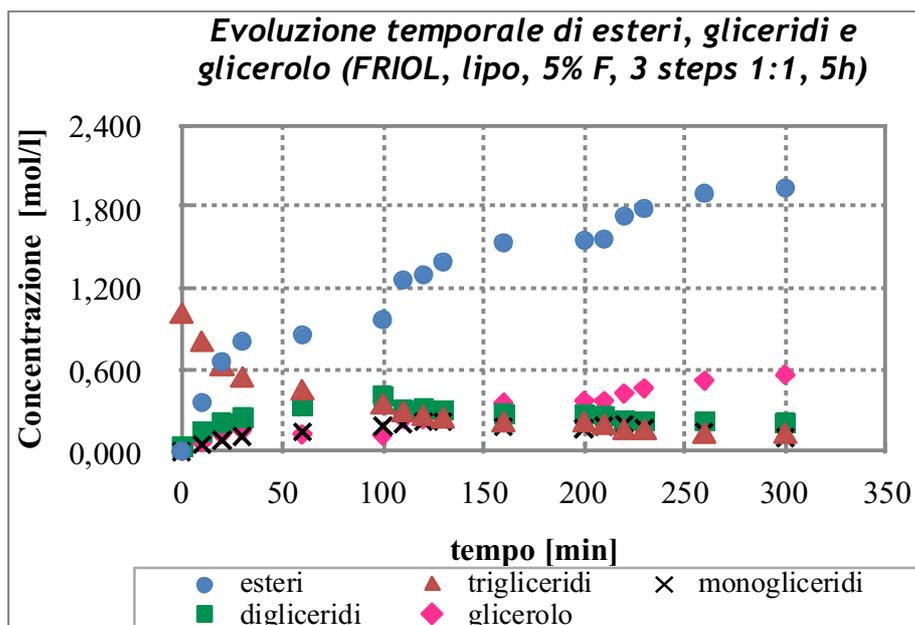


figura 4B.8: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #7)

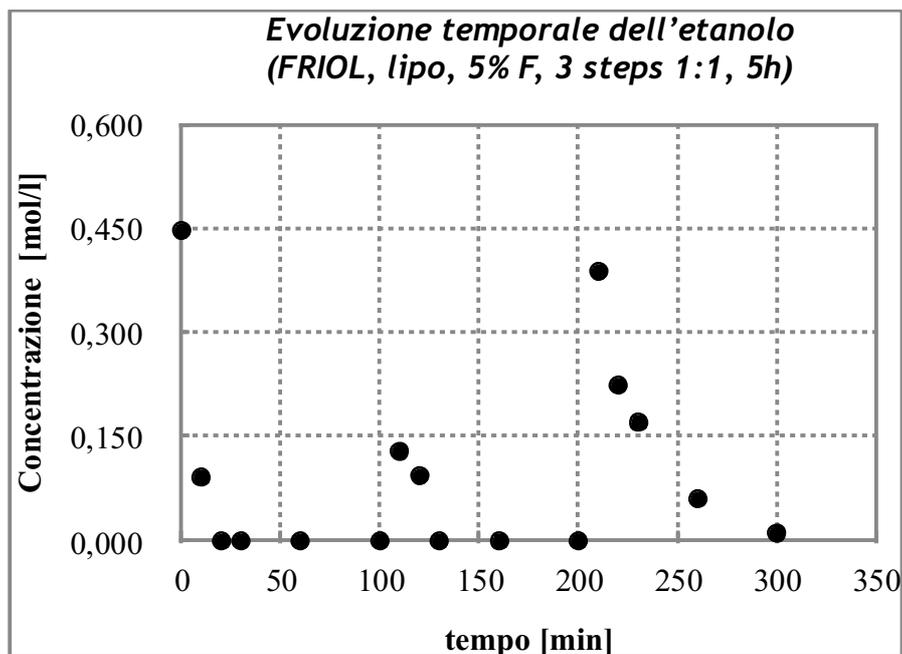


figura 4B.9: Andamento temporale dell'etanolo (prova #7)

Con il 5% w/w di lipasi nel reattore la transesterificazione procede velocemente soprattutto nei primi 30 minuti del primo *step*, ma continua secondo un andamento crescente anche successivamente nel secondo e terzo *step*. Pur non essendo raggiunta una condizione di plateau della concentrazione degli esteri, condizione per la quale non si riterrebbe necessario far proseguire la reazione, in queste figure si osserva che la quantità di esteri prodotta, espressa in termine di concentrazione molare, è significativamente alta se confrontata alla concentrazione dei trigliceridi in figura 4B.7, ma anche dei digliceridi e monogliceridi in figura 4B.8. In particolare in quest'ultima figura si può analizzare l'andamento complessivo della performance della transesterificazione enzimatica in termini di esteri prodotti e gliceridi consumati in prima analisi: i trigliceridi sono convertiti rapidamente nel primo *step* in esteri e digliceridi; questi si formano velocemente nel primo *step*, decomponendosi in esteri e monogliceridi e presentando al termine di questo momento una concentrazione residua maggiore di quella dei trigliceridi non convertiti. Nel secondo *step* i trigliceridi presenti nell'ambiente di reazione, reagendo con l'etanolo alimentato in rapporto stechiometrico 1:1, si convertono così come i digliceridi e i monogliceridi. Tale situazione si registra anche nel terzo *step*, al termine del quale sono piuttosto bassi i valori di concentrazione dei gliceridi, soprattutto trigliceridi e monogliceridi, convertiti in esteri principalmente e glicerolo; l'andamento di quest'ultimo composto è crescente lungo il corso della

reazione. Dallo studio dell'andamento temporale di questi composti insieme con quello dell'etanolo, presentato in figura 4B.9, si può dedurre che la reazione di transesterificazione è caratterizzata da una significativa produzione di esteri, ottenuti dalla conversione dei gliceridi che ha determinato la formazione del glicerolo come sottoprodotto in rapporto molare con gli esteri di poco superiore al valore di 3:1 (valore stechiometrico). Il consumo calcolato di etanolo mostra che in ciascuno *step* si converte tutto l'etanolo alimentato, con velocità decrescente procedendo dal primo all'ultimo stadio. Pur alimentando la stessa quantità di alcol all'inizio di ciascuno *step* (valore relativo al tempo  $t=0$ , cioè all'inizio della reazione) e consumandosi l'alcol al termine del primo e secondo *step*, dal grafico 4B.9 si osserva che già a 10, 110 e 210 minuti i valori della concentrazione di etanolo sono significativamente diversi: più basso a 10 minuti, di poco più alto a 110 minuti e più del doppio a 210 minuti. Da ciò si evince che la reazione procede con un consumo di alcol soprattutto nei primi minuti, così come in ciascuno *step* di reazione, ma gli andamenti decrescenti sono diversi.

Anche in questo caso si riutilizza il catalizzatore in successivi cicli di reazione senza lavaggio nelle prove #8 e #9; l'evoluzione degli esteri di queste prove e della #7 sono riportate nella figura 4B.10:

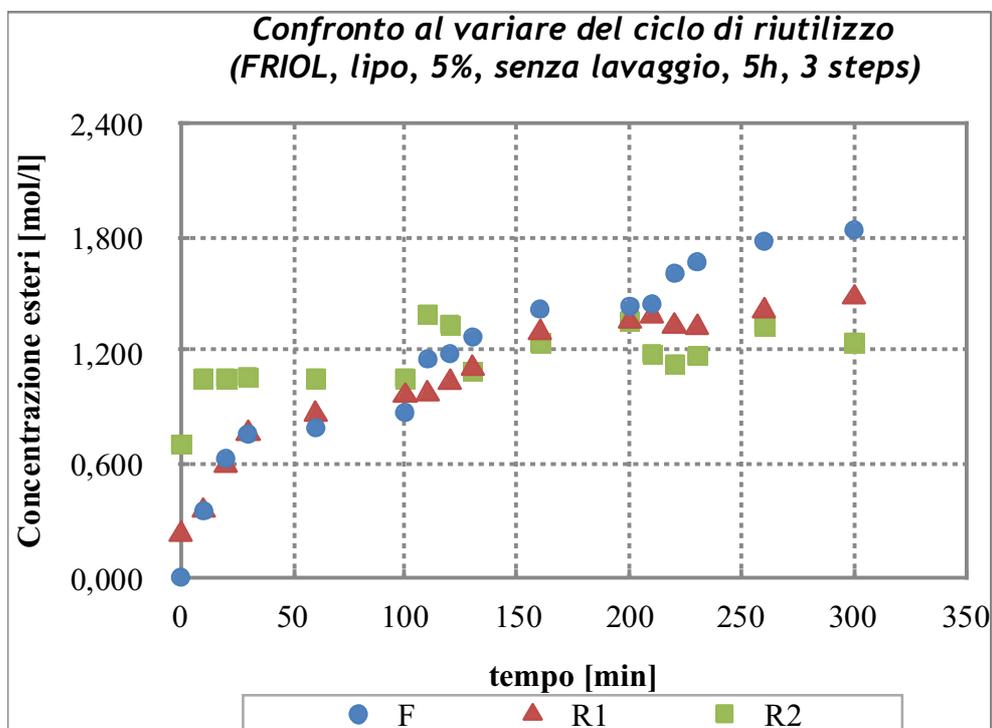


figura 4B.10: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del ciclo di riutilizzo (prove #7, #8 e #9)

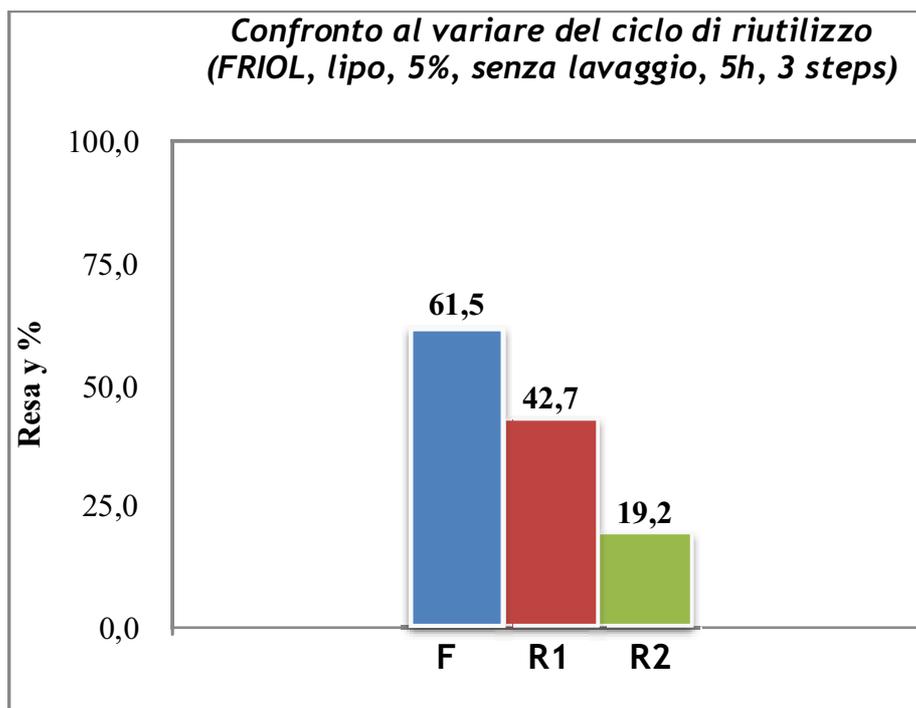


figura 4B.11: Confronto dei valori di resa al variare del ciclo di riutilizzo (prove #7, #8 e #9)

Per la prova #8, indicata anche con la sigla “R1”, si misura una concentrazione iniziale di esteri di circa 0,2 mol/l: la lipasi è ancora umida e ha trattenuto e poi rilasciato nell’ambiente di reazione gli esteri non separati al termine della prova #7 con catalizzatore fresco. Tuttavia, la lipasi mantiene una buona attività catalitica e la reazione procede secondo l’andamento atteso, ma con un valore finale di esteri inferiore rispetto al caso della transesterificazione con catalizzatore fresco. La prova #9, denominata anche con “R2”, presenta dati sperimentali e successive rielaborazioni che risentono della parziale denaturazione dell’enzima e della mancanza di un’efficace separazione e purificazione di questo dopo un ciclo di reazione. Nelle prove che seguiranno nella fase sperimentale **B** si tratterà dell’importanza del lavaggio della lipasi prima di poter essere impiegata in nuove prove di transesterificazione.

Dai valori di resa calcolati in riferimento alla massa di esteri effettivamente prodotta e presentati in figura 4B.11 si nota che, per questo set di prove, costituisce un punto critico il secondo riutilizzo della lipasi. Tuttavia, già passando dalla reazione con catalizzatore fresco a quella con lipasi al primo riutilizzo, la diminuzione della resa è piuttosto significativa.

Dopo una prima osservazione dei risultati presentati, si osserva che la quantità di lipasi alimentata al sistema di reazione rappresenta una variabile importante rispetto alla quale valutare la performance del processo. Per questo motivo nel grafico seguente (figura 4B.12) si riporta l'evoluzione temporale degli esteri nelle prove con catalizzatore fresco, in diverse quantità (prove #1, #4, #7):

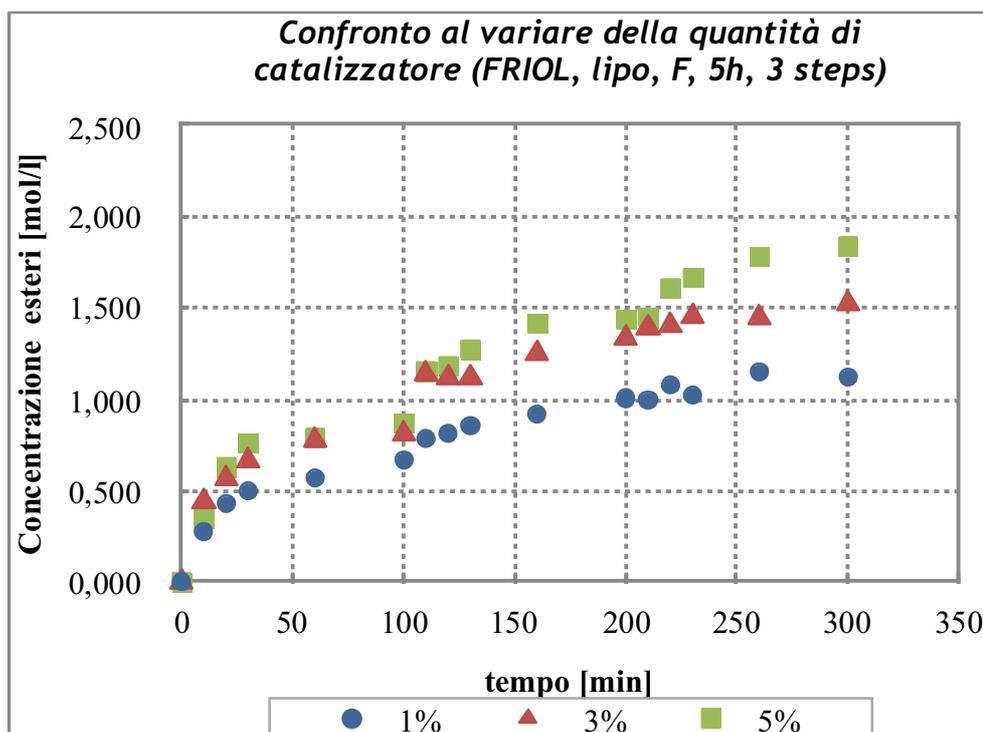


figura 4B.12: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della quantità di catalizzatore (prove #1, #4 e #7)

Il risultato conferma le attese: aumentando la quantità di catalizzatore, aumenta la quantità di esteri prodotti. Ciò è più evidente se si passa dall'1%w/w al 3%w/w la massa di lipasi impiegata, mentre nelle prove con il 3%w/w e il 5% w/w la differenza nelle due curve si delinea dalla metà del secondo *step* di reazione in poi, presentando una forbice nei valori finali di esteri etilici ottenuti. Condurre la transesterificazione enzimatica con il 5% w/w di lipasi presenta però degli inconvenienti dal punto di vista pratico: la miscela di reazione appare sempre torbida e si deve garantire una perfetta miscelazione; inoltre, il prelievo dei campioni deve essere rapido e accurato, allo scopo di evitare che il catalizzatore sedimenti interrompendo la reazione ed evitando di prelevare piccole quantità di enzima con il campione. Tutto ciò si traduce in un più alto valore della resa in esteri, legato alla quantità di catalizzatore, come si vede nella figura 4B.13:

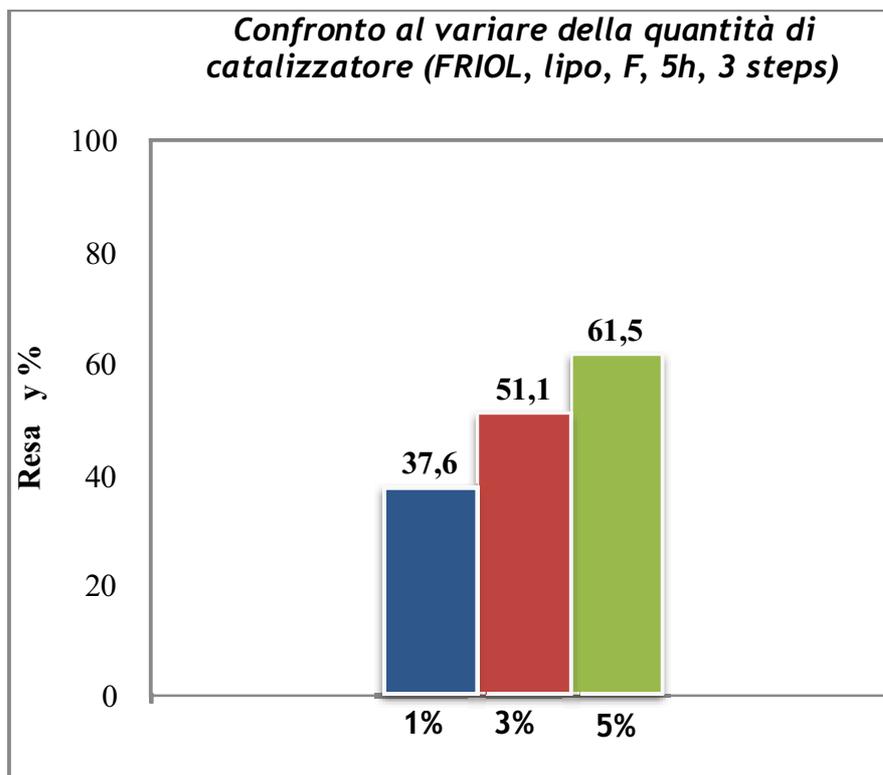


figura 4B.13: Confronto dei valori di resa al variare della quantità di catalizzatore (prove #1, #4 e #7)

#### Prove sperimentali 10 - 12

In questo set di prove si vuole completare lo studio con l'enzima Lipo *P. cepacia*, esaminando la sua attività al variare della concentrazione nell'ambiente di reazione, prima di testare la lipasi Epobond *P. cepacia* e confrontare i risultati ottenuti.

Come già detto, le prove #10, #11 e #12 differiscono tra di loro per la quantità di biocatalizzatore fresco impiegato, mantenendo uguali le altre condizioni, cioè 3 *steps* di alimentazione dell'etanolo, ciascuno della durata di 180 minuti, per un totale di 9 ore di reazione. Con una quantità di catalizzatore dell'1% w/w nel sistema di reazione, presentato nel capitolo 3B, si ottengono gli andamenti temporali dei diversi composti presentati nelle figure 4B.14 - 4B.15 - 4B.16:

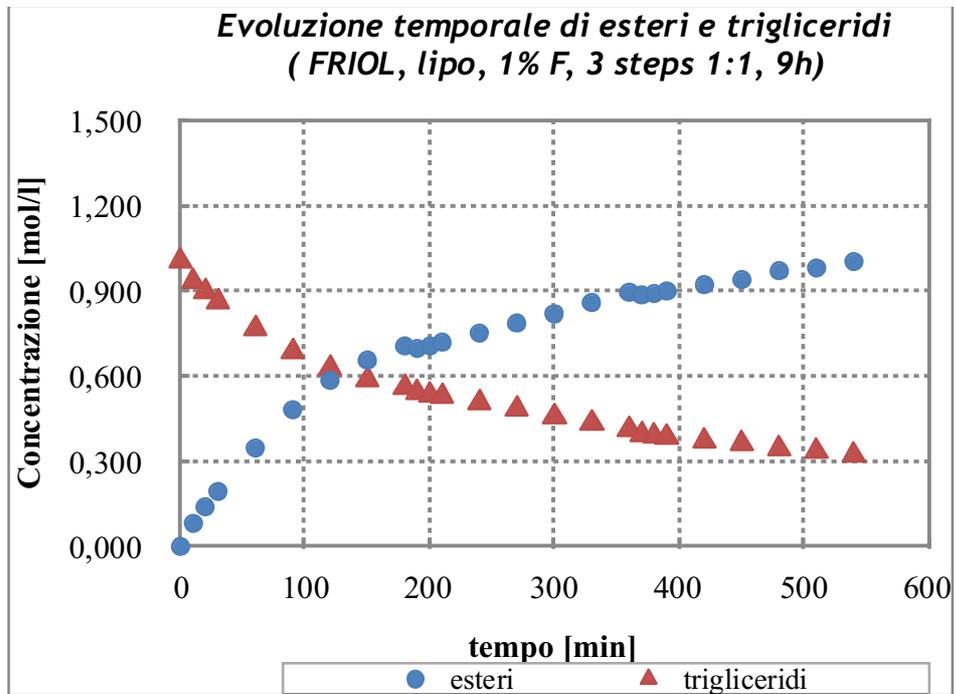


figura 4B.14: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #10)

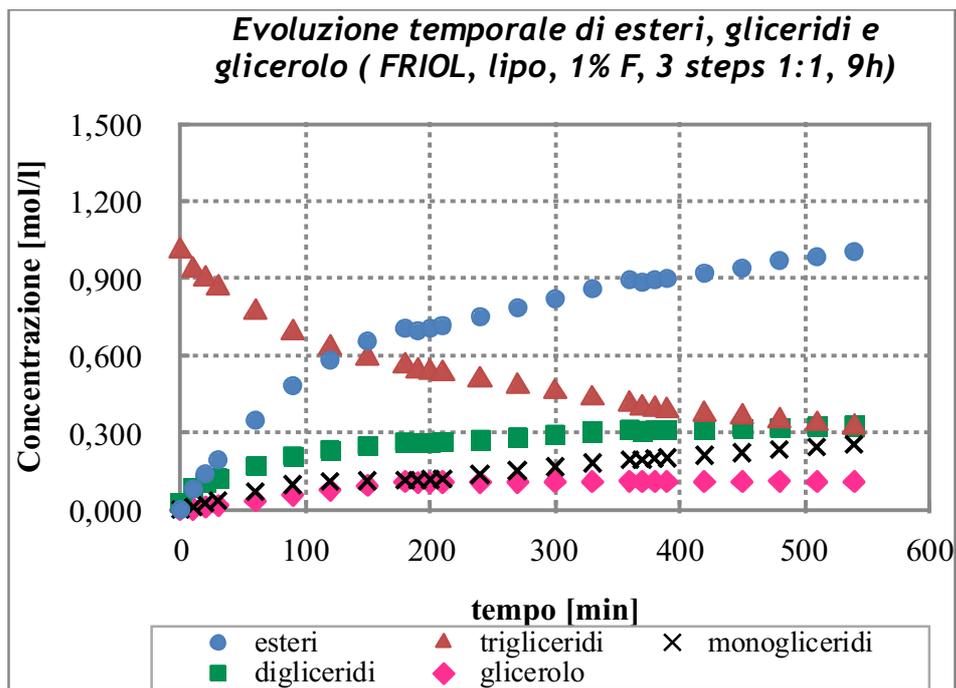


figura 4B.15: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #10)

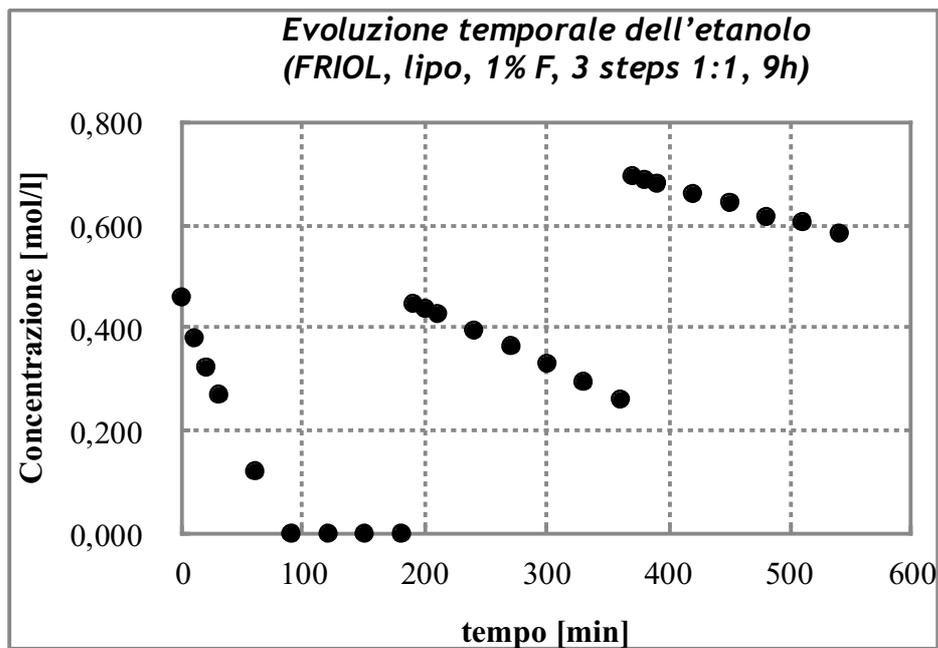


figura 4B.16: Andamento temporale dell'etanolo (prova #10)

Sebbene la transesterificazione proceda con un andamento crescente della concentrazione degli esteri prodotti e decrescente dei trigliceridi non convertiti, non si ritrovano l'andamento tipico della reazione enzimatica con alimentazione dell'alcol a *step*, ma piuttosto per l'evoluzione temporale degli esteri una correlazione lineare per ogni *step* considerato. Al termine della reazione i gliceridi si trovano in concentrazioni ancora significative: i trigliceridi diminuiscono, mentre i digliceridi si assestano attorno ad un valore costante nel terzo *step*, e i monogliceridi procedono in graduale aumento in tutti e tre gli *steps*. Tuttavia la concentrazione del glicerolo si mantiene pressoché costante nel secondo e terzo stadio. Questo suggerisce che la transesterificazione nel complesso ha luogo attraverso una degradazione dei trigliceridi in digliceridi; questi si formano e in ugual misura si convertono nel terzo *step* in monogliceridi; questi ultimi invece, nel tempo considerato, non hanno ancora avuto il tempo di convertirsi in estere e glicerolo. In ogni *step* l'etanolo è consumato: più velocemente nel primo stadio e consumandosi qui completamente, più lentamente nel secondo e soprattutto nel terzo *step*. Qui la quantità di etanolo si mantiene a valori maggiori delle moli necessarie per garantire una rapporto alcol:olio di 1:1, causando una parziale inibizione della lipasi. Per questo motivo si intende procedere ed esaminare cosa accade con concentrazioni

maggiori di lipasi (prove #11, #12). Nelle figure 4B.17 e 4B.18 si riportano gli andamenti temporale di vari composti nella prova #11:

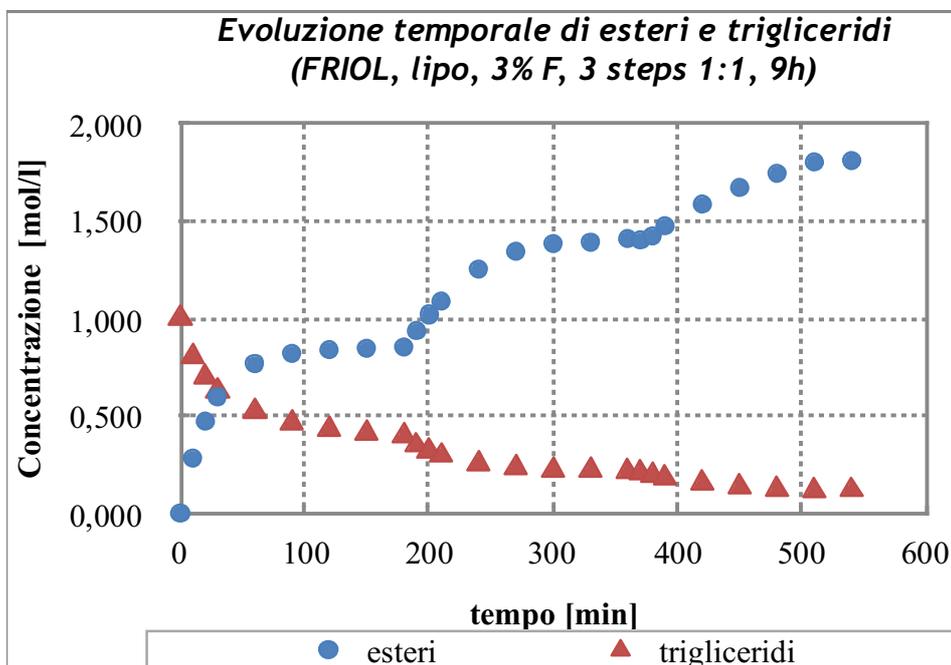


figura 4B.17: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #11)

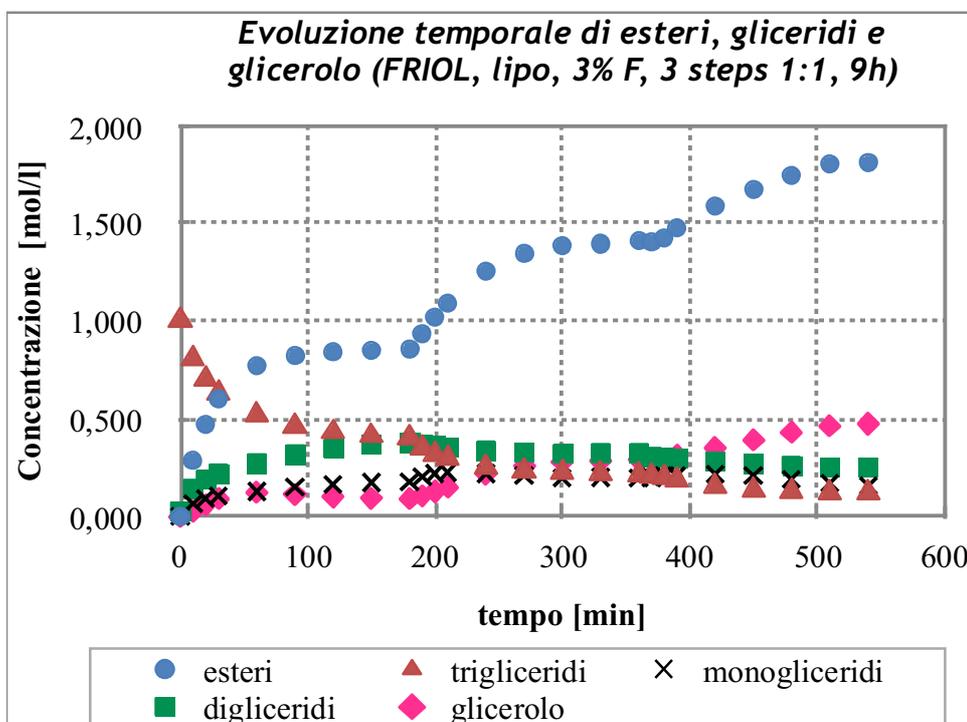


figura 4B.18: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #11)

Anche in questo set di prove si riscontra che quantità maggiori di catalizzatore consentono di aumentare la velocità di reazione, ottenendo concentrazioni maggiori degli esteri prodotti e migliorando così la resa del processo. Gli esteri sono prodotti velocemente nei primi 60 minuti di reazione e raggiungono la condizione di plateau nel primo *step*; l'alimentazione dell'etanolo dopo 180 minuti determina un aumento della concentrazione della miscela esterea e una progressiva diminuzione dei trigliceridi fino a 300 minuti, da questo momento fino alla fine del secondo *step* si mantengono entrambi costanti. Nel terzo stadio si osserva un andamento simile agli *steps* precedenti, ma il plateau è raggiunto negli ultimi 30 minuti di reazione. Durante la transesterificazione si osserva una diminuzione di concentrazione dei trigliceridi, più veloce nel primo *step* e meno accentuata successivamente; per i digliceridi dopo un aumento della concentrazione nel primo *step* si osserva una graduale diminuzione negli istanti di tempo successivi fino al termine della reazione, suggerendo che questi si formano dalla decomposizione dei gliceridi, ma sono consumati in misura maggiore rispetto alla loro formazione e ottenendosi così una concentrazione minore nell'ambiente di reazione. Ugual andamento si ritrova per i monogliceridi, ma con valori di concentrazione inferiori rispetto ai digliceridi; di contro la conversione dei monogliceridi porta alla formazione di glicerolo, per il quale si calcola un continuo aumento nel secondo e terzo *step*; ciò è dovuto alla conversione dei monogliceridi e di conseguenza di tutti i gliceridi.

L'aumento della quantità di catalizzatore migliora la resa del processo, come confermato nelle figure seguenti, in cui si confrontano le prestazioni della reazione al variare della quantità di lipasi impiegata:

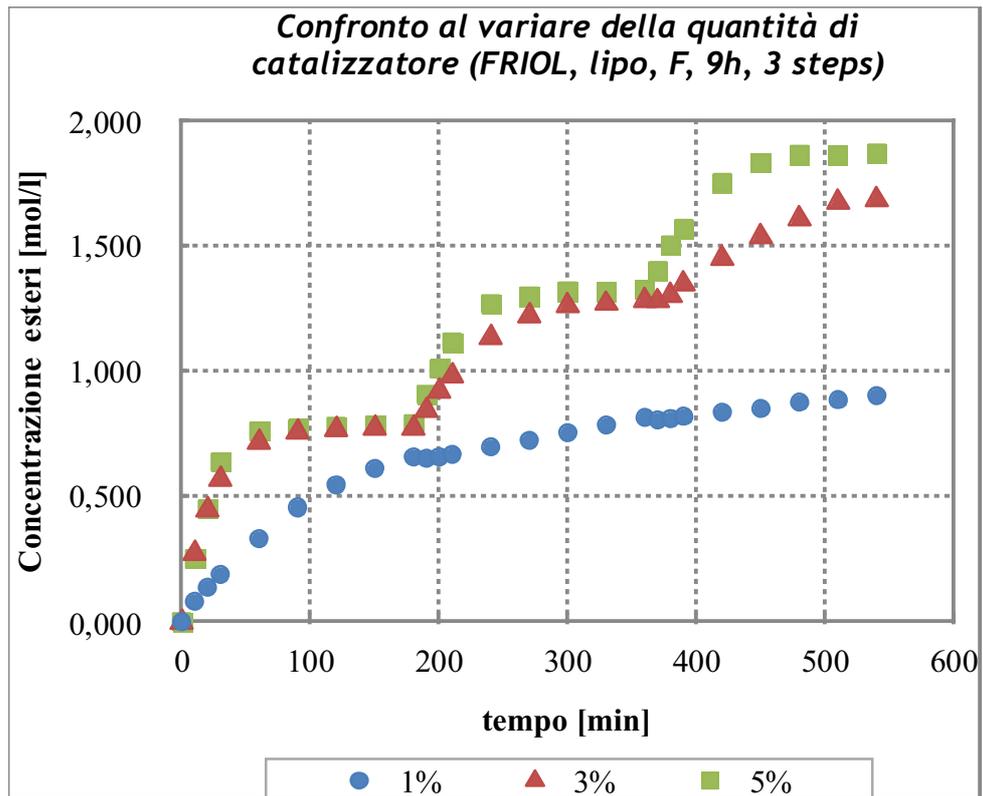


figura 4B.19: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della quantità di catalizzatore (prove #10, #11, #12)

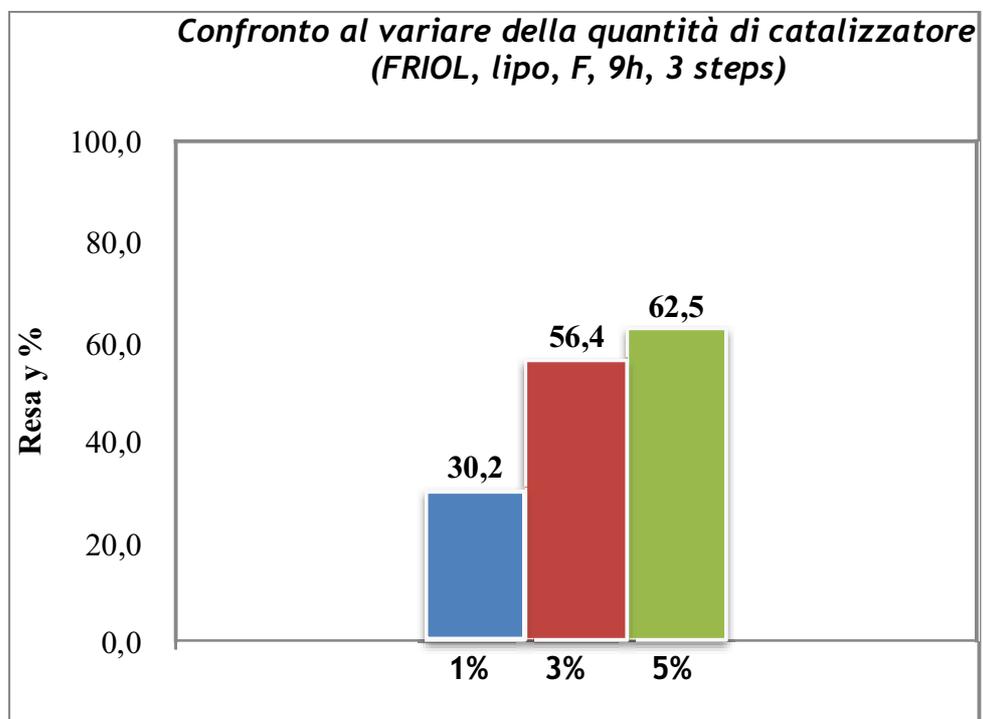


figura 4B.20: Confronto dei valori di resa al variare della quantità di catalizzatore (prove #10, #11, #12)

La differenza nell'ottenimento della miscela di FAEEs prodotta al variare della quantità di lipasi dall'1% al 3% w/w è piuttosto marcata, mentre dal 3% al 5% w/w è significativa soprattutto nel terzo *step*, risultando così in una maggiore velocità di formazione all'inizio del terzo *step* e il raggiungimento di un valore di concentrazione costante (e maggiore di quello al termine della prova #11) un'ora prima del termine della transesterificazione.

#### **4.2B Fase sperimentale B**

L'obiettivo principale della sperimentazione della fase **B** consiste nel testare la lipasi Epobond *P. cepacia*, che rispetto alla Lipo è caratterizzata da una diversa tipologia di immobilizzazione e di supporto. Per questo catalizzatore si sono effettuate diverse prove nelle fasi **B** e **C**, allo scopo di valutare la performance della transesterificazione con diverse quantità di catalizzatore fresco e riutilizzato, a seguito di lavaggio con esano o acqua, e al variare del numero degli *steps* di alimentazione dell'alcol. Dai risultati ottenuti si procederà con lo studio della transesterificazione su due tipi di olio esausto.

La fase sperimentale **B**, come precedentemente illustrato, è caratterizzata da diversi momenti, di cui qui si riportano e discutono i principali risultati e confronti. In *Appendice IB* si possono apprezzare i risultati per tutti i dati rielaborati e i confronti di tutte le prove effettuate. La tabella 2.9 riassume le condizioni operative di ciascuna prova:

Fase sperimentale B (FRIOL, epobond <i>P. cepacia</i> )				
Prova	durata [h]	stato enzima	quantità enzima [%w/wolio]	N° steps alimentazione alcol
<b>13</b>	9	F, fresco	1%	3
<b>14</b>	9	F, fresco	3%	3
<b>15</b>	9	F, fresco	5%	3
<b>16</b>	9	R1, riutilizzato da #14 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>17</b>	9	R2, riutilizzato da #16 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>18</b>	9	R3, riutilizzato da #17 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>19</b>	9	R4, riutilizzato da #18 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>20</b>	9	R5, riutilizzato da #19 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>21</b>	9	R6, riutilizzato da #20 (lavaggio con esano)	3%	3
<b>22</b>	9	F, fresco	3%	1
<b>23</b>	9	F, fresco	3%	2 [6 h + 3 h]
<b>24</b>	9	F, fresco	3%	2 [4,5 h + 4,5 h]
<b>25</b>	9	F, fresco	3%	6 [1,5 h ciascuno]
<b>26</b>	9	R1, riutilizzato da #22 (lavaggio con acqua)	3%	1
<b>27</b>	9	R1, riutilizzato da #24 (lavaggio con acqua)	3%	2 [4,5 h + 4,5 h]
<b>28</b>	9	R1, riutilizzato da #23 (lavaggio con acqua)	3%	3
<b>29</b>	9	R1, riutilizzato da #25 (lavaggio con esano)	3%	3

tabella 2.9: Prove sperimentali della fase B

Prove sperimentali 13 - 21

Analogamente alle prove esaminate finora si studia l'andamento della transesterificazione enzimatica con l'Epobond *P. cepacia*, al variare della quantità di catalizzatore nelle prove #13, #14 e #15. Si riportano i risultati della #14:

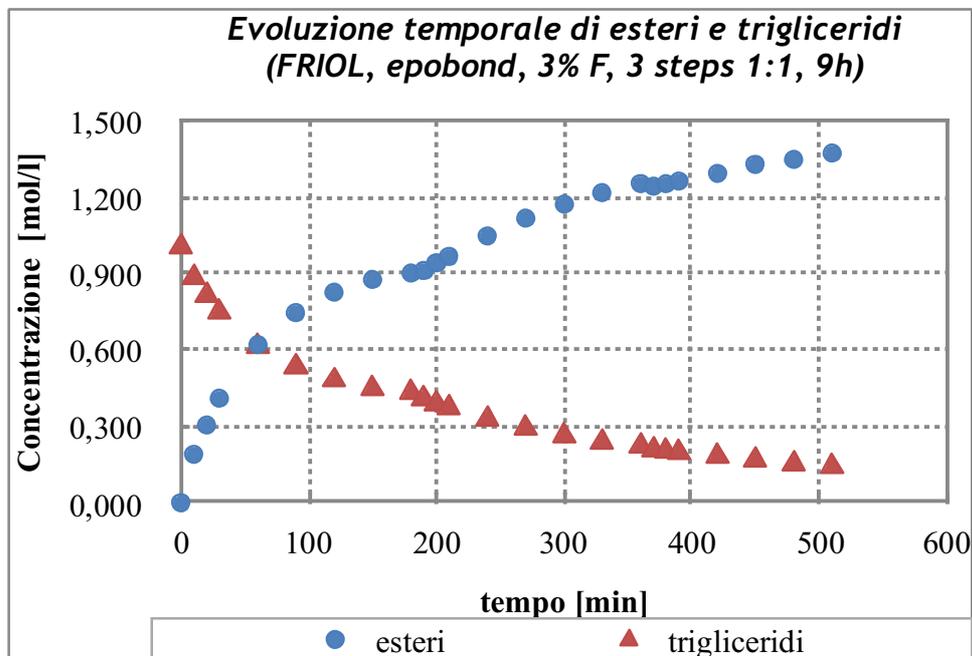


figura 4B.21: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #14)

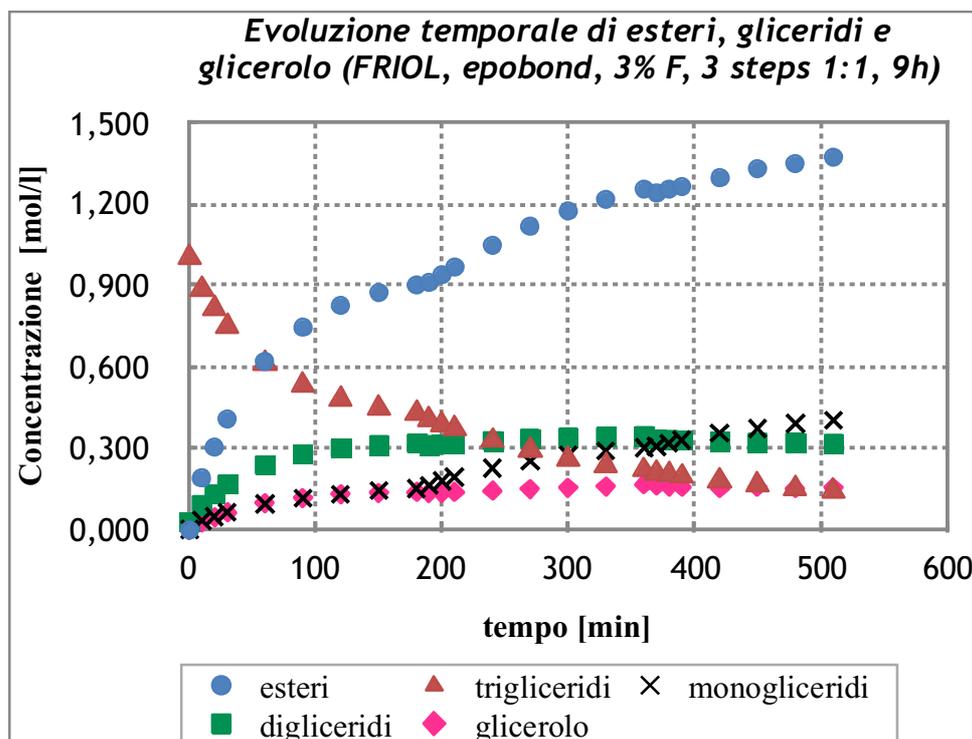


figura 4B.22: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #14)

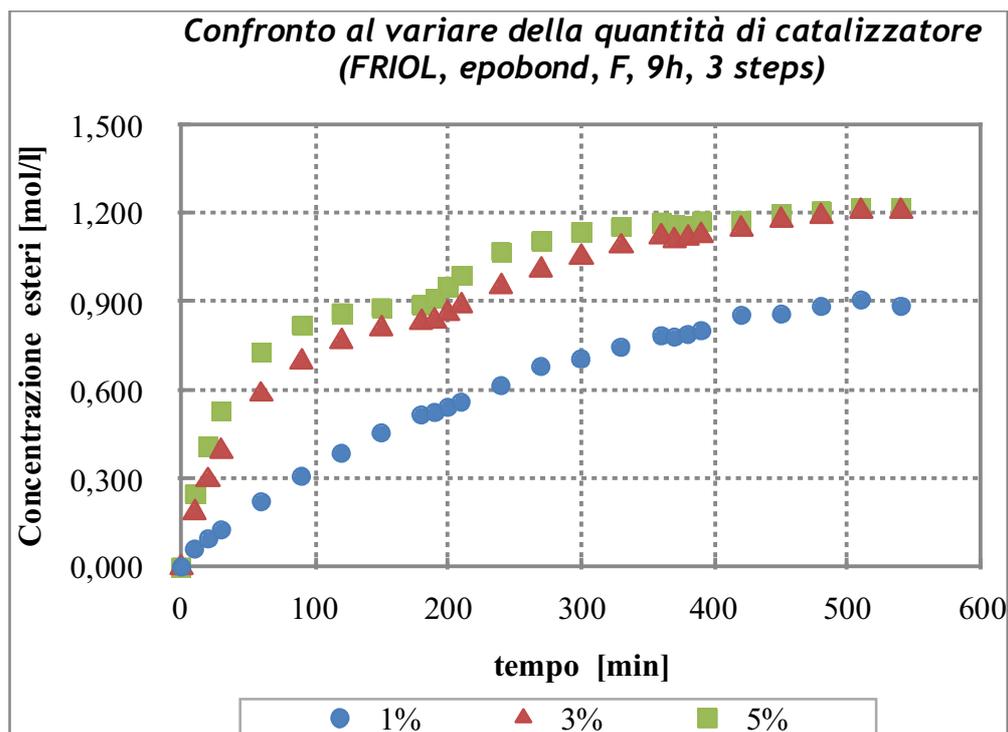


figura 4B.23: Andamento temporale di esteri e trigliceridi (prova #14)

La lipasi epobond *P. cepacia* garantisce l'etanolisi dei gliceridi in esteri e glicerolo in ogni *step* considerato: l'alcol si consuma completamente nel primo *step*, con velocità minore nel secondo e terzo stadio e si ritrova nell'ambiente di reazione al termine di questa. I trigliceridi si convertono lungo tutta la durata della transesterificazione, mentre i digliceridi aumentano significativamente nel primo *step* e variano di poco nel secondo e terzo *step*. La concentrazione dei monogliceridi aumenta in maniera progressiva dal primo al terzo *step*, mentre il glicerolo formato si assesta attorno ad un valore costante nel terzo stadio.

A questo punto si intende confrontare i risultati delle prove #13, #14 e #15 in termini di resa e, quindi, di esteri prodotti; le figure 4B.24 e 4B.25 mostrano quanto ottenuto:

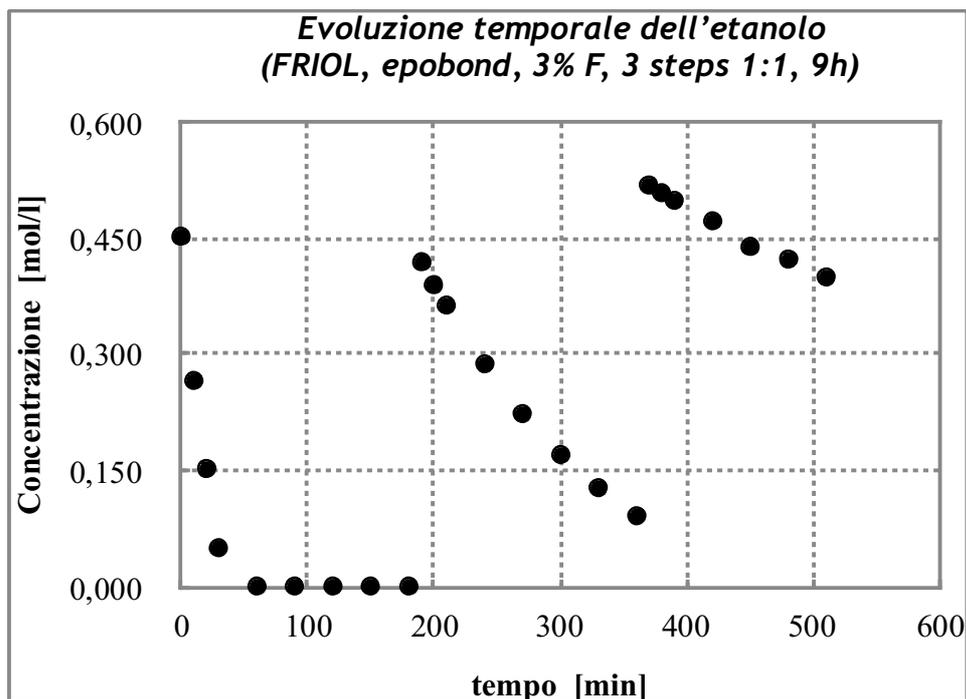


figura 4B.24: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della quantità di catalizzatore (prove #13, #14, #15)

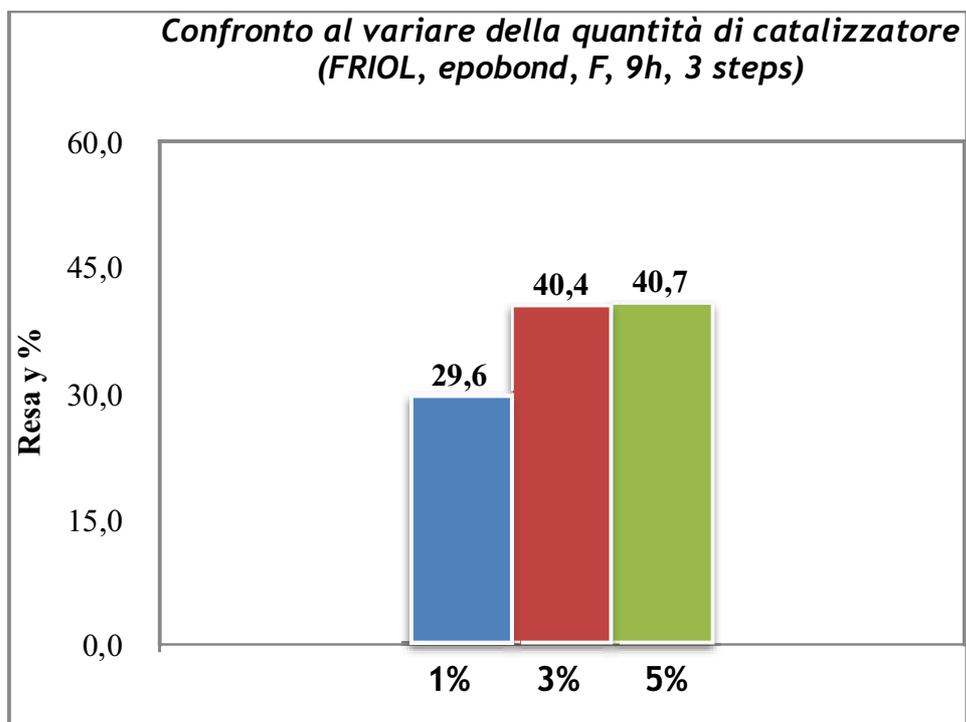


figura 4B.25: Confronto dei valori di resa al variare della quantità di catalizzatore (prove #13, #14, #15)

Le curve degli esteri o analogamente la resa calcolata mostrano che la reazione condotta con l'1% w/w di biocatalizzatore è meno efficiente rispetto agli altri due casi, mentre con il 3% e il 5% w/w, pur presentando uno scarto nei valori di concentrazione nel primo e nel secondo *step*, questo si riduce e si annulla completamente nel terzo stadio. Per cui, se si valuta il processo nella sua globalità, il valore di resa finale in esteri non tiene conto della variazione di quantità di catalizzatore, se questa si aumenta dal 3% al 5% w/w. Pertanto, le prove sperimentali che seguiranno nella fase **B** saranno condotte al valore fissato del 3% w/w. Le prove #13, #14 e #15 hanno fornito importanti informazioni sulla transesterificazione e, in particolare, la #14 costituisce un punto di partenza e di paragone per le prove seguenti.

#### Prove sperimentali 16 - 21

Con questo set di prove si intende testare la lipasi epobond *P. cepacia*, recuperata e riutilizzata, in successivi cicli di reazione, nelle stesse condizioni operative della #14. Il lavaggio con esano del biocatalizzatore avviene nelle modalità illustrate nel capitolo 3B. Qui si riporta la performance della transesterificazione in termini di andamento temporale degli esteri (figura 4B.26) e resa % finale (figura 4B.27) delle prove dalla #16 alla #21 con lipasi riutilizzata, e il confronto con la #14, relativa all'impiego del catalizzatore fresco ("F"):

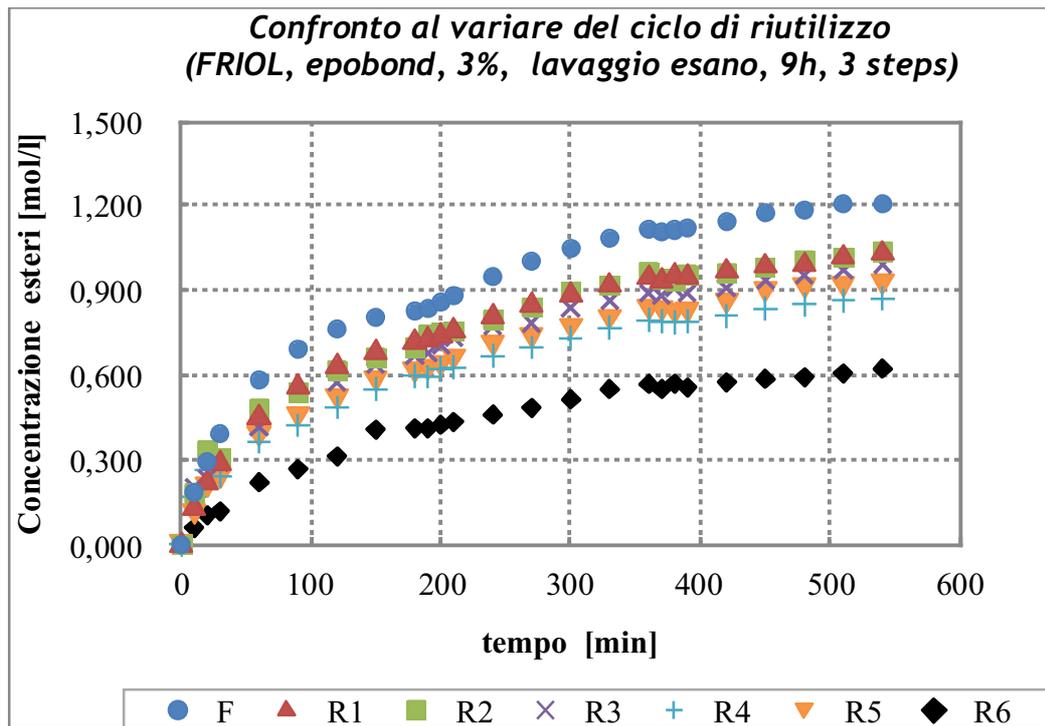


figura 4B.26: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del ciclo di riutilizzo (prove #14, #16, #17, #18, #19, #20, #21)

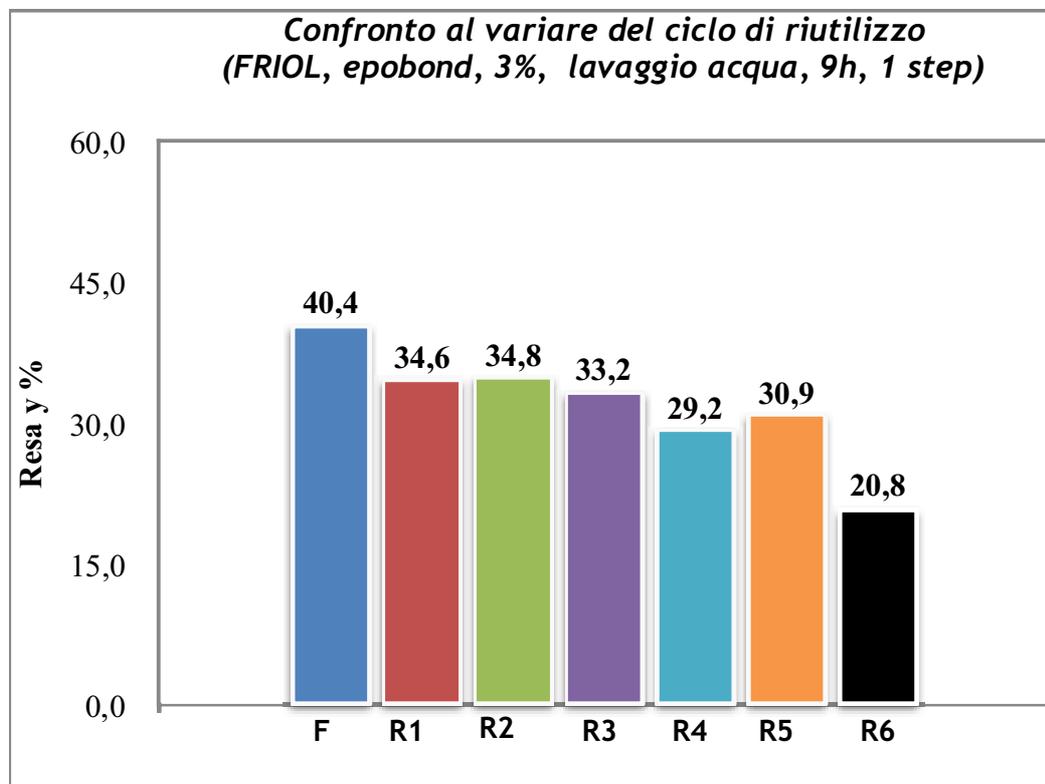


figura 4B.27: Confronto dei valori di resa al variare del ciclo di riutilizzo (prove #14, #16, #17, #18, #19, #20, #21)

La #14, come precedentemente affermato, prevede l'impiego del catalizzatore fresco e costituisce il punto di partenza per le altre prove in cui la lipasi è stata recuperata, lavata e reimpiegata. Per questo motivo nelle figure 4B.26 e 4B.27 la prova #16 è anche indicata con la sigla "R1", perché la lipasi è al suo primo riutilizzo, così come la "R2" indica la prova #17 al secondo riutilizzo e procedendo in questo modo fino alla #21 ("R6").

La lipasi riutilizzata mostra una diminuzione dell'attività catalitica e, quindi, per la transesterificazione questo si traduce in una minore resa finale in esteri, determinata con molta probabilità dal primo ciclo di reazione e dal successivo lavaggio. Tuttavia, per i primi riutilizzi, fino alla prova #18, la performance della lipasi rimane pressoché invariata, per poi diminuire di poco nelle prove #19 (R4) e #20 (R5); la diminuzione significativa si osserva nella reazione #21, quando la lipasi è riutilizzata per la sesta volta: in questo caso la resa in esteri si è dimezzata rispetto al caso del catalizzatore fresco. Per cui non si ritiene vantaggioso proseguire con altri cicli di reazione. Dall'analisi dei risultati riportati in figura 4B.27 si deduce che l'epobond *P. cepacia*, nelle condizioni operative considerate, può essere recuperata e riutilizzata in altri 5 cicli di reazione prima di subire una drastica riduzione dell'attività catalitica.

#### Prove sperimentali 22 - 25

Questo set di prove è relativo allo studio della transesterificazione enzimatica di olio di frittura fresco FRIOL, promossa dalla lipasi epobond *P. cepacia* in quantità fissata al 3% w/w, al variare del numero degli *steps* di alimentazione dell'alcol. Con riferimento ai risultati della prova #14, relativi all'alimentazione dell'etanolo in 3 *steps* consecutivi, si prosegue con l'esaminare i casi delle prove #22, #23, #24 e #25. Nella figura 4B.28 si riportano i risultati relativi alla #24:

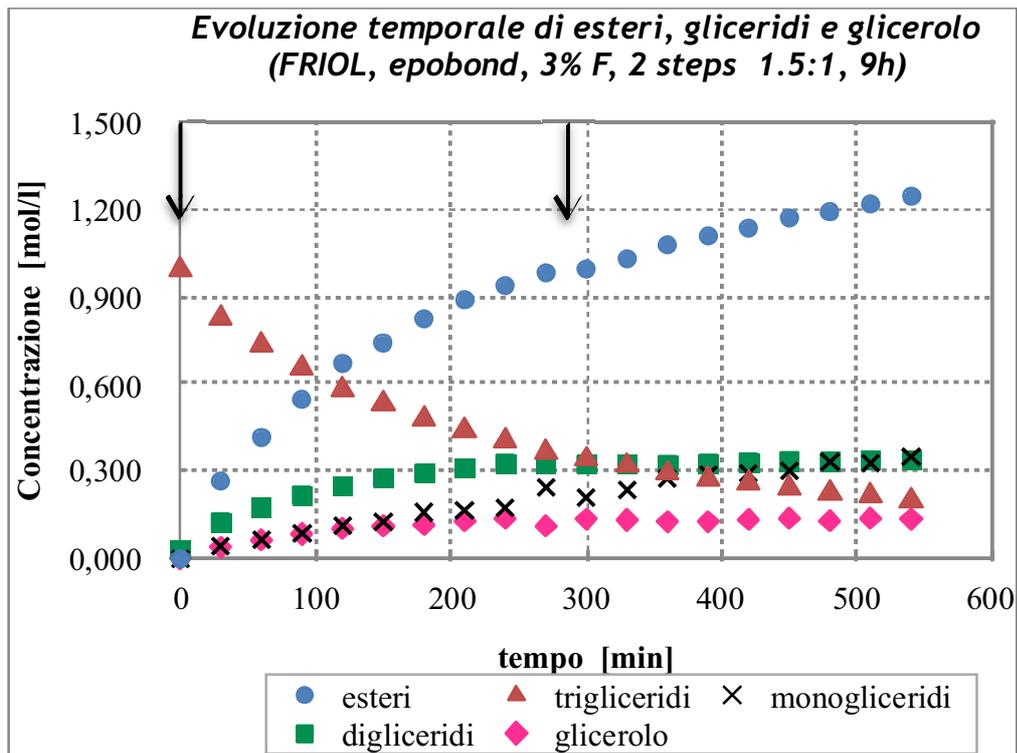


figura 4B.28: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #24)

La transesterificazione nella #24 prevede che l'alimentazione dell'etanolo abbia luogo in due momenti, al tempo iniziale e a metà della reazione, così come indicato dalle frecce. La miscela esterea presenta un aumento di concentrazione in entrambi gli *steps*, così come i trigliceridi sono caratterizzati da una progressiva diminuzione della loro concentrazione. Per quanto riguarda i prodotti intermedi si osserva che i digliceridi aumentano nel primo *step* per poi mantenersi attorno ad un valore costante nel secondo stadio; i monogliceridi, invece, aumentano in entrambi gli stadi. Per il glicerolo si osserva un aumento di concentrazione nel primo *step*, ma nel secondo momento il valore di questo prodotto non cambia. Nel primo *step* si è calcolato da questi dati che la concentrazione dell'alcol si porta a valori molto bassi o nulli già dopo 100 minuti, mentre nel secondo *step* il consumo dell'alcol si ottiene secondo una correlazione di tipo lineare. Da tutto ciò si può dedurre che, alimentando l'etanolo in due momenti consecutivi di uguale durata, la transesterificazione dei gliceridi non è completa nelle condizioni esaminate.

La figura 4B.29 mostra il confronto delle prestazioni delle reazioni di transesterificazione, valutato in termini di andamento temporale degli esteri, al variare del numero di *steps* di alimentazione dell'etanolo:

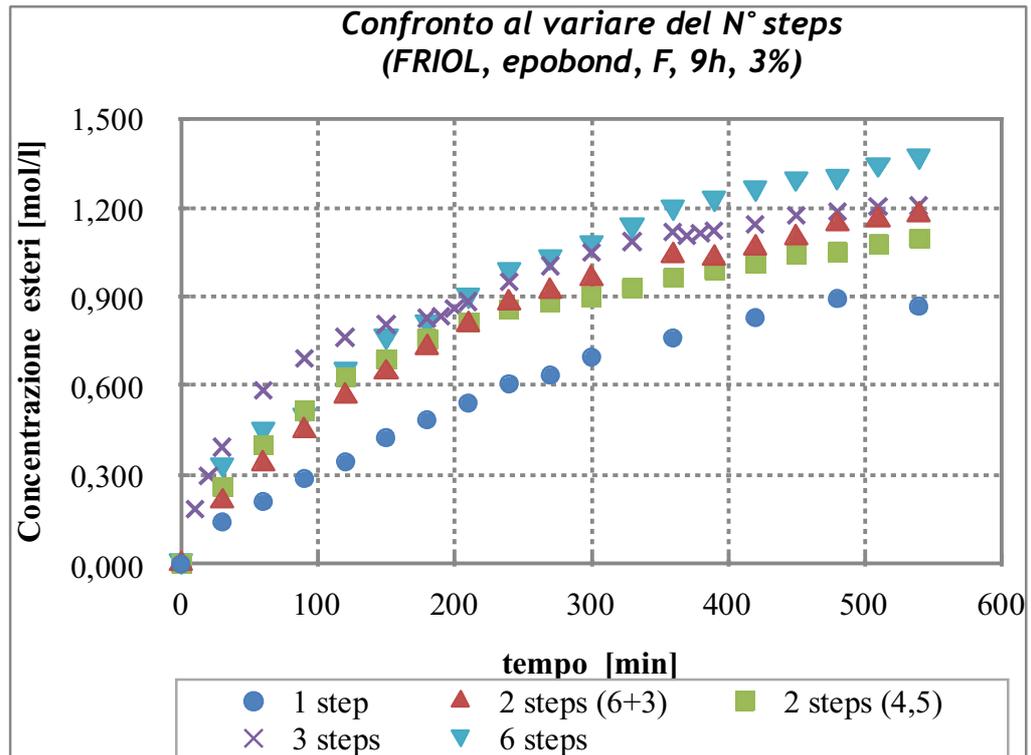


figura 4B.29: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del numero di steps di alimentazione dell'alcol (prove #14, #22, #23, #24, #25)

Come già trovato in diversi riferimenti di letteratura e riportato nel capitolo 2, l'introduzione dell'etanolo in un'unica soluzione all'istante iniziale rappresenta la condizione meno vantaggiosa; invece, l'alimentazione dell'alcol in due momenti, suddivisi nelle due situazioni proposte, consente di "spingere" la reazione verso destra, cioè verso la formazione di esteri, già dal primo stadio e proseguire nel secondo e terzo step. Alimentare l'etanolo in tre momenti favorisce inizialmente la transesterificazione, sia rispetto al caso dei due che sei steps, mentre con uno zoom sul terzo step si osserva che introdurre l'alcol in sei steps promuove maggiormente la formazione degli esteri. Da questo grafico si deduce che, nella transesterificazione di durata pari a 9 ore e nelle condizioni operative qui considerate, la buona performance del processo si potrebbe ottenere prevedendo i primi due steps di durata pari a 3 ore ciascuno, mentre l'ultimo stadio dovrebbe essere diviso in due momenti di uguale durata (un'ora e mezza ciascuno).

I valori di resa, calcolati per ogni prova, consentono di valutare anche la produttività del processo in termini degli esteri etilici ottenuti nelle condizioni esaminate; il grafico 4B.30 li riassume:

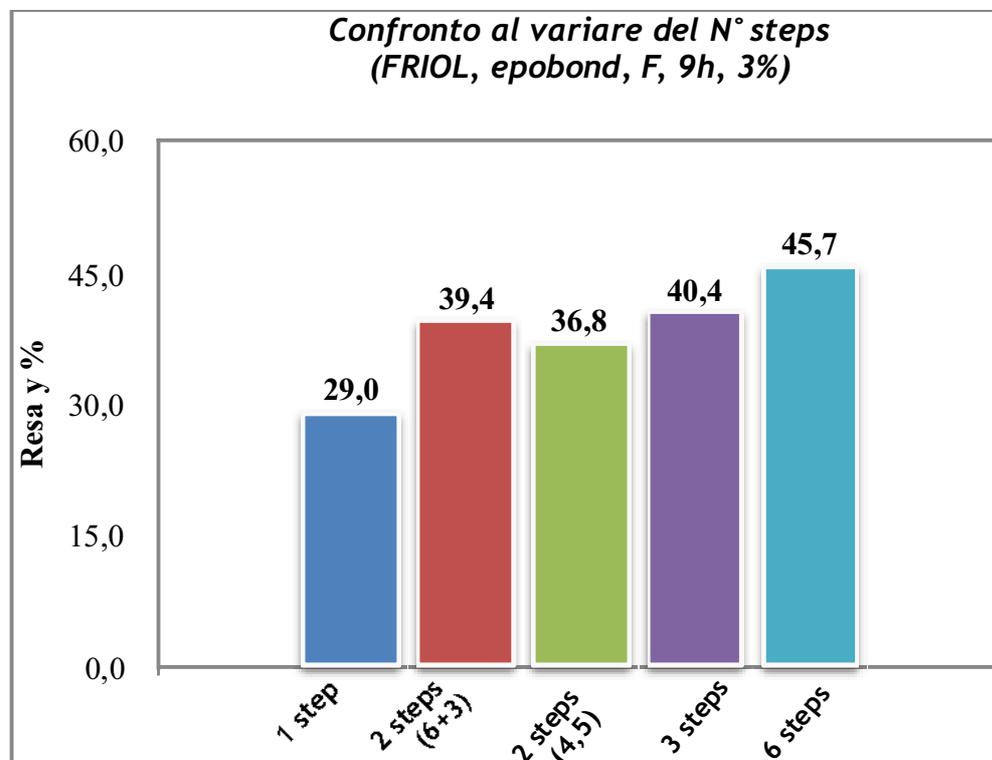


figura 4B.30: Confronto dei valori di resa al variare del ciclo di riutilizzo (prove #14, #16, #17, #18, #19, #20, #21)

#### Prove sperimentale 26 - 29

Si esamina qui la possibilità di utilizzare oltre all'esano, come solvente per il lavaggio della lipasi, anche l'acqua distillata. I due solventi hanno caratteristiche diverse, in particolare la polarità dell'acqua è da considerare rispetto al carattere apolare del composto organico. Le prove sperimentali prevedono di studiare l'andamento della transesterificazione, così come fatto finora, impiegando l'epobond riutilizzata al 3% w/w, in diverse condizioni di alimentazione dell'etanolo. Si riporta qui di seguito il caso della prova #28 in cui la lipasi è stata reimpiegata dopo il lavaggio con acqua distillata:

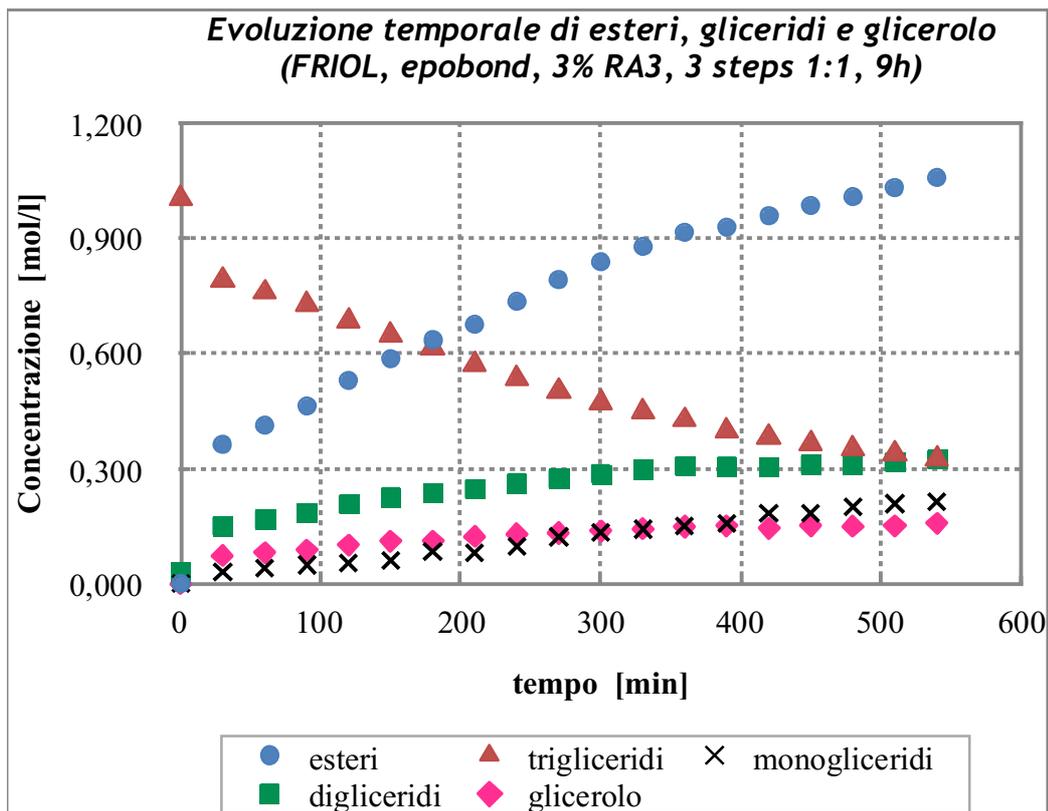


figura 4B.31: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #28)

Dopo una consistente variazione iniziale, la concentrazione degli esteri è caratterizzata da un aumento nel tempo di tipo lineare in tutti e tre gli *steps*, con pendenza inferiore soprattutto nell'ultimo stadio. Per i composti intermedi, digliceridi e monogliceridi, si osserva un graduale aumento della concentrazione, mentre per il glicerolo all'aumentare delle prime fasi della reazione segue il raggiungimento di un valore costante della concentrazione.

Il riutilizzo della lipasi sottoposta a lavaggio con acqua è stato valutato insieme col considerare un altro aspetto, cioè il diverso numero di *steps* di alimentazione dell'etanolo. La figura 4B.32 presenta il confronto delle prove #26, #27 e #28, condotte rispettivamente con un solo *step*, due *steps* di uguale durata, e 3 *steps*. Tutte le prove prevedono una durata complessiva di 9 ore.

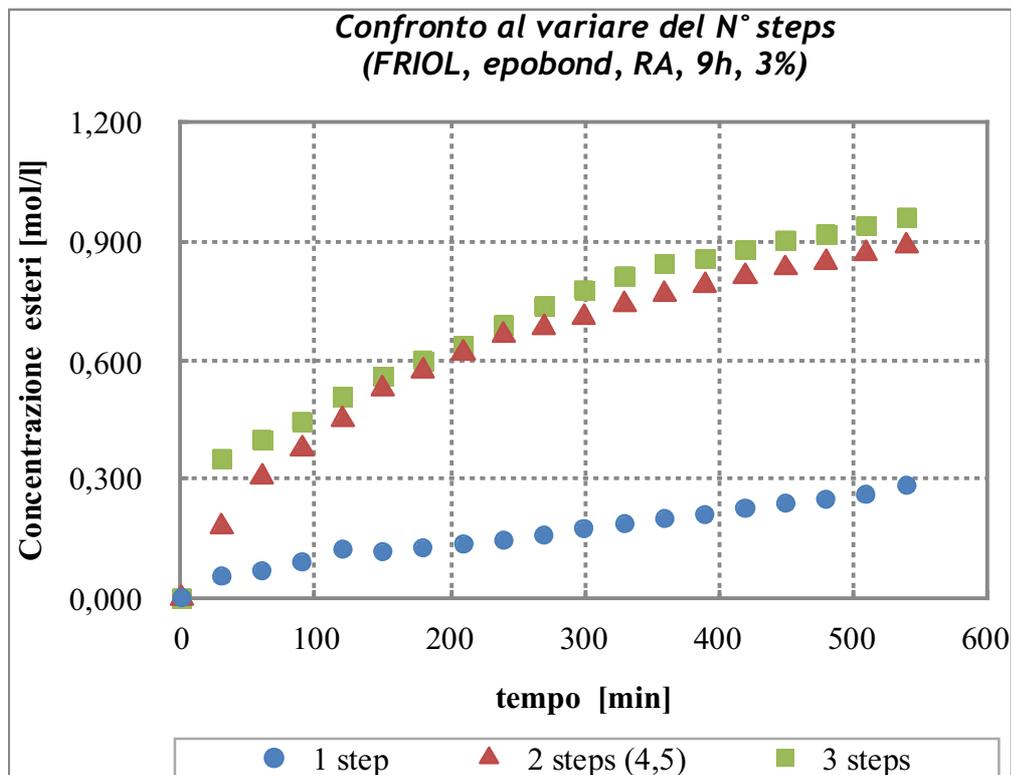


figura 4B.32: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del numero di steps di alimentazione dell'alcol per lipasi riutilizzata dopo lavaggio con acqua (prove #26, #27, #28)

Come già riscontrato con il catalizzatore fresco nelle stesse condizioni di reazione (prova #22), l'alimentazione dell'etanolo in un'unica soluzione al tempo iniziale non rappresenta un'alternativa vantaggiosa al caso già più frequente della somministrazione dell'alcol in tre momenti consecutivi. Il caso dei due *steps* in luogo dei tre diversi momenti, sebbene più vicina alla prova con tre *steps*, non consente di raggiungere risultati più performanti. Per cui nel considerare la lipasi lavata con acqua e riutilizzata nelle reazioni di transesterificazione su olio fresco si ritiene opportuno lavorare con tre *steps* di uguale durata per l'alimentazione dell'etanolo, anziché due *steps* o uno solo. Dalle prove esaminate finora si è osservato che la transesterificazione dei gliceridi con etanolo non si completa dopo 9 ore di reazione nel caso soprattutto di lipasi riutilizzata. Per cui è interessante valutare le prestazioni del processo anche per tempi maggiori. Infatti, per le prove #27 ("RA") e #28 ("RE"), cioè a due e tre *steps* dopo lavaggio con acqua, la reazione è stata condotta a tempi lunghi, cioè fino a 24 e 48 ore, senza interventi sul sistema. E' stata valutata la resa in esteri a 9, 24 e 48 ore e nella tabella 4B.1 si riportano i valori calcolati:

tempo [h]	Prova #27 (FRIOL, epobond, RA, 3%w/w, 2 steps)	Prova #28 (FRIOL, epobond, RA, 3%w/w, 3 steps)
	<b>resa in esteri [%w/w] UNI EN 14214</b>	
9	32,5	35,4
24	43,8	45,8
48	50,5	49,8

tabella 4B.1: Confronto dei valori di resa a tempi lunghi (prove #27 e #28)

in cui si ricorda che per la #27 l'alimentazione dell'etanolo avviene al tempo iniziale e dopo 270 minuti di reazione, mentre per la #28 oltre che all'inizio della transesterificazione, anche dopo 180 e 360 minuti. Si deduce che la reazione continua anche dopo le 9 ore considerate, pur senza alimentare altro alcol, ma consumando quello presente in ambiente di reazione. La concentrazione di esteri, qui valutata mediante la resa, aumenta allo stesso modo, indipendentemente dalle condizioni operative. Come osservato dalla figura 4B.32, i casi considerati non presentano il raggiungimento di una condizione di plateau per gli esteri, da cui si è sviluppata la volontà di esaminare ciò che accade a tempi lunghi. In questo ambito di prove risulta interessante confrontare la performance dello stesso campione di lipasi in parte utilizzato nella #28 (lavaggio con acqua) e nella restante parte nella #29 (lavaggio con esano). La figura 4B.33 rende il confronto in termini di miscela di esteri etilici prodotta:

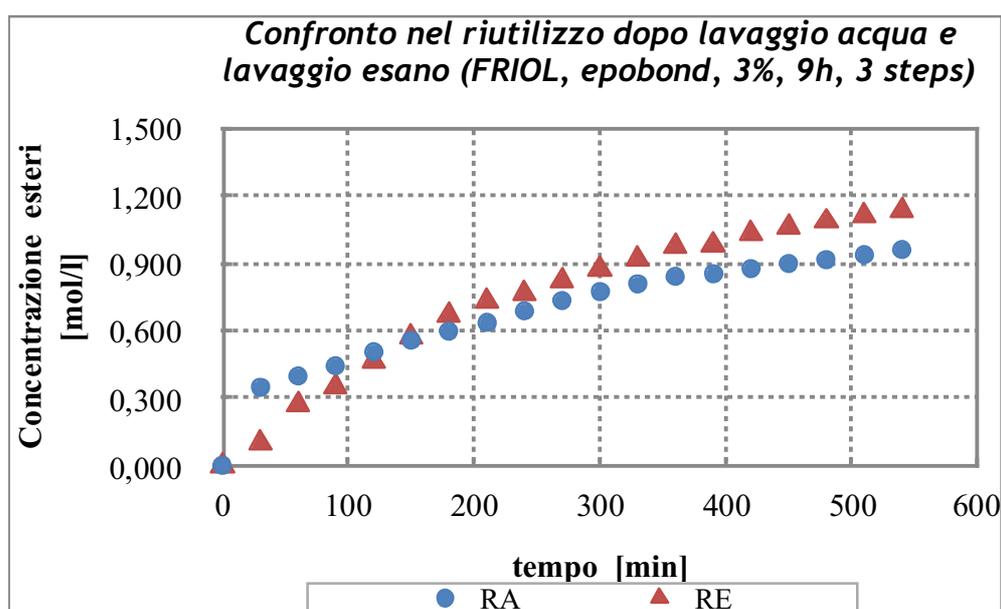


figura 4B.33: Confronto dell'andamento temporale degli esteri nel riutilizzo della lipasi dopo lavaggio con acqua o esano (prove #27 e #28)

La sigla “RA” è identificativa della prova #28, in cui la lipasi è riutilizzata dopo il lavaggio con acqua; mentre il lavaggio con esano e successivo impiego del biocatalizzatore è previsto ed effettuato per la #29, la cui sigla è “RE”. Come già ricordato più volte, la valutazione della concentrazione nel tempo della miscela esterea consente di seguire l’andamento della transesterificazione, in cui gli esteri appunto costituiscono il prodotto ottenibile da ciascuna delle tre reazioni in serie - parallelo; in questo confronto si vede che il lavaggio con acqua consente alla lipasi di catalizzare più velocemente la reazione nei primi 100 minuti rispetto all’utilizzo dell’esano con solvente. Successivamente la situazione si inverte e la lipasi lavata con esano consente di ottenere istante dopo istante un valore di concentrazione di esteri maggiore, raggiungendo una resa finale in esteri più alta.

#### Confronto al variare della lipasi

Le prove presentate finora, insieme con quelle i cui risultati sono riassunti in *Appendice IB*, possono aprire il campo a diverse considerazioni che scaturiscono dalla discussione di tali risultati e dai loro confronti. Ad esempio, a parità di condizioni operative, il confronto delle prestazioni del processo catalizzato dalla lipasi epobond piuttosto che dalla lipo *Pseudomonas cepacia*, già impiegata nelle prove relative al mio lavoro di tesi specialistica insieme con nuove attività sperimentali, costituisce un passaggio importante nell’analisi dei dati ottenuti. I grafici 4B.34 e 4B.35 presentano due situazioni differenti:

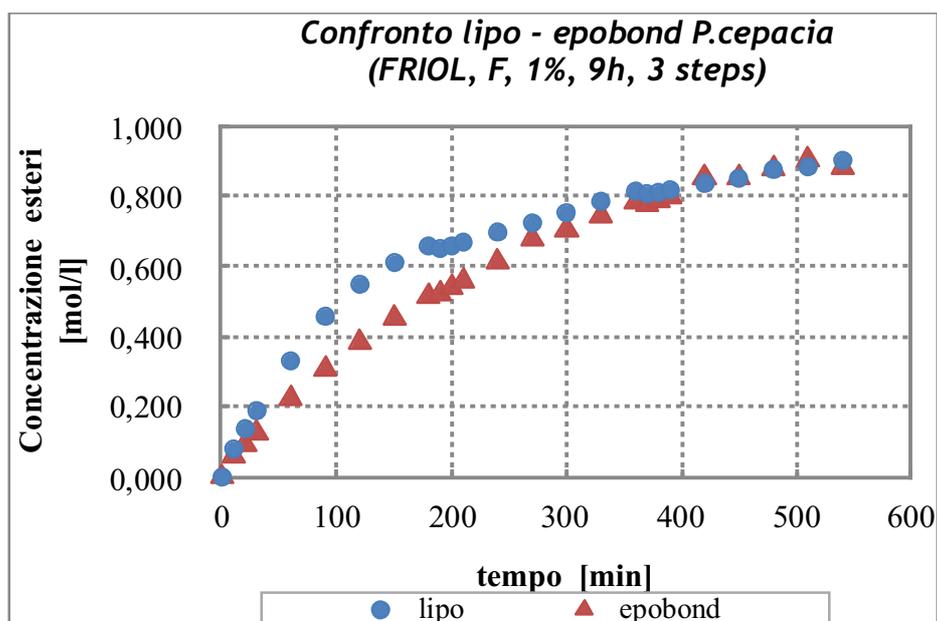


figura 4B.34: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della lipasi all'1%w/w (prove #10 e #13)

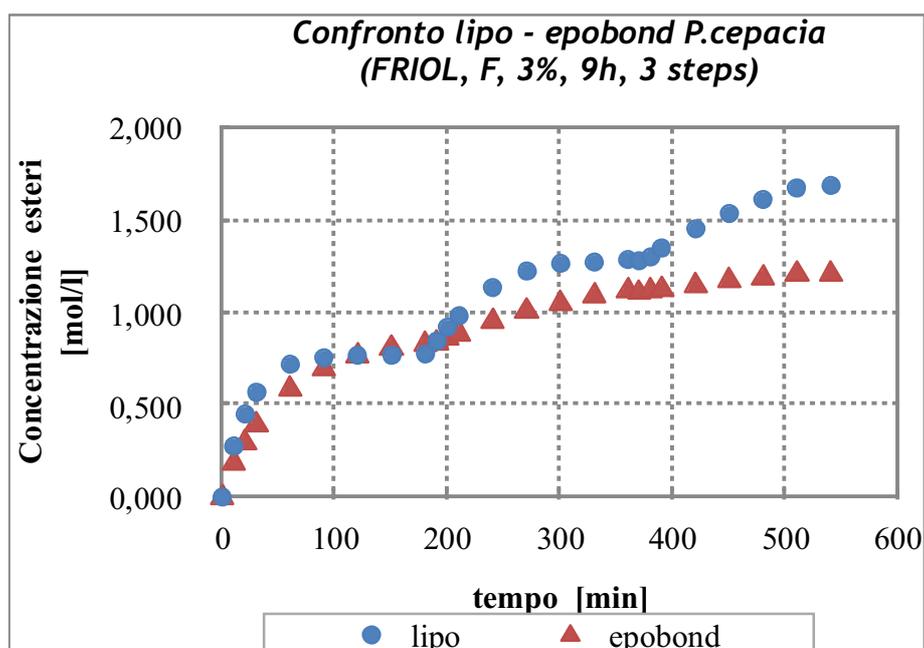


figura 4B.35: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della lipasi al 3%w/w (prove #11 e #14)

La condizione relativa all'1% w/w di catalizzatore non consente di apprezzare sostanziali differenze nell'impiego delle due lipasi, dal momento che dopo 9 ore di reazione si ottiene la stessa concentrazione di esteri etilici prodotti, come mostrato in figura 4B.34. Aumentando la quantità di catalizzatore, nelle figure 4B.35 e ancora di più

in figura 4B.36, si vede come dopo un primo *step* in cui le due lipasi mostrano simili prestazioni, nel secondo e nel terzo stadio si delinea nettamente la differenza tra le due reazioni enzimatiche che differiscono proprio nella lipasi impiegata: la lipo è più performante dell'epobond nelle stesse condizioni operative indicate. Se si calcola la resa finale in esteri nelle condizioni di reazione della 4B.36, la differenza tra i due casi è significativa: 62,5% w/w per la transesterificazione catalizzata dalla lipo contro il 40,7% w/w nel caso della reazione con l'epobond *P. cepacia*.

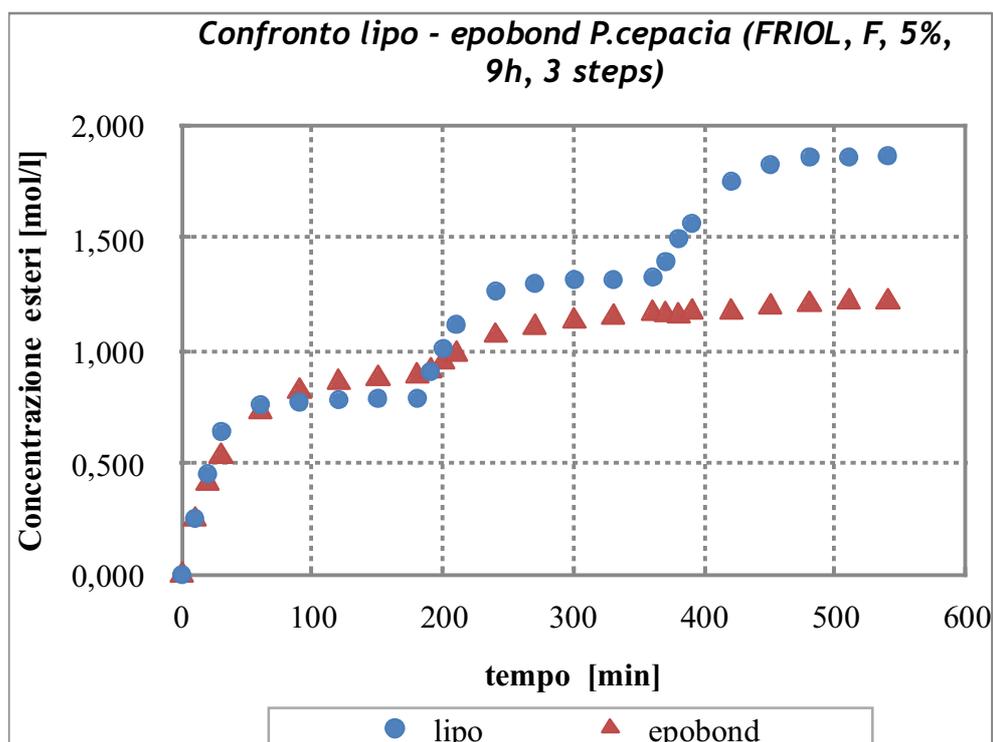


figura 4B.36: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della lipasi al 5%w/w (prove #12 e #15)

### 4.3B Fase sperimentale C

Nelle fasi *A* e *B* si sono condotte reazioni di transesterificazione su olio di frittura fresco al variare di alcune condizioni operative: due lipasi, lipo ed epobond *Pseudomonas cepacia*, caratterizzate da una diversa tecnica di immobilizzazione dell'enzima sul supporto; durata della reazione; diversa suddivisione dell'alimentazione dell'alcol; differenti concentrazioni del catalizzatore e diverso stato di questo, fresco o riutilizzato. I risultati ottenuti, l'analisi e la discussione dei dati rielaborati hanno consentito di trarre importanti informazioni e considerazioni sulla transesterificazione enzimatica condotta nel sistema in esame. Da questo punto si prosegue col testare l'epobond su oli di frittura esausti, al variare della quantità di catalizzatore, nel caso di lipasi fresca e alimentazione dell'etanolo in tre *steps*. Si riporta la tabella 2.10 che elenca le prove e le rispettive condizioni operative della fase *C*:

Fase sperimentale C (WCOs, epobond <i>P. cepacia</i> )					
Prova	durata [h]	olio	stato enzima	quantità enzima [%w/wolio]	N° steps alimentazione alcol
<b>30</b>	9	UCO	F, fresco	1%	3
<b>31</b>	9	UCO	F, fresco	3%	3
<b>32</b>	9	UCO	F, fresco	5%	3
<b>33</b>	9	WCO	F, fresco	1%	3
<b>34</b>	9	WCO	F, fresco	3%	3
<b>35</b>	9	WCO	F, fresco	5%	3

tabella 2.10: Prove sperimentali della fase C

Per l'olio esausto UCO si mostra il caso della prova #32:

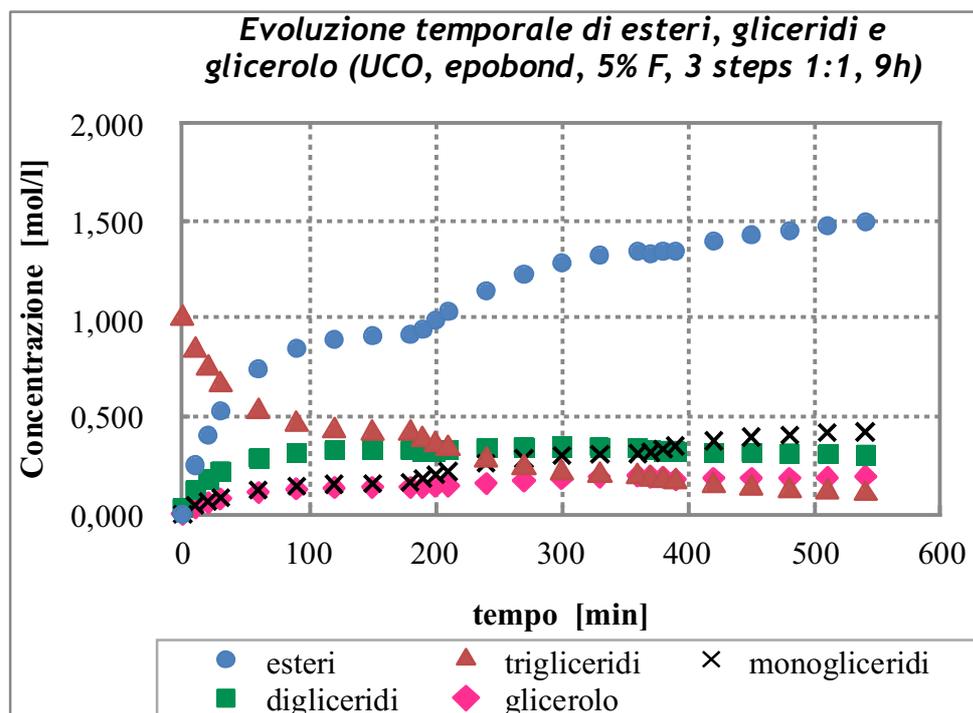


figura 4B.37: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #32)

Da questa figura si evince che la reazione di transesterificazione con lipasi fresca sull'olio esausto UCO procede velocemente nel primo stadio, mentre rallenta nel secondo e terzo *step*; in quest'ultimo non si raggiungono le condizioni di plateau: i trigliceridi continuano a consumarsi e gli esteri a formarsi, mentre i digliceridi, che si formano nei primi 100 minuti di reazione, mantengono questo valore di concentrazione costante nel secondo *step*, diminuendo poi di poco nel terzo stadio. Diverso destino attende i monogliceridi e il glicerolo: nel primo *step* si formano in concentrazioni molari molto vicine, mentre negli stadi successivi si osserva una variazione contenuta della quantità di glicerolo prodotto e un aumento considerevole della concentrazione dei monogliceridi. Dall'andamento di questi ultimi si deduce che la loro formazione è legata alla scomparsa dei trigliceridi e conseguentemente dei digliceridi nel corso della reazione; tuttavia, i dati riportati sono relativi alla quantità di tali composti nella miscela di reazione, per cui il raggiungimento di una condizione di plateau insieme con la diminuzione di concentrazione dei digliceridi e l'aumento del glicerolo nel terzo *step* suggeriscono che la transesterificazione procede nell'arco delle 9 ore considerate. In figura 4B.38 si riporta un esplosivo sui prodotti intermedi e sul glicerolo:

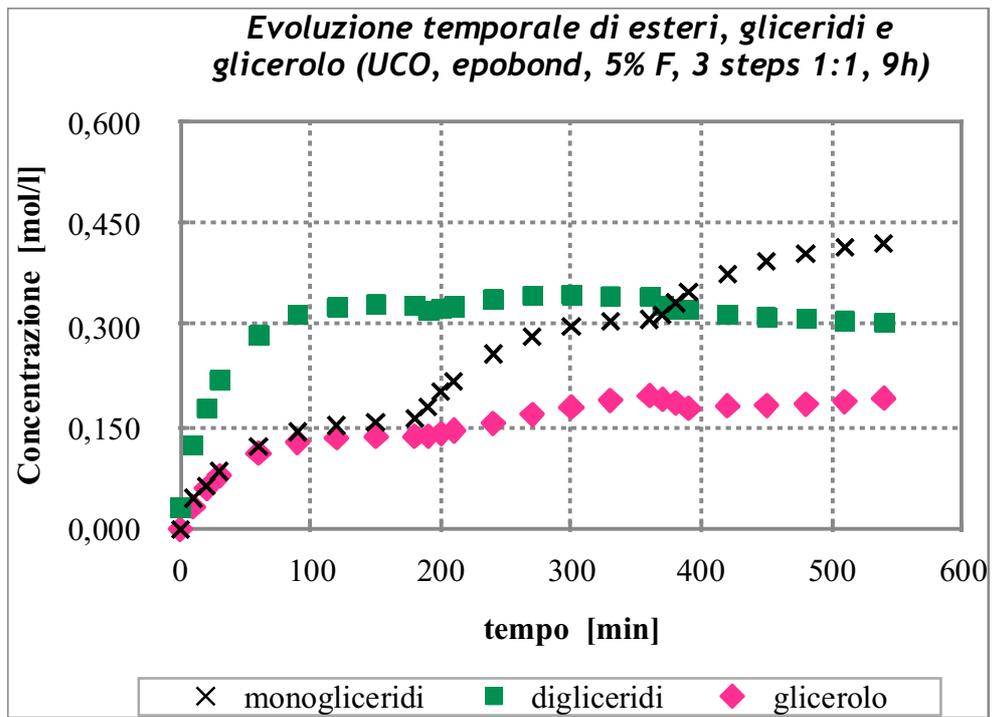


figura 4B.38: Andamento temporale di monogliceridi, digliceridi e glicerolo (prova #32)

Volendo confrontare anche in questa sede la performance della transesterificazione in termini di esteri prodotti e misurati nella miscela di reazione, si riporta il confronto tra i diversi andamenti al variare della quantità di lipasi impiegata:

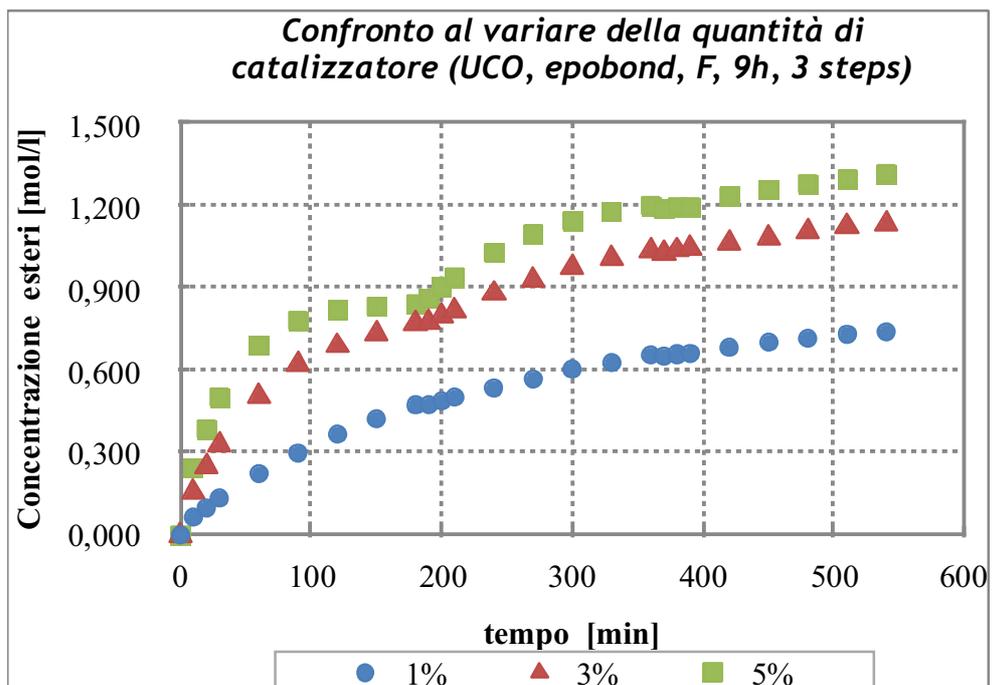


figura 4B.39: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della quantità di catalizzatore (prove #30, #31, #32)

La prova #30, relativa all'1% w/w, costituisce anche in questo caso una situazione poco vantaggiosa rispetto alle altre presentate; mentre l'aumento di catalizzatore al 3% (prova #31) e 5% w/w (prova #32) mostra il tipico andamento della concentrazione degli esteri nel tempo nel caso di reazioni con tre *steps* di alimentazione dell'alcol, sebbene non in tutti gli stadi si sia raggiunta la condizione di plateau. Un aumento di concentrazione della lipasi, come da previsione, porta a migliori capacità performanti per tutto il processo.

Analogamente per l'olio esausto WCO si riporta il caso di una prova (#34) in figura 4B.40 e il confronto sulle tre prove (#33, #34 e #35) nella 4B.41. Per queste prove valgono le stesse considerazioni dei casi sull'UCO.

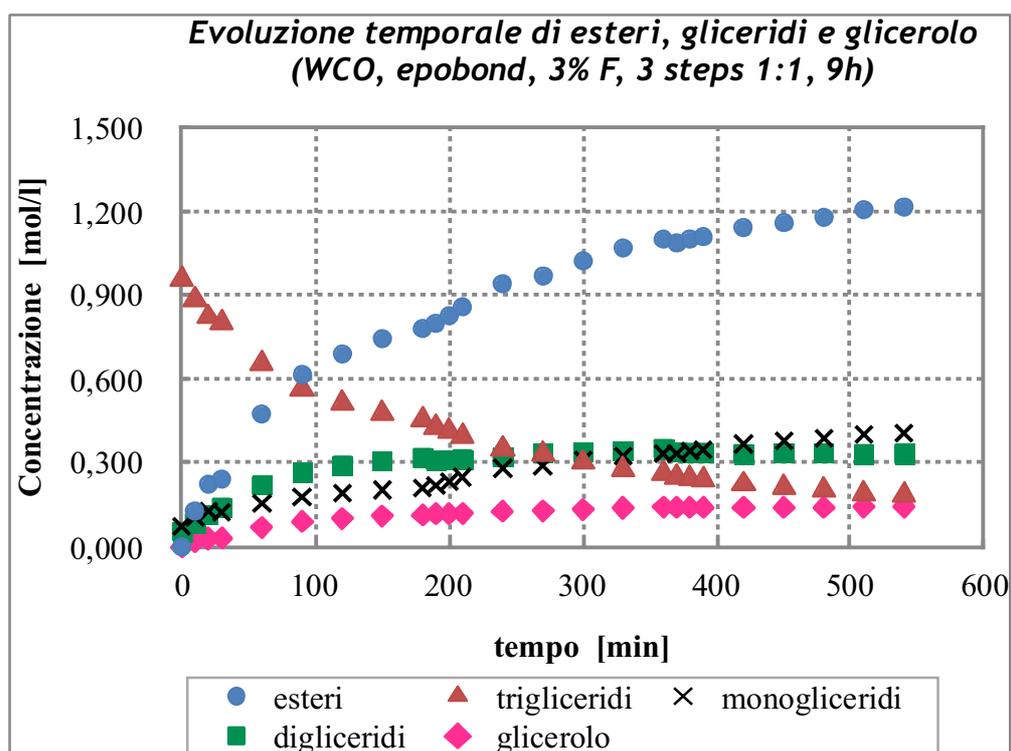


figura 4B.40: Andamento temporale di esteri, gliceridi e glicerolo (prova #34)

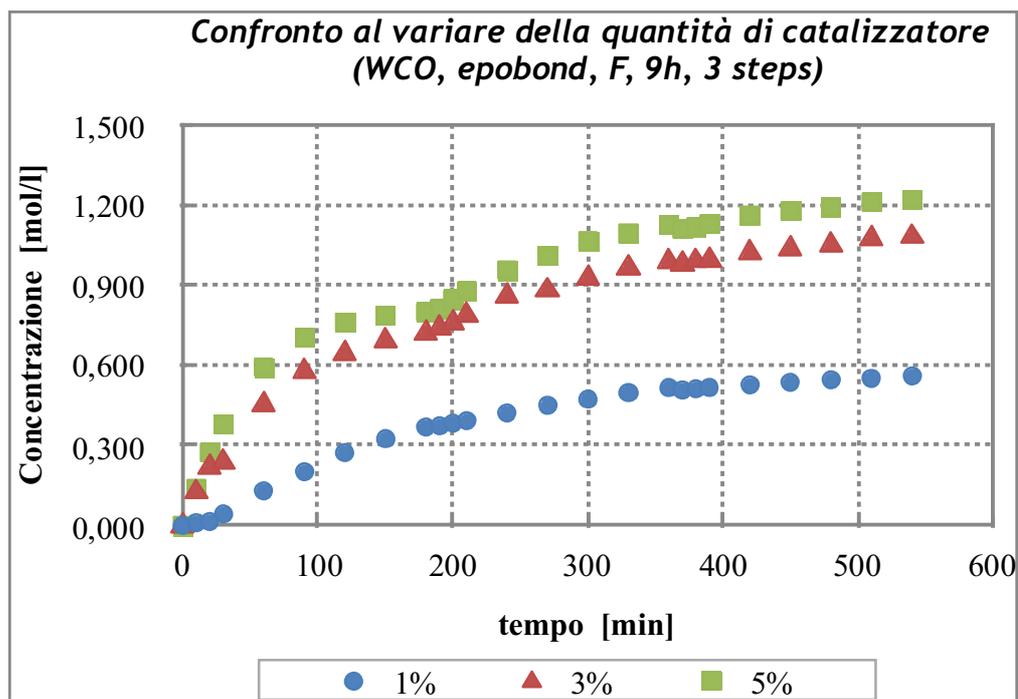


figura 4B.41: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare della quantità di catalizzatore (prove #33, #34, #35)

#### Confronto diversi tipi di olio

Si riporta il confronto tra i diversi tipi di olio in alcune prove con condizioni operative differenti, come ad esempio il caso delle figure 4B.42 e 4B.43, in cui varia la quantità di catalizzatore. In entrambi i casi l'olio fresco consente di ottenere concentrazioni di esteri maggiori, a parità delle altre condizioni. Gli oli UCO e WCO presentano, pertanto, valori di concentrazioni inferiori, anche se di poco.

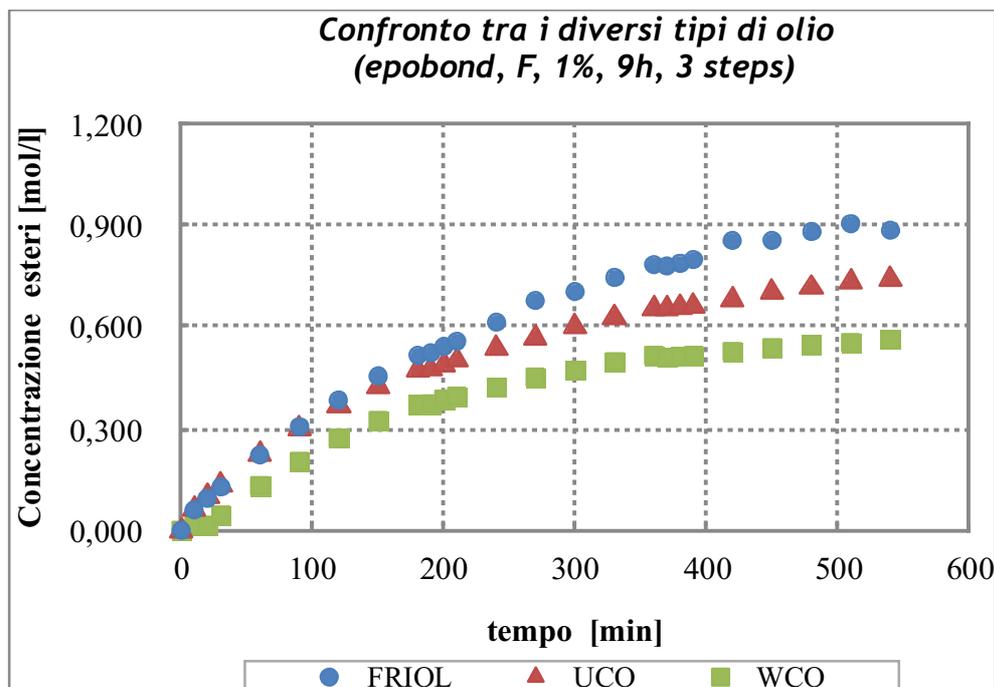


figura 4B.42: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del tipo di olio (prove #13, #30, #33)

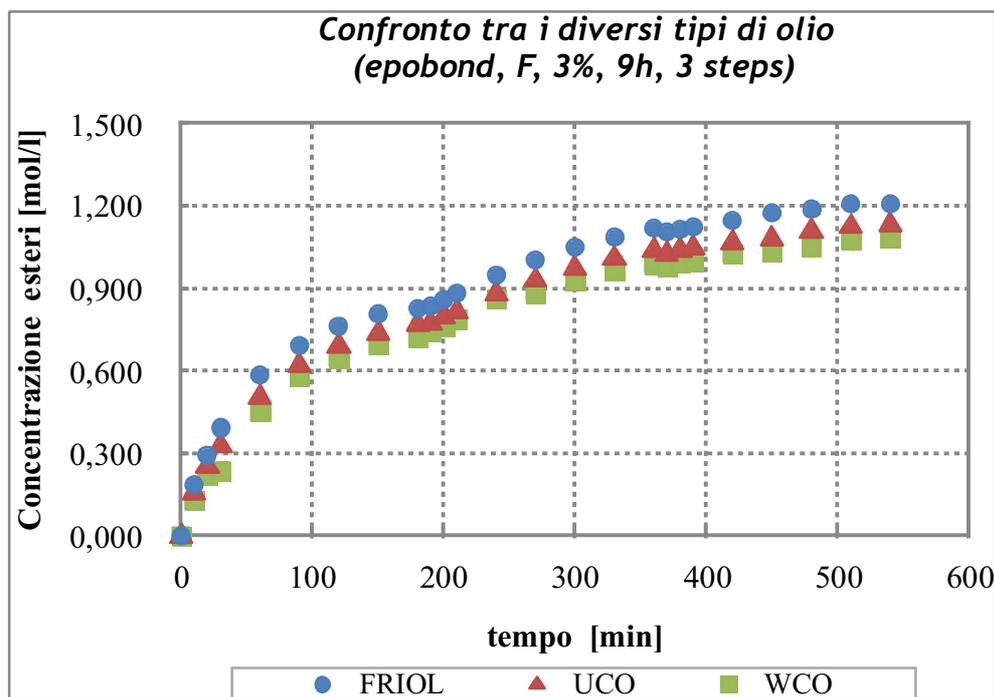


figura 4B.43: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del tipo di olio (prove #14, #31, #34)

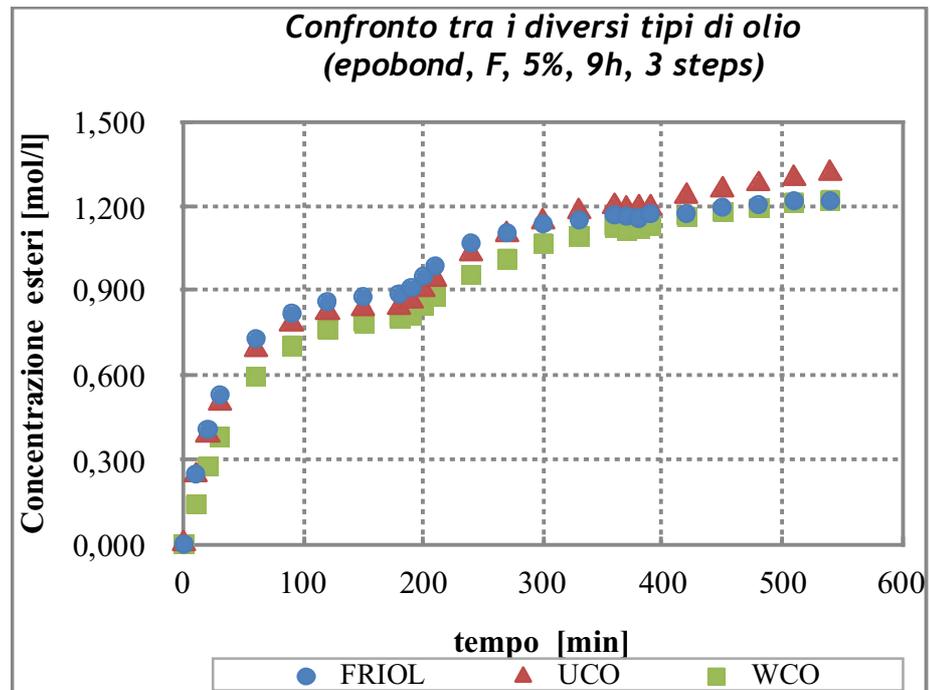


figura 4B.44: Confronto dell'andamento temporale degli esteri al variare del tipo di olio (prove #15, #32, #35)

Diverso è il caso presentato in figura 4B.44 e relativo al confronto tra i diversi tipi di oli impiegati nelle prove con il 5% w/w di lipasi: nel primo e nel secondo *step* i valori della concentrazione degli esteri ottenuti dalla transesterificazione di FRIOL e UCO sono molto vicini e in alcuni casi uguali, mentre quelli relativi alla prova sul WCO si discostano di poco dagli andamenti delle altre due. Nel terzo *step* la reazione presenta lo stesso andamento nei tre casi, in particolare nel caso del FRIOL e WCO i valori di concentrazione di esteri nel tempo sono molto vicini, mentre quelli relativi alla transesterificazione di UCO sono caratterizzati da valori maggiori istante per istante. Ciò si traduce, pertanto, in un valore di resa finale più alto per la prova con l'UCO e di poco inferiore per gli altri due casi trattati, come risulta dal grafico di figura 4B.45:

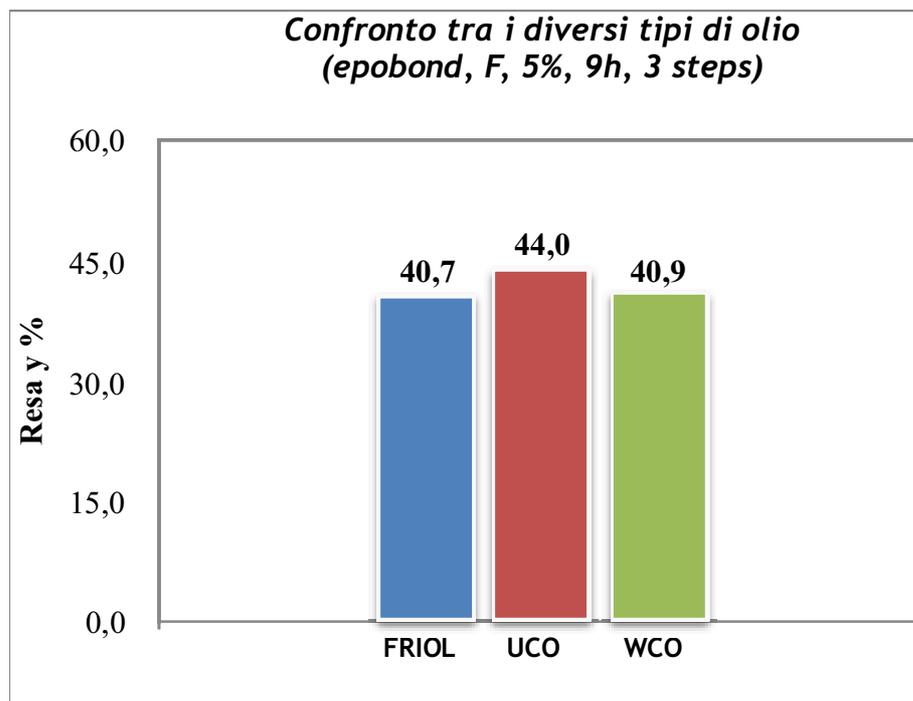


figura 4B.45: Confronto dei valori di resa al variare del tipo di olio (prove #15, #32, #35)

Nel campione di UCO considerato la transesterificazione dei gliceridi, ed eventualmente l'esterificazione dei FFAs presenti, porta ad una maggiore quantità di esteri prodotti rispetto agli altri casi esaminati nelle stesse condizioni operative. Tuttavia, i valori di resa sono vicini in tutte le prove con quantità di lipasi del 3% e 5% w/w, mentre riducendo la concentrazione del catalizzatore nel volume di reazione si interviene sulla prestazione della transesterificazione. Da ciò si deduce che lavorare con gli oli esausti può essere vantaggioso con quantità di lipasi superiori all'1% w/w.

#### 4.4B Confronti tra le prove delle fasi A, B e C

Si considerano tutte le prove esaminate nell'ambito delle fasi sperimentali A, B e C, con particolare attenzione a quelle condotte per 9 ore con lipasi fresca, lipo o epobond *Pseudomonas cepacia*, in quantità pari al 3% w/w. La prestazione delle reazioni considerate è valutata in termini di resa finale in esteri, definita come il rapporto tra la

massa di esteri prodotti e la massa di campione analizzata. Alla luce di ciò, nel caso di biocatalizzatore fresco si riportano i risultati del confronto nel seguente grafico:

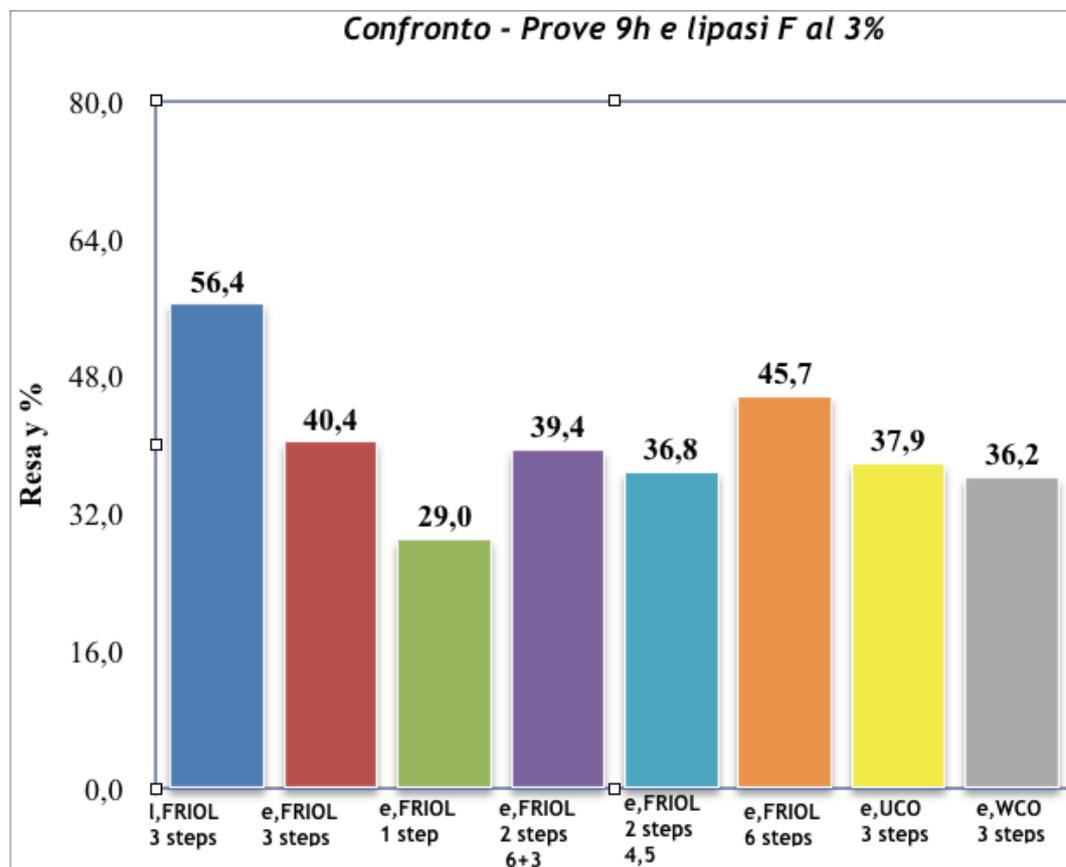


figura 4B.46: Confronto dei valori di resa per prove con catalizzatore fresco al 3% w/w (prove #11, #14, #22, #23, #24, #25, #31, #34)

in cui “l” si riferisce alla lipasi lipo *P. cepacia*, mentre “e” all’epobond. Per ogni istogramma si indica quindi, oltre alla lipasi e all’olio impiegati, la suddivisione in *steps* del periodo di reazione.

Nell’ambito di queste prove appare chiaro che la lipo, cioè la lipasi *Pseudomonas cepacia* immobilizzata su supporto mediante adsorbimento, consente di “spingere” la transesterificazione verso la formazione dei prodotti, a parità delle altre condizioni operative. Se si focalizza l’attenzione sulle prove con l’epobond, le prestazioni migliori si ottengono impiegando l’olio FRIOL ed alimentando l’etanolo in sei *steps* di uguale durata. Come si è visto, ciò consente di promuovere la transesterificazione soprattutto nelle ultime 2 - 3 ore, quando cioè la lipasi risente ormai dell’inibizione dovuta

all'etanolo residuo e al glicerolo prodotto, ma anche dello stress legato all'agitazione sostenuta. Pertanto la situazione dei 3 steps, largamente impiegata nella sperimentazione in catalisi enzimatica, comporta una perdita di produttività nell'ultimo step, sebbene rappresenti la condizione migliore nel primo stadio di reazione, come esaminato in figura 4.2.8B, soprattutto se si utilizza l'olio fresco. Tuttavia, risulta contenuta la diminuzione del valore di resa se si utilizza UCO o WCO al posto dell'olio FRIOL. In luogo dei tre steps, l'alimentazione in due tempi (6 ore il primo intervallo e 3 ore il secondo) costituisce un'alternativa da considerare, anche se queste prove confermano il risultato già atteso nella transesterificazione condotta con rapporto molare alcol:olio di 3:1, cioè pari a quello stechiometrico: l'inibizione dell'alcol, alla quale può sommarsi quella derivante dal glicerolo prodotto, rallenta la transesterificazione.

Un ulteriore confronto riguarda le prove di transesterificazione con la lipasi epobond P. cepacia, riutilizzata e in quantità pari al 3% w/w, sull'olio fresco FRIOL, come si osserva in figura 4B.47:

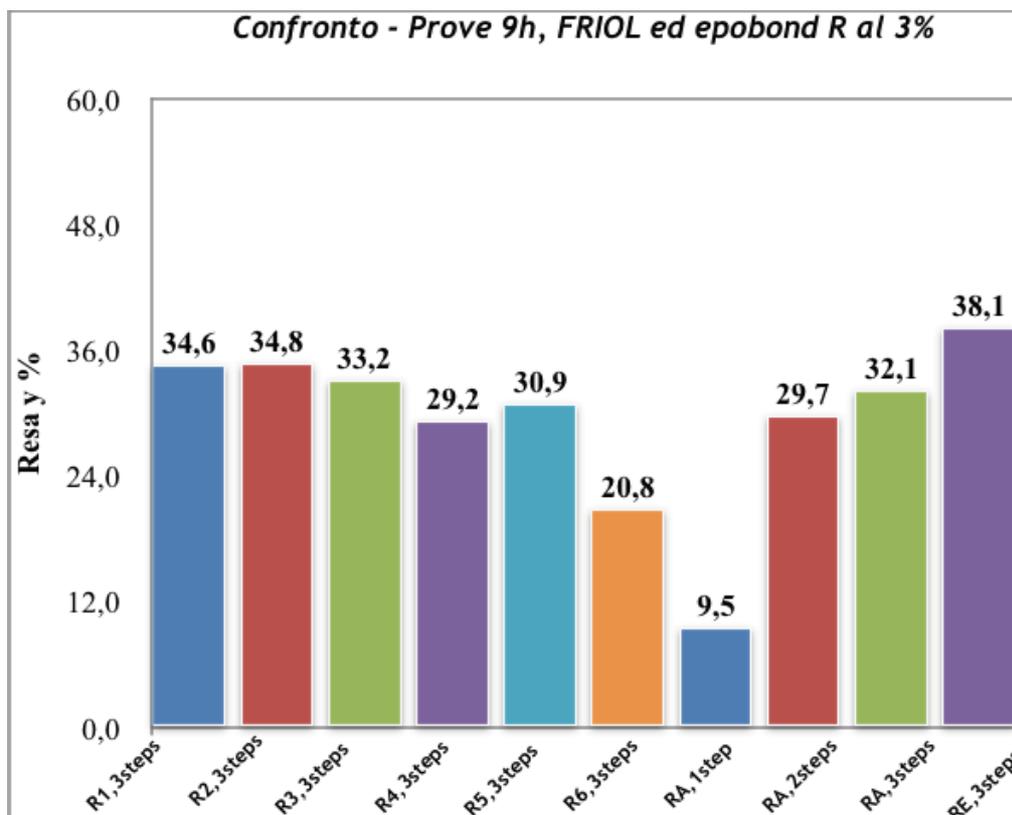


figura 4B.47: Confronto dei valori di resa per prove con catalizzatore riutilizzato al 3% w/w (prove #16, #17, #18, #19, #20, #21, #26, #27, #28, #29)

Come ricordato precedentemente con la sigla “R...” si indicano le prove in cui la lipasi è stata riutilizzata dopo un opportuno lavaggio con esano o con acqua (in questo caso “RA”). Da R1 a R6 si indicano le prove dalla #16 alla #21; nell’ultima barra la sigla “RE” riferisce al caso dello stesso campione di lipasi, in parte lavato con acqua e in parte con esano, impiegato nelle prove #26, #27, #28, #29.

Tra le condizioni esaminate, il lavaggio della lipasi con esano e il suo riutilizzo in reazioni che prevedono l’alimentazione dell’etanolo in 3 *steps* garantiscono risultati migliori rispetto alle situazioni con due alimentazioni dell’alcol o una sola. Pertanto, introdurre l’alcol in tre intervalli consecutivi di uguale durata costituisce una condizione vantaggiosa nella transesterificazione enzimatica dei gliceridi sia nel caso di oli freschi che esausti, con lipasi fresca o riutilizzata previo lavaggio con solventi.

#### 4.5B Applicazione del modello cinetico

Nel capitolo 2 si sono ottenute le seguenti espressioni delle equazioni cinetiche nel caso a) *senza* inibizione da etanolo e b) *con* inibizione da alcol:

a)

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{K_1[A][B] - K_2[P][Q]}{K_3[A] + K_4[B] + K_5[A][B] + K_6[P] + K_7[A][P] + K_8[Q] + K_9[B][Q] + K_{10}[P][Q]}$$

b)

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{K_1[A][B] - K_2[P][Q]}{K_3[A] + K_4[B] + K_5[A][B] + K_6[P] + K_7[Q] + K_8[P][Q] + K_9[A][Q] + K_{10}[B][Q] + K_{11}[B]^2 + K_{12}[B][P]}$$

*equazioni 2.4*

Tali equazioni sono complete dal punto di vista delle variabili, in quanto contengono al loro interno le concentrazioni dei reagenti e dei prodotti. Pur potendo misurarle tutte, non sarebbe possibile utilizzarle contemporaneamente per fare un *fitting* dei dati in dipendenza di tutte le variabili; per cui si procede col valutare le possibili correlazioni tra le concentrazioni mediante il metodo di riduzione delle variabili (Calabrò et al., 2010), applicato ad ogni *step* (Albo, 2013). In questo modo la concentrazione degli esteri [Q], dell'etanolo [B] e della somma di monogliceridi, digliceridi e glicerolo [P] sarà correlata a quella dei trigliceridi [A]. A questo scopo si è applicato tale metodo ai dati ricavati da alcune prove relative alla fase **B** e **C** (nel lavoro di tesi specialistica si era affrontato lo studio cinetico sui dati della fase **A**, nelle prove da #1 a #9), in cui si impiega dell'olio di frittura fresco ed esausto, e la lipasi Epobond *Pseudomonas cepacia* in quantità pari al 3% e 5% w/w. In questo ambito si intende considerare il caso relativo agli esausti; pertanto, si prende in esame l'UCO processato con il 3% w/w di biocatalizzatore (prova #31). La prova #30 è condotta con una quantità di catalizzatore dell'1% w/w e la reazione, come si è visto precedentemente, procede piuttosto lentamente. Ad esempio per la prova #31, per ogni *step*, si sono ottenute le seguenti correlazioni:

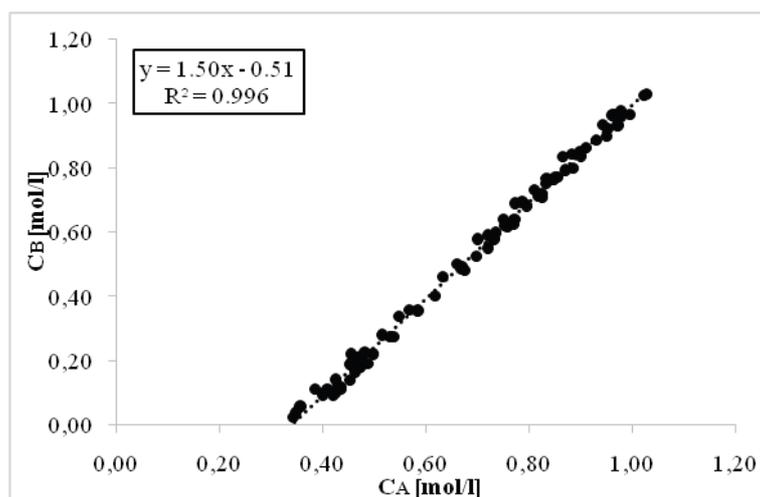


figura 4B.48: Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (1° step)

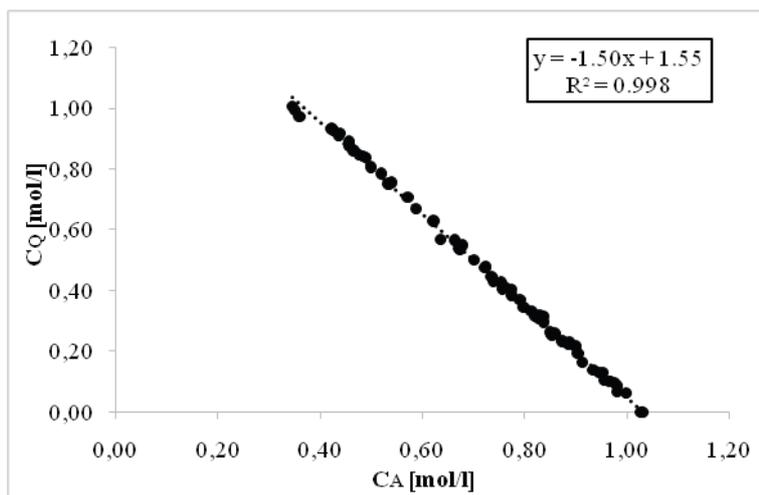


figura 4B.49: Correlazione degli esteri con i trigliceridi (1° step)

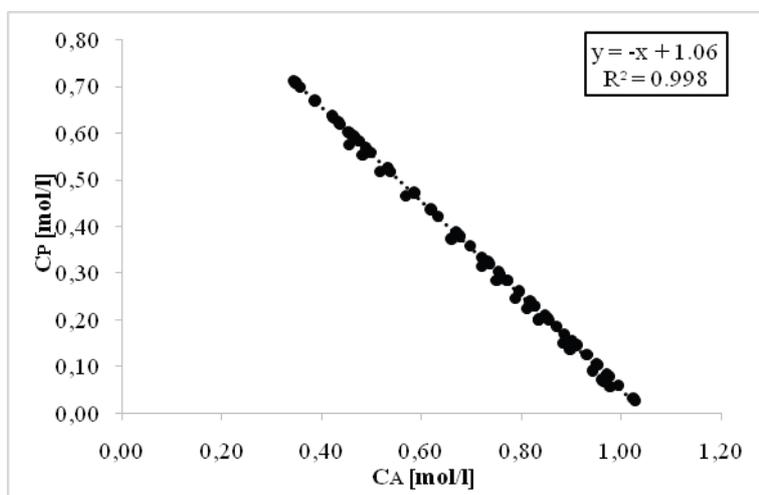


figura 4B.50: Correlazione dei monogliceridi + digliceridi + glicerolo con i trigliceridi (1° step)

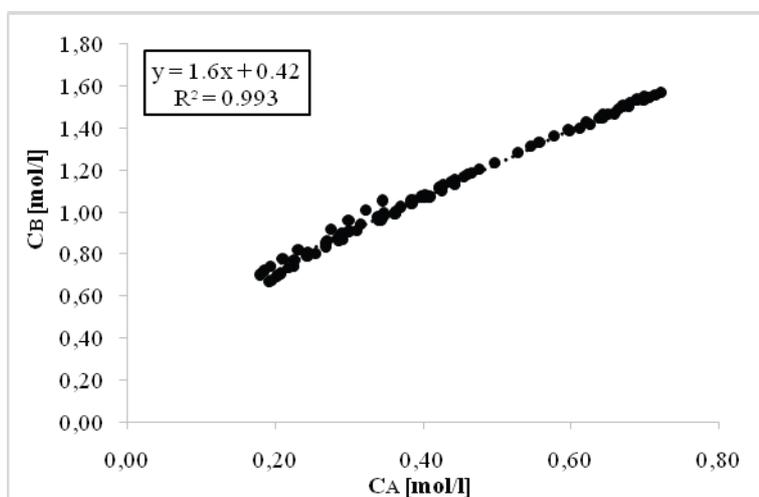


figura 4B.51: Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (2° step)

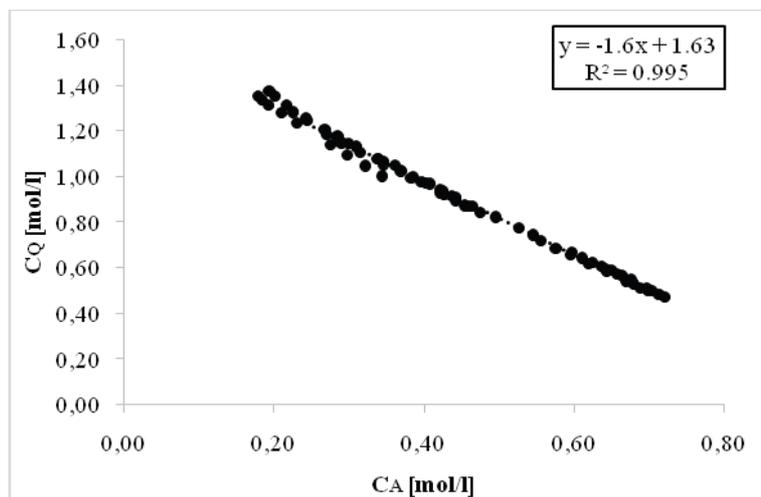


figura 4B.52: Correlazione degli esteri con i trigliceridi (2° step)

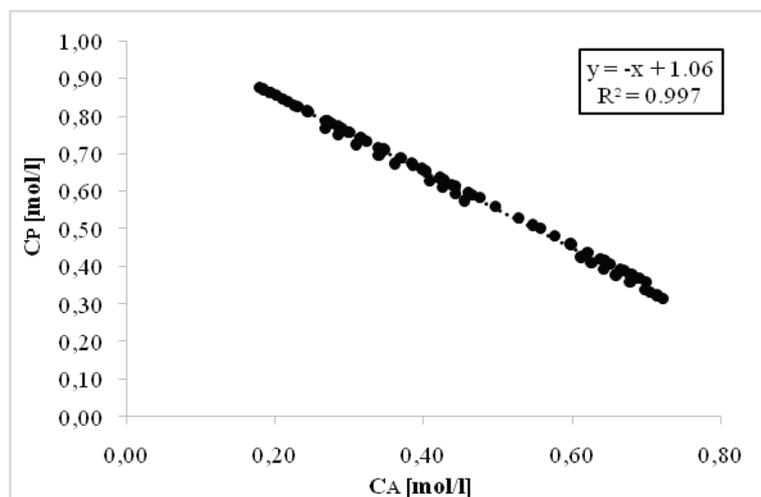


figura 4B.53: Correlazione dei monogliceridi + digliceridi + glicerolo con i trigliceridi (2° step)

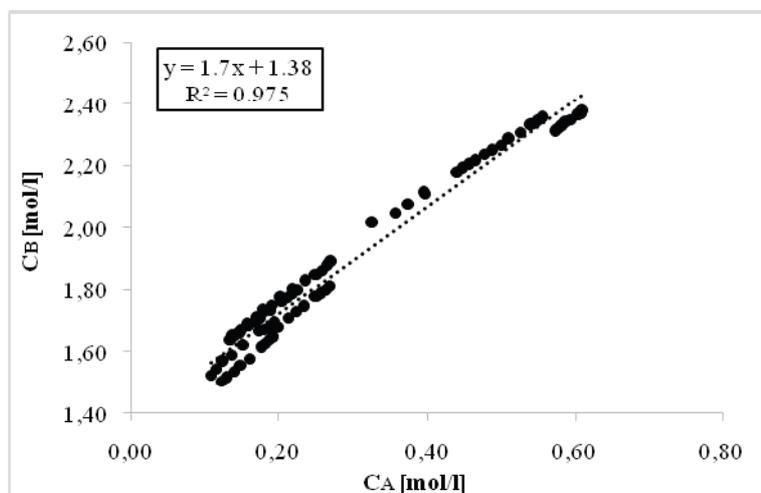


figura 4B.54: Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (3° step)

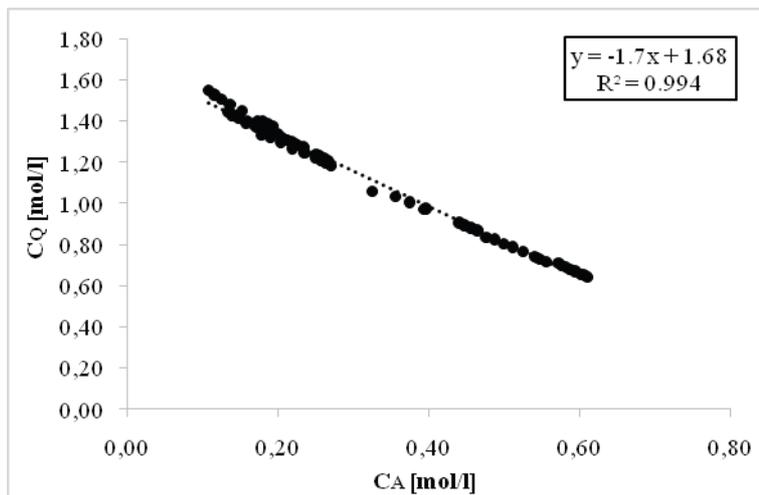


figura 4B.55: Correlazione degli esteri con i trigliceridi (2° step)

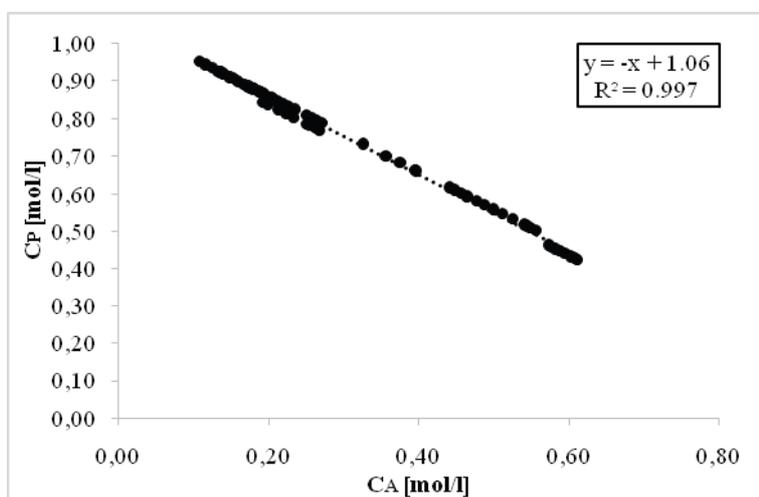


figura 4B.56: Correlazione dei monogliceridi + digliceridi + glicerolo con i trigliceridi (3° step)

Per ogni *step* valgono i seguenti bilanci di materia che tengono conto delle correlazioni trovate:

$$\text{Etanolo}(t) = \text{Etanolo iniziale} - a[\text{Trigliceridi iniziali} - \text{Trigliceridi}(t)]$$

$$\text{Esteri}(t) = b[\text{Trigliceridi iniziali} - \text{Trigliceridi}(t)]$$

$$\text{Mono-}(t) + \text{Di-}(t) + \text{Glicerolo}(t) = c[\text{Trigliceridi iniziali} - \text{Trigliceridi}(t)]$$

in cui  $a$  rappresenta le moli di etanolo reagite,  $b$  le moli di estere formate e  $c$  quelle di monogliceridi + digliceridi + glicerolo ottenute per mole di trigliceride convertita. Nella simbologia utilizzata si ottengono i seguenti bilanci per ciascuno *step*:

$$[B] = B_0 - a(A_0 - [A])$$

$$[Q] = Q_0 + b(A_0 - [A])$$

$$[P] = P_0 + c(A_0 - [A])$$

*equazioni 4B.1*

in cui  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $Q_0$  e  $P_0$  rappresentano nel seguente ordine le concentrazioni molari iniziali (al tempo  $t=0$ , primo *step*) di trigliceridi, etanolo, esteri e la somma monogliceridi - digliceridi - glicerolo.

Dalle correlazioni nelle figure da 4B.48 a 4B.56 si calcolano i coefficienti  $a$ ,  $b$  e  $c$  per i tre *steps*, riportati in tabella 4B.2:

	<b><i>a</i></b>	<b><i>b</i></b>	<b><i>c</i></b>
1° step	1,5	1,5	1
2° step	1,6	1,6	1
3° step	1,7	1,7	1

tabella 4B.2: Coefficienti  $a, b$  e  $c$  per i tre *steps* (prova #14, epobond al 3% w/w)

Mediante il metodo di riduzione delle variabili e sostituendo in ogni *step* le equazioni 4B.1 con i relativi coefficienti si possono ottenere delle espressioni della velocità di reazione in funzione della sola concentrazione dei trigliceridi; tuttavia le equazioni ricavate sono abbastanza complesse per poter essere ricondotte ad espressioni linearizzate. Pertanto il calcolo dei parametri deve essere fatto attraverso un *fitting* non lineare dei dati. In entrambi i casi, *con* e *senza* inibizione da etanolo, e per ogni *step* l'equazione cinetica assume la seguente espressione generale: (Albo, 2013):

$$\frac{r_Q}{[E]_0} = \frac{\alpha[A][B] - \beta[P][Q]}{[A]^2 + \gamma[A] + \delta}$$

equazione 4B.2

in cui  $r_Q$  è la velocità di formazione degli esteri in [mol/(l\*min)],  $[E]_0$  la concentrazione iniziale di lipasi in [g/g<sub>tot</sub>], le concentrazioni delle altre sostanze sono in [mol/l], i coefficienti  $\alpha$  e  $\beta$  hanno unità di misure espresse in [mol/(l\*min)],  $\gamma$  in [mol/l] e  $\delta$  in [(mol/l)<sup>2</sup>]. In analogia con il lavoro precedente il fitting non lineare dei dati è stato fatto in Excel con la funzione “Risolutore”, mediante la minimizzazione della somma degli scarti quadratici medi (equazioni 4B.3 e 4B.4):

$$scarto_i = r_Q|_{modello} - r_Q|_{sperimentale}$$

equazione 4B.3

$$\sum_i \ln \sqrt{1 + scarto_i^2}$$

equazione 4B.4

Si integra nel tempo con il metodo di Eulero il sistema di equazioni cinetiche, tenendo conto che la velocità di reazione può essere espressa in termini di velocità di formazione degli esteri (eq. 4B.5) o di scomparsa dei trigliceridi  $-r_A$ , legata a  $r_Q$  in virtù della stechiometria di reazione (equazione 4B.6):

$$r_Q = \frac{d[Q]}{dt} \quad \text{equazione 4B.5}$$

$$-r_A = \frac{r_Q}{3} \quad \text{equazione 4B.6}$$

Discretizzando nel tempo, si può valutare la concentrazione dei trigliceridi all'istante di tempo (i+1) mediante l'equazione 4B.7:

$$[A]_{i+1} = [A]_i - \frac{1}{3} r_{Q,i} \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

equazione 4B.7

Noto il valore di  $[A]_i$ , si calcolano anche le concentrazioni di etanolo  $[B]_i$ , di estere  $[Q]_i$  e della somma monogliceridi - digliceridi - glicerolo  $[P]_i$ , attraverso i bilanci di materia relativi a ciascuno *step*.

Nel caso in cui l'olio esausto UCO sia processato nella transesterificazione con il 3% w/w di lipasi (prova #31) si ottiene quanto riportato nella seguente tabella:

<i>parametro</i>	<b>1° step</b>	<b>2° step</b>	<b>3° step</b>
<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>4,03 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b><math>2,72 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>1,50 \cdot 10^{-3}</math></b>
<b><math>\beta</math></b>	<b><math>4,19 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>9,08 \cdot 10^{-5}</math></b>	<b><math>5,14 \cdot 10^{-5}</math></b>
<b><math>\gamma</math></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,013</b>
<b><math>\delta</math></b>	<b>7,306</b>	<b>18,228</b>	<b>26,37</b>
<b><math>R^2</math></b>	<b>0,95</b>	<b>0,94</b>	<b>0,95</b>

tabella 4B.3: Parametri cinetici per il modello Ping Pong Bi Bi (prova #31)

Dai risultati ottenuti si nota un buon accordo con i punti sperimentali, per cui il modello *Ping Pong Bi Bi* conferma il meccanismo ipotizzato anche nel caso di catalisi enzimatica con la lipasi Epobond *P. cepacia* su oli esausti. Si è visto che tale modello porta ad un'espressione generale dell'equazione cinetica (equazione 4B.2) e l'eventuale inibizione da substrato o prodotto può essere contemplata solo all'interno dei parametri cinetici.

Sostituendo nel modello le condizioni operative ed iniziali delle prove sperimentali e tenendo in conto l'equazione di progetto del reattore batch in termini di velocità di scomparsa dei trigliceridi, oltre che di formazione degli esteri (eq. 4B.5), si ottiene:

$$-r_A = -\frac{d[A]}{dt}$$

*equazione 4B.8*

L'equazione generale per il modello cinetico presentato (eq. 4B.2), considerando la relazione stechiometrica presentata nell'equazione 4B.6, è sostituita nell'espressione riportata nella 4B.7, ricavandosi:

$$[A]_{i+1} = [A]_i - \frac{\alpha[A]_i[B]_i - \beta[P]_i[Q]_i}{[A]_i^2 + \gamma[A]_i + \delta} \cdot [E_0] \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

equazione 4B.9

Per il calcolo delle concentrazioni degli altri composti si tengono in conto i bilanci di materia relativi ad ogni *step* (equazioni 4B.1).

Pertanto, si intende confrontare gli andamenti sperimentali dei vari composti nel tempo con quelli ricavati dal modello nel caso della prova #31 (olio esausto UCO, transesterificazione con lipasi epobond *P. cepacia* al 3% w/w):

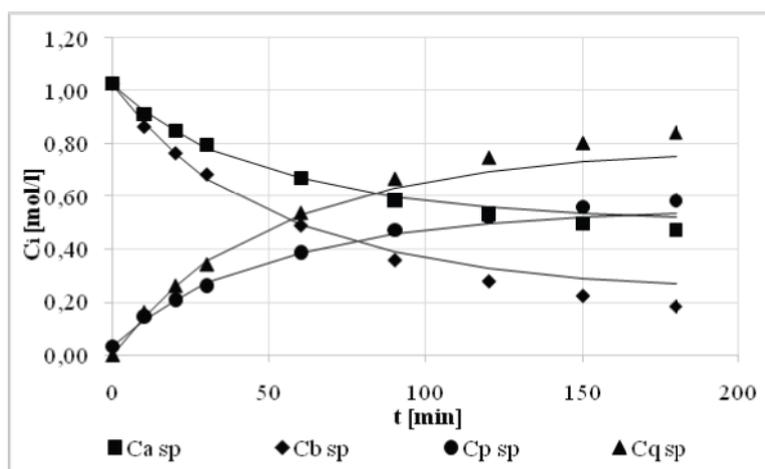


figura 4B.57: Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico (linea continua) e i valori sperimentali (punti) nel 1° step della #31

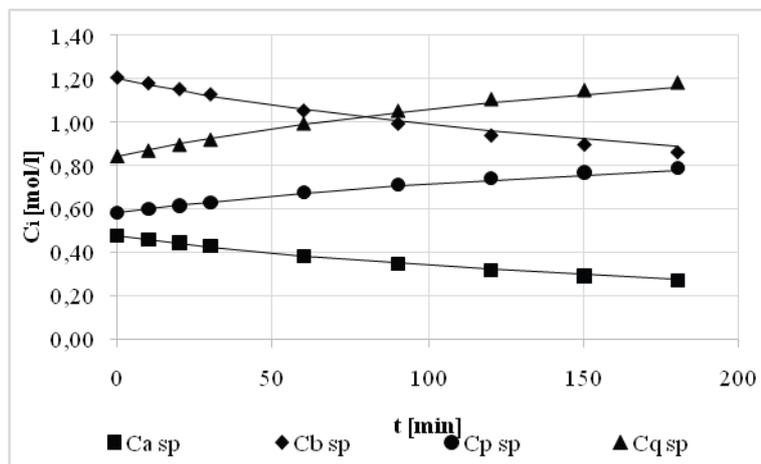


figura 4B.58: Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico (linea continua) e i valori sperimentali (punti) nel 2° step della #31

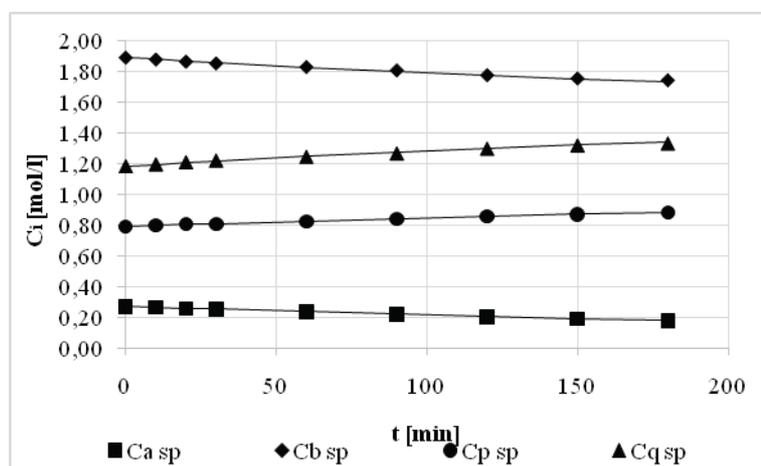


figura 4B.59: Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico (linea continua) e i valori sperimentali (punti) nel 3° step della #31

Dai risultati presentati si osserva l'ottimo riscontro tra i dati ottenuti con il modello e i punti sperimentali. Come già ottenuto nei lavori precedenti (Calabrò 2010; Albo 2013), in cui si erano utilizzate la Lipozyme MM IM e la lipasi Lipo *Pseudomonas cepacia*, anche nel caso di reazioni catalizzate dall'Epobond *P. cepacia* su olio esausto, il modello *Ping Pong Bi Bi* risulta idoneo a descrivere la cinetica della transesterificazione enzimatica; ciò lo rende adatto ad un eventuale *scale - up* del processo.

## *Parte IB: Transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti*

### **Capitolo 5B: Conclusioni e sviluppi futuri**

La parte *IB* di questo lavoro di ricerca affronta lo studio della reazione di transesterificazione enzimatica di oli freschi ed esausti con etanolo. In particolare nell'ambito delle fasi sperimentali *B* e *C* si è testata la performance della lipasi Epobond *Pseudomonas cepacia* come catalizzatore nella transesterificazione di olio di frittura fresco FRIOL al variare di alcune condizioni operative e successivamente si considerano due tipi di oli esausti. Si è valutato che, sia su oli freschi che esausti, uno dei parametri fondamentali è la quantità di catalizzatore nell'ambiente di reazione: in ogni caso l'1% w/w di lipasi immobilizzata rappresenta un'alternativa poco vantaggiosa per promuovere il processo, mentre la differenza tra le prestazioni al 3% e al 5% w/w sono poco significative. Perciò, nell'approfondimento degli aspetti della reazione catalizzata dall'epobond si è considerata una quantità fissata di lipasi al 3% w/w, variando invece altre condizioni operative quali lo stato del biocatalizzatore, fresco o riutilizzato, il tipo di solvente adoperato per il lavaggio, il numero degli *steps* di alimentazione dell'alcol. Come discusso nel capitolo 4B, la reazione di transesterificazione con lipasi epobond *P. cepacia*, fresca e in quantità pari al 3% w/w, caricata nel bioreattore con olio vegetale fresco e alimentazione dell'etanolo in tre *steps* consecutivi di uguale durata, presenta buoni valori di resa, soprattutto se confrontati agli altri casi. Tuttavia nelle ultime ore di reazione l'introduzione di etanolo in più *steps* - come accade per il caso in cui l'alcol è somministrato in sei momenti distinti di uguale durata - garantisce il raggiungimento di rese % in esteri finali maggiori. Con uguale quantità di biocatalizzatore si ottengono apprezzabili rese anche nel caso di oli esausti, sia l'UCO che il WCO. In questi processi la voce di costo predominante è costituita dal biocatalizzatore, per cui si è valutata la possibilità di separare, recuperare, purificare e

reimpiegare la lipasi in nuovi cicli di reazione: il lavaggio con esano è più efficace rispetto al caso dell'acqua distillata e la perdita di lipasi prima del suo riutilizzo è piuttosto contenuta. Inoltre, si è valutato che è possibile riutilizzare il biocatalizzatore per 5 cicli prima che si abbia una sostanziale riduzione della sua attività catalitica. Questa analisi, relativa alle fasi sperimentali *B* e *C*, fornisce un quadro abbastanza completo ed esaustivo, se a queste si affianca la discussione dei risultati ottenuti nella fase *A*. Si osserva come la Lipo *Pseudomonas cepacia*, nel bioreattore e nelle condizioni operative implementate, consente di raggiungere prestazioni migliori rispetto al caso dell'Epobond *P. cepacia*; tutto ciò è probabilmente legato alle differenze sostanziali tra i due tipi di lipasi: la tecnica di immobilizzazione e il tipo di supporto. Tuttavia lo studio condotto finora ha messo in luce alcuni aspetti significativi della reazione e sottolineato il ruolo delle variabili di processo. Ad esempio, in diversi casi si è evidenziato che la transesterificazione non è conclusa in determinate condizioni operative e che a tempi lunghi (24 - 48 ore) si misura una concentrazione in esteri significativamente più alta di quella valutata al termine delle 9 ore considerate per lo studio in esame. Quantità maggiori di lipasi nell'ambiente di reazione, soprattutto nel caso della Lipo, assicurano valori di resa maggiori in tempi minori. L'inibizione della lipasi da parte dell'etanolo, ed eventualmente dal glicerolo prodotto, così come una parziale ostruzione dei siti attivi dell'enzima dovuta alle molecole dei gliceridi non convertiti, possono aprire il campo ad ulteriore approfondimento del processo qui analizzato.

Sebbene l'obiettivo di tale processo sia rappresentato dall'ottenimento di una miscela di esteri etilici di acidi grassi (FAEEs), in questa sede non è stata finora considerata la destinazione d'uso di tale prodotto né sono stati previsti trattamenti di purificazione mirati. Oltre che essere utilizzata come biofuel, in analogia a quanto già presentato nella parte *IA* per la catalisi basica di oli freschi ed esausti, la miscela di esteri alchilici può essere impiegata per l'ottenimento di materiali a cambiamento di fase (*Phase Change Materials*), noti con l'acronimo *PCMs*. Questi materiali nascono dall'esigenza di rispondere alla richiesta di energia e alla necessità di contenere le emissioni di gas nocivi nell'ambiente. Pertanto, una recente ed importante soluzione può essere rappresentata da materiali che accumulano l'energia in idonee forme, nelle quali questa può essere convertita. Inoltre, l'accumulo di energia non solo riduce il *gap* tra la sua richiesta e fornitura, ma anche consente di migliorare la performance e l'affidabilità dei

sistemi energetici, giocando un ruolo importante nella conservazione dell'energia stessa e rendendo tali sistemi più efficienti mediante la riduzione dello spreco di energia e dei costi capitali. Perciò, una delle tecnologie più promettenti nell'accumulo di energia termica è costituita dall'impiego dei PCMs; le diverse forme energetiche che possono essere accumulate sono di natura meccanica, elettrica e termica. In particolare, l'accumulo di energia termica prevede una variazione dell'energia interna del materiale in termini di calore sensibile, calore latente ed energia termochimica, o in una combinazione di queste. Tra le diverse tecniche di accumulo di energia termica, quella relativa allo *storage* di calore latente risulta essere particolarmente promettente grazie alla capacità di fornire un'elevata densità di accumulo energetico e alla peculiare caratteristica di accumulare energia in condizioni di temperatura costante, rappresentata dal valore relativo al passaggio di fase del materiale PCM, sia essa solido – solido, solido – liquido, solido – gas, e viceversa (Sharma et al., 2009). Nelle transizioni solido – solido si accumula calore latente quando il materiale impiegato è trasformato da una forma cristallina in un'altra. Questo tipo di transizioni sono generalmente caratterizzate da bassi valori del calore latente e piccole variazioni volumetriche, se comparate ai passaggi di fase solido – liquido. Ciò nonostante queste transizioni presentano il vantaggio di una maggiore flessibilità nella fase progettuale. Maggiori sono le quantità di calore latente accumulato nei passaggi di stato solido – liquido e liquido – gas, ma si devono considerare le grandi variazioni in volume ad essi associati e la loro reale applicazione nei sistemi di accumulo di energia termica, che rendono il sistema stesso più complesso e di scarso impiego pratico. Di contro le transizioni solido – liquido presentano dei valori di calore latente relativamente più bassi rispetto a quelle liquido – gas, ma risultano essere economicamente promettenti per il loro utilizzo nei sistemi di accumulo di energia termica. Un generico sistema di accumulo di calore latente deve possedere un opportuno PCM, il cui punto di fusione cade nel range di temperatura desiderato; un'opportuna superficie di scambio di energia e un adatto dispositivo contenente il PCM e compatibile con esso (Zalba et al., 2003).

Essendo i PCM solitamente dei materiali di accumulo di calore latente nelle transizioni solido – liquido o liquido – solido, inizialmente nei passaggi di stato solido – liquido si comportano come materiali di accumulo convenzionali, per cui la loro temperatura aumenta quando assorbono calore. Tuttavia, diversamente dai materiali convenzionali, i PCMs assorbono e rilasciano calore ad un valore di temperatura relativamente costante.

È necessario che questi materiali esibiscano determinate proprietà termiche (idonea temperatura di cambiamento di fase ed elevato calore latente di transizione), fisiche (equilibrio di fase, elevata densità, piccole variazioni volumetriche), cinetiche (no sottoraffreddamento e una buona velocità di cristallizzazione), chimiche (stabilità chimica a lungo termine, compatibilità con i materiali da costruzione, no tossicità e no pericolosità esplosiva) ed economiche. Un gran numero di materiali a cambiamento di fase (organici, inorganici ed eutettici) sono disponibili in ogni *range* di temperatura considerato; diversi materiali organici ed inorganici possono essere identificati in base alla temperatura e al calore latente di fusione. Generalmente i composti inorganici hanno capacità di accumulo di calore latente in termini volumetrici pari al doppio dei composti organici. I PCMs organici possono essere classificati in paraffinici e non – paraffinici; questi materiali fondono e si raffreddano ripetutamente senza segregazione di fase e conseguente degradazione dei loro calori latenti; cristallizzano senza sottoraffreddamento e sono solitamente non corrosivi. I materiali paraffinici consistono di una miscela di alcani a catena prevalentemente lineare  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$ , la cui cristallizzazione rilascia una grande quantità di calore latente. Sia il punto di fusione che il calore latente ad essa associato aumentano con la lunghezza della catena. Le paraffine risultano essere dei buoni PCMs grazie alla loro disponibilità in ampi *range* di temperatura; inoltre, sono sicure, affidabili, poco costose, non corrosive, chimicamente inerti, stabili al di sotto dei 500°C; mostrano piccole variazioni volumetriche durante la fusione, condizione alla quale sono bassi i valori di tensione di vapore. In virtù di queste caratteristiche i sistemi che impiegano materiali paraffinici hanno cicli di fusione – congelamento molto lunghi. Tuttavia, mostrano alcune proprietà svantaggiose: bassa conducibilità termica, incompatibilità con i contenitori di plastica e moderata infiammabilità.

I PCMs maggiormente utilizzati sono i composti organici non paraffinici, quali alcuni esteri, gli acidi grassi, gli alcoli e i glicoli (Aydin, 2012; Yuan et al., 2013). Questi composti sono infiammabili, motivo per cui non possono essere esposti a temperature eccessivamente alte, a fiamme ed agenti ossidanti. Alcune caratteristiche di questi materiali sono così sintetizzate: elevato calore di fusione, infiammabilità, bassa conducibilità termica, bassi punti di *flash*, diversi livelli di tossicità ed instabilità ad elevate temperature. In particolare, gli acidi grassi presentano elevati valori di calore di

fusione, confrontabili con quelli delle paraffine; inoltre, presentano un comportamento riproducibile durante i processi di fusione e congelamento senza sottoraffreddamento . In questo ambito, perciò, la miscela purificata di esteri etilici di acidi grassi può essere considerata come materiale a cambiamento fase, dopo averne valutato i valori di temperatura ed entalpia di fusione. Ottenuti questi risultati, si potrà individuare anche il campo di applicazione dei PCMs costituiti da miscele di esteri di acidi grassi.

## Bibliografia

### Parte I

1. Agarwal & Das (2001), *Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines*. J. Eng. Gas Turbines Power 123 (2), 440-447.
2. Agarwal et al. (2012), *Study of catalytic behavior of KOH as homogeneous and heterogeneous catalyst for biodiesel production*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 43, 89-94.
3. Ahmad et al. (2010), *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 15, 584.
4. Albo L. (2013), *Analisi sperimentale e moderazione cinetica della transesterificazione enzimatica con lipasi immobilizzata di oli commerciali con riutilizzo del biocatalizzatore*, (mia) Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Chimica (A.A. 2012/2013).
5. Alireza et al. (2010), *Effect of frying process on fatty acid composition and iodine value of selected vegetable oils and their blends*. International Food Research Journal 17: 295-302.
6. Al-Zuhair et al. (2009), *Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase*, Biochemical Engineering Journal 44, 256 - 262.
7. Anderssen et al. (2007), *Localised production and supply of biodiesel from used cooking oils*. BIODIENET IEE Project.
8. Arquiza et al. (2000), *production of biodiesel and oleochemicals from used frying oil*, Doctor Philosophy, University of the Philippines, Los Banos.
9. Aydin (2012), *Fatty acid ester-based commercial products as potential new phase change materials (PCMs) for thermal energy storage*, Solar Energy Materials & Solar Cells 108, 98 - 104.
10. Aydin & Bayindir (2010), *Renewable Energy*, 35, 588.
11. Azocar et al. (2010), *Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils*, Applied Microbiology and Technology 88 (3), 621 - 636.
12. Bagatti et al. (2010), *Conoscere la materia, 2a ed., Chimica organica*, Zanichelli Editore.
13. Bajaj et al. (2010), *Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 62, 9 - 14.

14. Balat (2008), *Biodiesel fuel production from vegetable oils via supercritical ethanol transesterification*, Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects, 30 (5), 429-440.
15. Banapurmath et al. (2009), *Proc. Inst. Mech. Eng., Part A.*, 223, 31.
16. Banerjee & Chakraborty (2009), *Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production - a review*, Resources, Conservation and Recycling, 53, 490-497.
17. Basu & Norris (1996), *Process for production of esters for use as a diesel fuel substitute using a non-alkaline catalyst*, US Patent: 55-56.
18. Belafi - Bako (2002), *J. Biocatl. Biotransf.* 20, 437 - 439.
19. Berchmans & Hirata (2008), *Biodiesel production from crude Jatropha cruces L. seed oil with a high content of free fatty acids*, Bioresour. Tech. 99, 1716-21.
20. Berrios et al. (2008), *Comparison of purification methods for biodiesel*, Chemical Engineering Journal, 144, 459-465.
21. Berrios et al. (2011), *Purification of biodiesel from used cooking oils*, Applied Energy, 88, 3625-3631.
22. Bisswanger (2002), *Enzyme kinetics - principles and methods*, John Wiley and sons Ltd, 115 - 120.
23. Bruice (2012), *Chimica organica*, EdiSES.
24. Bunyakiat et al. (2006), *Continuous production of biodiesel via transesterification from vegetable oils in supercritical methanol*, Energy and Fuels, 20 (2), 812-817.
25. Calabrò et al. (2010), *Kinetics of enzymatic transesterification of glycerides for biodiesel production*, Bioprocess Biosyst. Eng. 33 (6), 701 - 710.
26. Calais et al.(2012), *Waste vegetable oil as a diesel replacement fuel*, Environmental Science, Murdoch University and Western Australian Renewable Fuels Assn, Inc., Perth, Australia.
27. Catalano (2004), *Studio cinetico sperimentale della transesterificazione enzimatica per la produzione di biodiesel*, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica (A.A. 2003/2004).
28. Charoenchaitrakool & Thienmethangkoon (2011), *Statistical optimization for biodiesel production from waste frying oil through two-step catalyzed process*, Fuel processing Technology, 92, 112-118.
29. Chen et al. (2009), *Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor*, Energy Conversion and Management, 50, 668-673.

30. Conte A. (2015), *Produzione ed utilizzo di biodiesel da oli esausti: il progetto RecOIL*, Tesi di laurea magistrale in Ingegneria Chimica (A.A. 2014/2015).
31. Cvengroš & Cvengrošová (2004), *Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids*, *Biomass and Bioenergy* 27 (2), 173 - 181.
32. Darnoko D. & Cheryan M. (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 1263.
33. De Araùjo et al. (2013), *Biodiesel production from used cooking oil: a review*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 445-452.
34. Demirbas (2002), *Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol*, *Energy Conversion and Management*, 43 (17), 2349-2356.
35. Demirbas M. F. (2008), *Energ. Edu. Sci. Technol.*, 22, 59.
36. Demirbas M. F. (2009), *Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical methanol transesterification*, *Energy Conversion & Management*, 50, 923-927.
37. De Paola et al. (2009), *Factor analysis of transesterification reaction of waste oil for biodiesel production*, *Bioresource Technology* 100 (21), 5126 - 5131.
38. Dizge et al. (2009), *Biodiesel production from sunflower, soybean and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer*, *Bioresource Technology* 100 (6), 1983 - 1991.
39. Du et al. (2005), *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37, 68 -71.
40. Escobar et al. (2009), *Biofuels: environment, technology and food security*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 1275-1287.
41. Farid & Behzadi (2009), *Innovation in the production of biodiesel*, 16th ASEAN Regional Symposium on Chemical Eng., Manila, Philippines.
42. Felizardo et al. (2006), *Production of biodiesel from waste frying oil*. *Waste Management* 26: 487-494.
43. Fernandez et al. (2010) *Bioresour. Technol.*, 101, 7019.
44. Fieldsend & Morison (2000), *Climatic conditions during seed growth significantly influence oil content and quality in winter and spring evening primrose crops*, *Industrial Crops and Products*, 12, 137-147.
45. Filemon (2010), *Biofuels from plant oils*, ASEAN Foundation.
46. Frijters & Baert (2006), *Int. J. Vehicle Des.*, 41, 242.

47. Gamba et al. (2008), *Supported ionic liquid enzymatic catalysis for the production of biodiesel*, *Advanced Synthesis and Catalysis* 350 (1), 160 - 164.
48. Gan et al. (2010), *Ferric sulphate catalysed esterification of FFAs in WCO*, *Bioresource Technology* 101 (19), 7338 - 7343.
49. Gazmuri & Bouchon (2009), *Analysis of wheat gluten and starch matrices during deep-fat frying*, *Food Chemistry* 115 (3), 999 - 1005.
50. Georgogianni et al. (2009), *Transesterification of rape seed oil for the production of biodiesel using homogeneous and heterogeneous catalysis*, *Fuel processing technology*, 90, 1016-1022.
51. Ghasemnezhad & Honermeier (2007), *Seed yield, oil content and fatty acid composition of *Oenothera biennis* L. affected by harvest date and harvest method*, *Industrial Crops and Products*, 25, 274-281.
52. Gioia G. (2014), *Analisi sperimentale della transesterificazione enzimatica di olio commerciale con lipasi immobilizzata*, *Tesi di laurea in Ingegneria Chimica (A.A. 2013/2014)*.
53. Goering C. E. (1984), Contract No. 59-2171-1-6-057-0, US Department of Agriculture, Peoria, USA.
54. Gog et al. (2012), *Biodiesel production using enzymatic transesterification - current state and perspectives*, *Renewable Energy* 39 (1), 10 - 16.
55. Guerrero et al. (2011), *Biodiesel production from waste cooking oil*, [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).
56. Gui et al. (2008), *Energy*, 33, 1646.
57. Gumus & Kasifoglu (2010), *Biomass Bioenergy*, 34, 134.
58. Guzzato et al. (2011), *The use of a modified TDSP for biodiesel production from soybean, lin seed and waste cooking oil*, *Fuel Processing Technology*, 92, 2083-2088.
59. Haas et al. (2006), *A process model to estimate biodiesel production costs*, *Bioresources Technology* 97, 671-678.
60. He et al. (2007), *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process*, *Fuel*, 86 (3), 442-447.
61. Hsu et al. (2000), *Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix: effectiveness as a biocatalyst*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*.
62. Hsu et al. (2002), *Immobilized lipase - catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel*, *Biotechnology and Applied Chemistry* 36 (3), 181 - 186.

63. Iso et al. (2001), *Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16 (1), 53 - 58.
64. Jacobson et al. (2008), *Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil*, Appl. Catal. B. Environ., 85 (1), 86-91.
65. Jain S. & Sharma M.P. (2010), *Renewable Sustainable Energy Rev*, 14, 763.
66. Kaieda et al. (2001), *Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent - free system*, Journal of Bioscience and Bioengineering 91 (1), 12 - 15.
67. Kalligeros et al. (2003), *Biomass Bioenergy*, 24, 141.
68. Karaosmonoglu F. (1999), *Energy Sources*, 21, 221.
69. Kazlauskas et al. (1991), *A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from Pseudomonas cepacia, and lipase from Candida rugosa*, J. Org. Chem. 56 (8), 2656 - 2665.
70. Keera et al. (2011), *Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst*, Fuel 90 (1), 42 - 47.
71. Keim (1945), *Treating fats and fatty oils*, US Patent No. 2383601.
72. Kemp (2006), *Biodiesel basics and beyond: a comprehensive guide to production and use for the home and farm*, CreateSpace Independent Publishing Platform.
73. Khor et al. (2010), *Thermodynamics and inhibition studies of lipzyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification*, Bioresource Technology 101 (16), 6558 - 6561.
74. Kim et al. (1997), *The crystal structure of a triacylglycerol lipase from Pseudomonas cepacia reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor*, Structure 5 (2), 173 - 185.
75. King - Altman (1956), *A schematic method of deriving the rate laws for enzyme - catalyzed reactions*, J. Am. Chem. Soc. 60, 1375 - 1378.
76. Knothe et al. (2015), *The Biodiesel Handbook, 2nd ed.*, AOCS.
77. Kulkarni & Dalai (2006), *Waste cooking oilman economical source for biodiesel: a review*, Industrial & Engineering Chemistry research 45 (9), 2901-2913.
78. Kumari et al. (2007), *Preparation of biodiesel by lipase - catalyzed transesterification of high free - fatty acid containing oil from Madhuca indica*, Energy Fuels 21 (1), 368 - 372.
79. Kumari et al. (2009), *Biotechnol. Biofuels* 2, 1.

80. Lam et al. (2009), *Life cycle assessment for the production of biodiesel: a case study in Malaysia for pal oil versus jatropha oil*, Society of Chemical Industry and John Wiley & Sons Ltd.
81. Lam et al. (2010), *Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review*, *Biotechnology Advances* 28, 500-518.
82. Lang et al. (1998), *Structural basis of the chiral selectivity of Pseudomonas cepacia lipase*, *The Febs Journal*.
83. Lemke et al. (1997), *A three-dimensional predictive site model for lipase from Pseudomonas cepacia*, *J. Org. Chem.* 62 (18), 6268 - 6273.
84. Leung & Guo (2006) *Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production*, *Fuel Process Technology*, 87, 883-890.
85. Lewkowitsch (1904), *Chemical technology and Analysis of oil, fats and waxes*, pp. 419-24.
86. Li C. & Li R. (2009), *Fuel Process Technol.*, 90,883.
87. Li et al. (2006), *Lipase - catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43, 58 - 62.
88. Li & Yan (2010), *Production of biodiesel catalyzed by immobilized Pseudomonas cepacia lipase from Sapium sebiferum oil in a micro-aqueous phase*, *Applied Energy* 87 (10), 3148 - 3154.
89. Lin et al. (2009), *Fuel*, 88, 1779
90. Liu et al. (2009), *Transesterification for biodiesel production catalyzed by combined lipase: optimization and kinetics*, Wiley InterScience [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).
91. Liu et al. (2010), *Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production*, *Chemical Engineering Journal* 157 (1), 223 - 229.
92. Lopresto (2014), *Processi di separazione, estrazione e bioconversione nella produzione di biocombustibili da microalghe*, Tesi di dottorato in Ingegneria Meccanica a.a. 2013/2014.
93. Lopresto et al. (2015), *Enzymatic transesterification of waste vegetable oils to produce biodiesel*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 121, 229 - 235.
94. Lotero et al. (2005), *Synthesis of biodiesel via acid catalysis*, *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (14), 5353 - 5363.
95. Luj et al. (2009), *Biomass Bioenergy*, 33, 948.

96. Luo et al. (2006), *A novel psychrophilic lipase from Pseudomonas fluorescens with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification*, Applied Micr. Biotechnol. 73, 349 - 355.
97. Madras et al. (2004), *Synthesis of biodiesel in supercritical fluids*, Fuel, 83 (14-15), 2029-2033.
98. Marangoni (2003), *Enzyme kinetics - a modern approach*, Wiley.
99. Marchetti et al. (2007), *Possible methods for biodiesel production*, Renewable and Sustainable Energy Reviews 11, 1300-1311.
100. Meng et al. (2008), *Fuel Process. Technol.*, 89, 851.
101. Minami & Saka (2006), *Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process*, Fuel, 85 (17-18), 2479-2483.
102. Mittelbach (1996), *Bioresourc. Technol.*, 56, 7.
103. Mittelbach & Enzelsberger (1999), *Transesterification of heated rapeseed oil for extending diesel fuel*, Journal of the American Oil Chemists' Society 76 (5), 545 -550.
104. Muralidharan et al. (2011), *Energy*, 36, 5385.
105. Naccarato C. (2012), *Transesterificazione enzimatica per la produzione di biodiesel da oli di frittura esausti*, tesi di laurea in Ingegneria Chimica (A.A. 2011/2012).
106. Naccarato S. (2014), *Transesterificazione degli oli vegetali esausti per la produzione di biodiesel con lipasi immobilizzate: studio di stabilità ed attività dell'enzima e studio cinetico*, Tesi di laurea magistrale in Ingegneria Chimica (A.A. 2013/2014).
107. Nag et al (2008), *Biofuels refining and performance*. McGraw Hill.
108. Najafi et al. (2011), *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 15, 3870.
109. Nelson et al. (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1191 - 1195.
110. Nouredini et al. (2002), *Immobilization of Pseudomonas cepacia lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil*, Journal of the American Oil Chemist' Society 79 (1), 33 - 40.
111. Nouredini et al. (2005), *Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil*, Bioresour. Technol. 96, 969 - 777.
112. Özbay et al. (2008), *Esterification of free fatty acids in waste cooking oils (WCO): Role of ion-exchange resins*, Fuel 87: 1789–1798.
113. Ozsezen et al. (2009), *Fuel*, 88, 629.

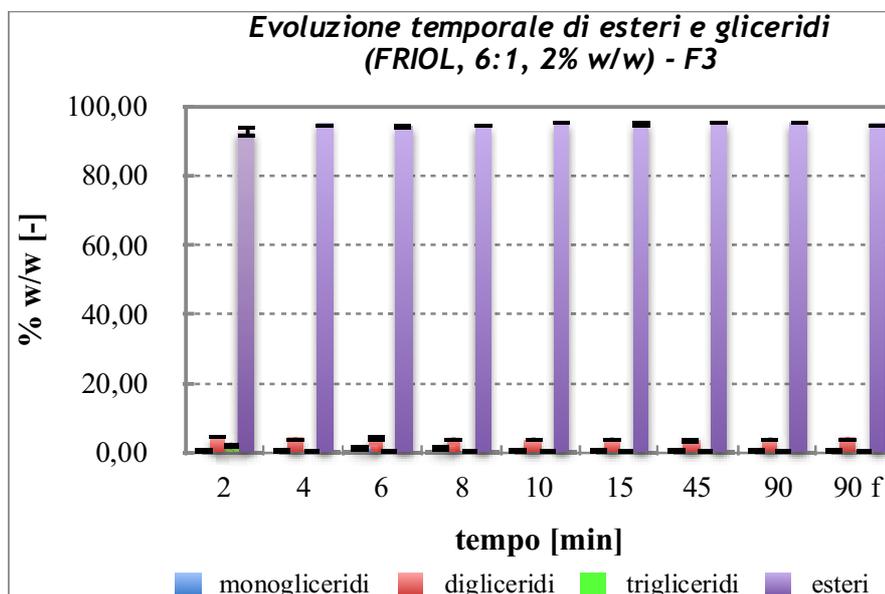
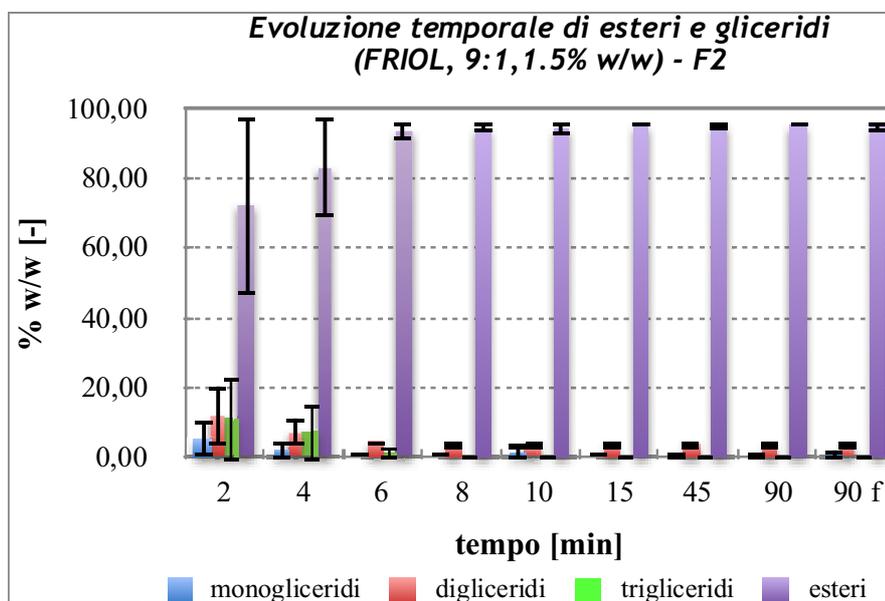
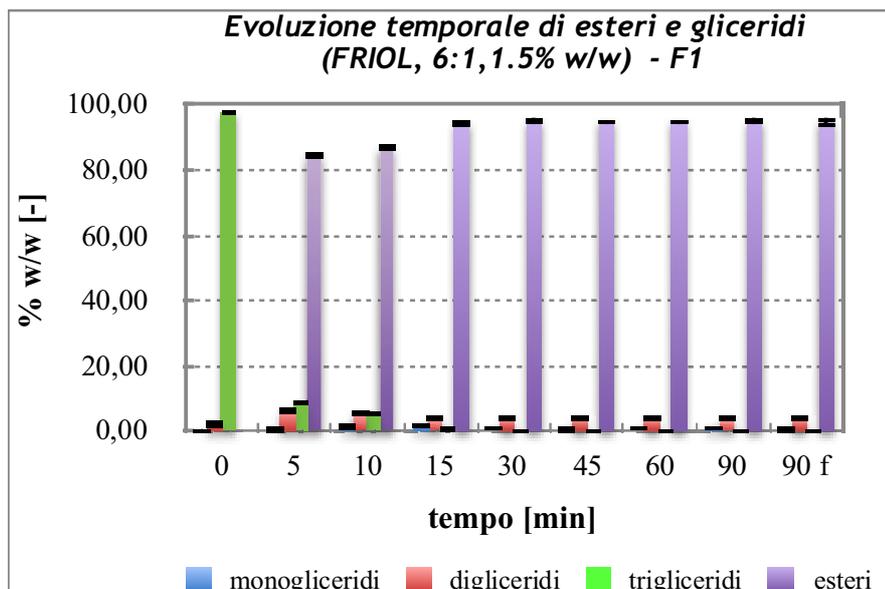
114. Pencreac'h et al. (1997), *Activity of Pseudomonas cepacia lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support*, Applied Microbiology and Biotechnology 47 (6), 630 - 635.
115. Peters et al. (2013), *Assessing the EC ILUC proposal Dutch national ILUC Impact Assessment*. ECOFYS Netherlands B.V. Utrecht.
116. Peterson et al. (1996), *Biomass Bioenergy*, 10, 331.
117. Predojevic (2008), *The production of biodiesel from waste frying oils: a comparison of different purification steps*, Fuel, 87, 3522-3528.
118. Pryde E. H., (1983), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1557.
119. Quesada-Medina & Olivares-Carrillo (2011), *Evidence of thermal decomposition of fatty acid methyl esters during the synthesis of biodiesel with supercritical methanol*, The Journal of Supercritical Fluids, 56, 56-63.
120. Rashid et al. (2008), *Production of sunflower oil methyl esters by optimized alkali-catalyzed methanolysis*, Biomass Bioenergy, 32, 1202-1205.
121. Rathore & Madras (2007), *Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide*, Fuel, 86 (17-18), 2650-2659.
122. Reetz & Jaeger (1998), *Overexpression, immobilization and biotechnological application of Pseudomonas lipases*, Chemistry and Physics of Lipids 93 (1-2), 3 - 14.
123. Refaat et al. (2008), *Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil*, Int. J. Environ. Sci. Tech. 5 (1), 75 - 82.
124. Riera & Codony (2000), *Recycled Cooking Oils: Assessment of risks for public health*. University of Barcelona, Department of Nutrition. Barcelona: European Parliament, Directorate General for Research, Directorate A, The STOA Program.
125. Roy (2009), *Deliverable 2.2 "Implementation Handbook"*, BIOSIRE project.
126. Sahoo et al. (2007), *Biodiesel development from high acid value polanga seed oil and performance evaluation in a CI engine*. Fuel 86: 448-454.
127. Saka & Kusdiana (2001), *Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol*, Fuel, 80 (2), 225-231.
128. Saka et al. (2010), *New process for catalyst-free biodiesel production using subcritical acetic acid and super critical methanol*, Fuel, 89, 1442-1446.

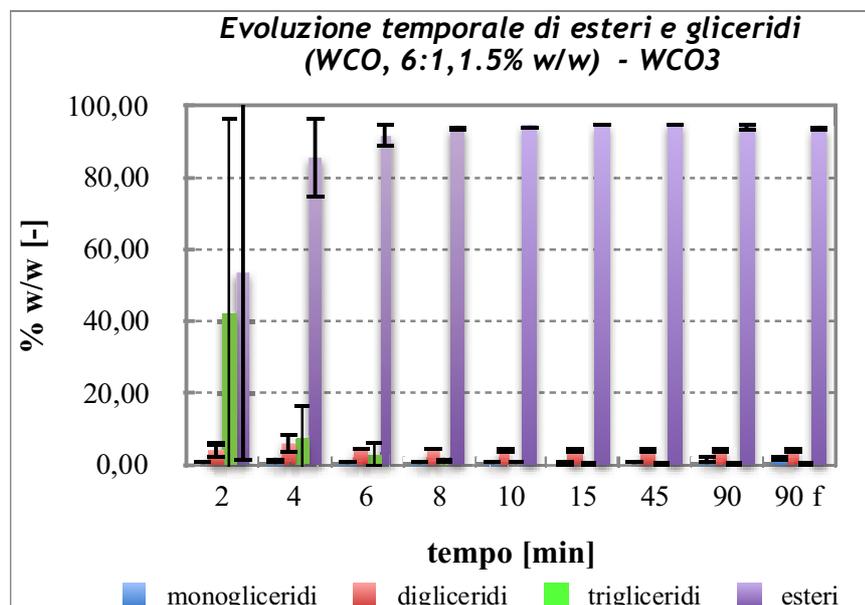
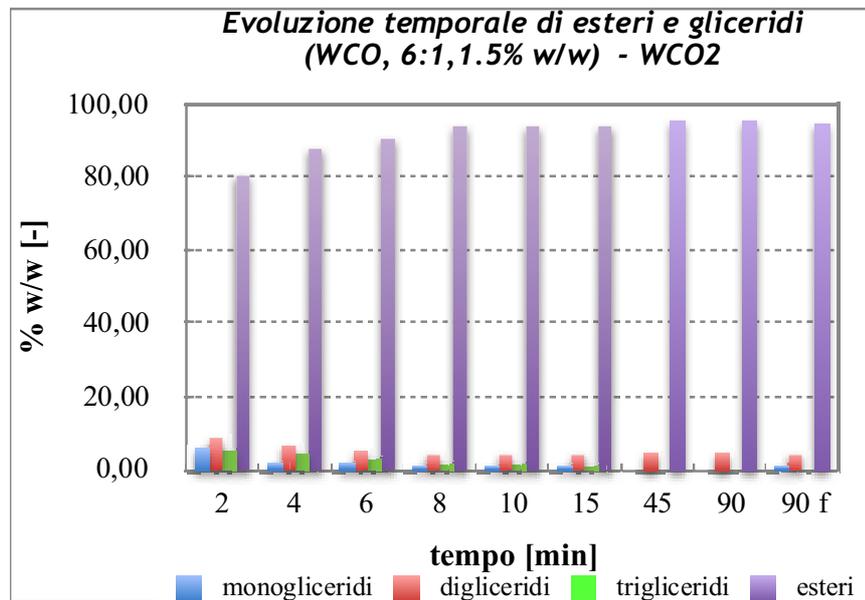
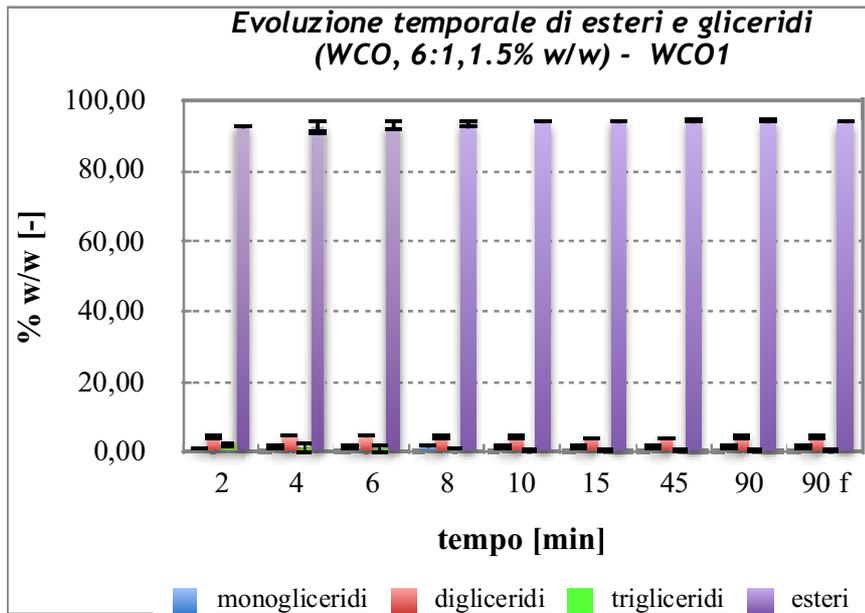
129. Sakai et al. (2009), *Economic assessment of batch biodiesel production processes using homogeneous and heterogeneous alkali catalysts*, *Bioresource Technology*, 100, 3268-3276.
130. Salis et al. (2005), *Biodiesel production of triolein and short chain alcohols through biocatalysis*, *Journal of Biotechnology* 119 (3), 291 - 299.
131. Sanginiti I. (2016), *Transesterificazione enzimatica di oli commerciali per la produzione di biodiesel: recupero e riuso dell'enzima*, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica (A.A. 2015/2016).
132. Sarin A. (2012), *Biodiesel: Production and Properties*. Royal Society of Chemistry [www.rsc.org](http://www.rsc.org), pag. 5.
133. Schrag et al. (1997), *The open conformation of a Pseudomonas lipase*, *Structure* 5 (2), 187, 202.
134. Schulz et al. (2000), *Stereoselectivity of Pseudomonas cepacia lipase toward secondary alcohols: a quantitative model*, *Protein Science*.
135. Schwab et al. (1987), *Fuel*, 66, 1372.
136. Schwab et al. (1988), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1781.
137. Shah et al. (2004), *Energy fuels* 18, 154 - 159.
138. Shah & Gupta (2007), *Lipase - catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent - free system*, *Process Biochemistry* 42 (3), 409 - 414.
139. Shalaby et al. (2012), *Cultivating microalgae in domestic wastewater for biodiesel production*, *Notulae Scientiae Biologicae*, Cluj-Napoca 4.1, 56.
140. Sharma et al. (2009), *Review on thermal energy storage with phase change materials and applications*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 318 - 345.
141. Sharma & Singh (2008), *Development of biodiesel from carnage, a tree found in rural India*, *Fuel* 87: 1740-1742.
142. Shieh et al. (2003), *Bioresor. Technol.* 88, 103 - 106.
143. Shimada et al. (2002), *Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction oil processing*, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 17 (3-5), 133-142.
144. Shimada et al. (2003), *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17, 33-42.
145. Silva et al. (2007), *Continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol*, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46 (16), 5304-5309.
146. Singh S.P. & Singh D. (2010), *Renewable Sustainable Energy Rev*, 12, 200.

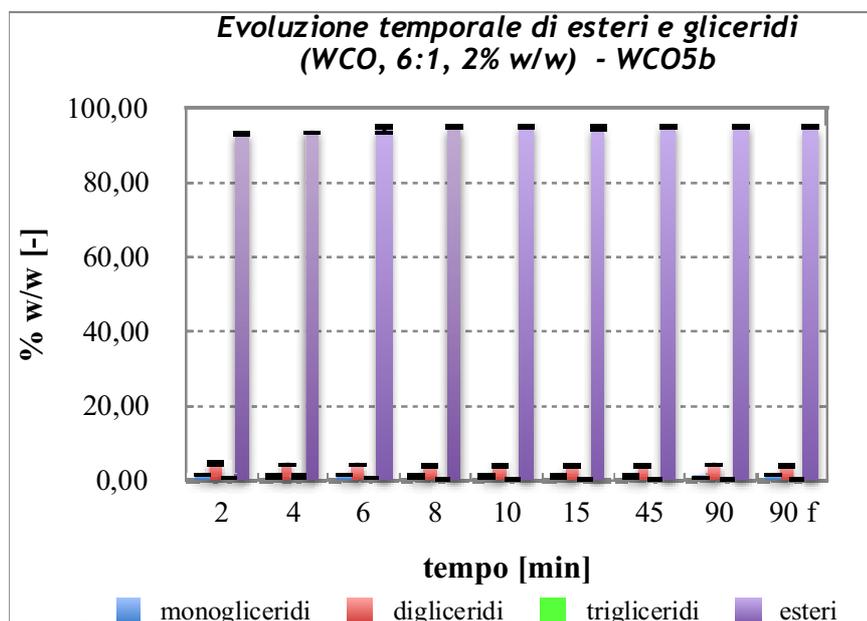
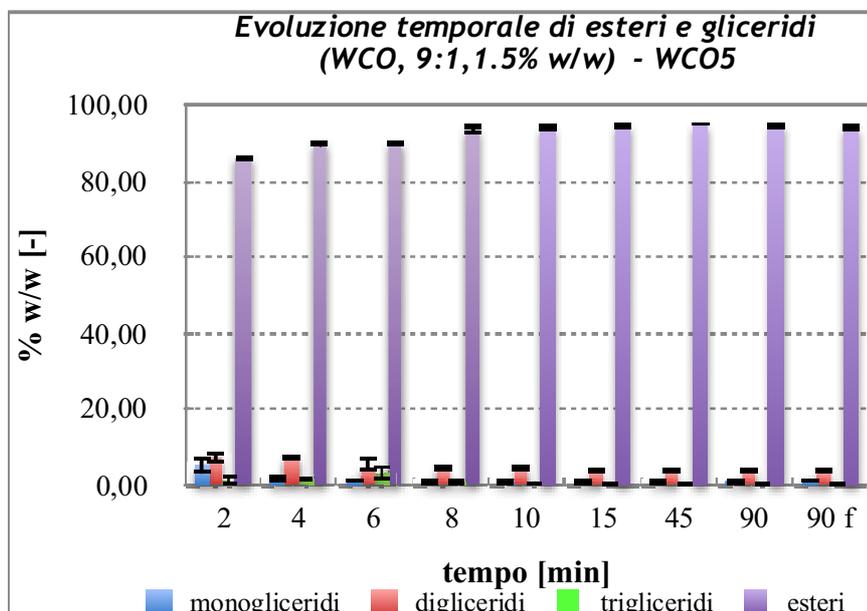
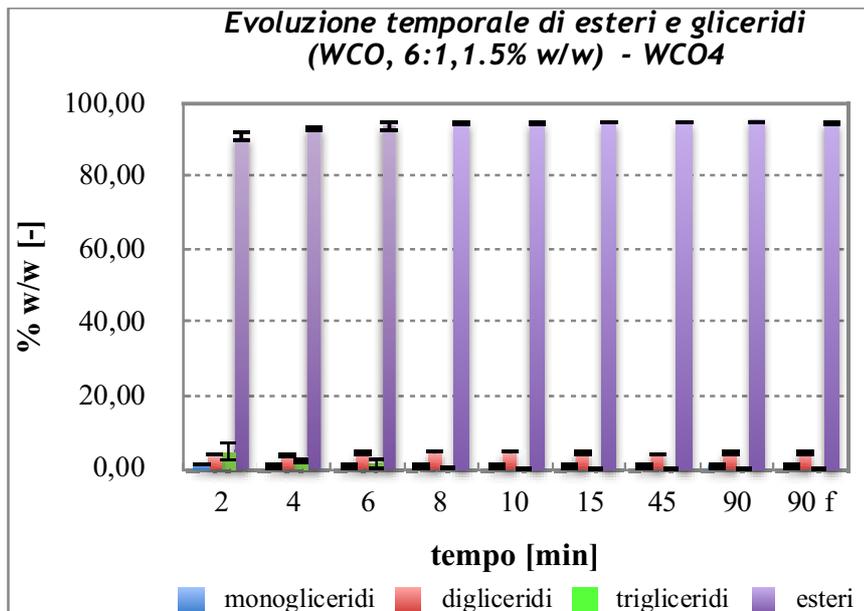
147. Soriano et al. (2009), *Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid catalyzed transesterification*, Fuel, 88, 560-565.
148. Soumanou et Bornscheuer (2003), *Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil*, Enzyme Microb. Technol. 33, 97 - 103.
149. Stamatis et al. (1993), *Pseudomonas cepacia lipase: esterification reactions in AOT microemulsion systems*, Biotechnology Letters 15 (7), 703 - 708.
150. Tan et al. (2010), *Effects of free fatty acids, water content and cosolvent on biodiesel production by supercritical methanol reaction*, The Journal of Supercritical Fluids, 53, 88-91.
151. Tat et al. (2007), *Trans. ASABE*, 50, 1123.
152. Thanh et al. (2010), *A two-step continuous ultra sound assisted production of biodiesel fuel from waste cooking oils: a practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel*, Bioresource Technology, 101, 5394-5401.
153. Tyson (2001), *Biodiesel handling and use guidelines*, National Renewable Energy Laboratory.
154. Ulusoy et al. (2009), *Energy Sources, Part A*, 31, 906.
155. Utlu & Kocak (2008), *Renewable Energy*, 33, 1936.
156. Van Gerpen (2005), *Biodiesel processing and production*. Fuel Processing Technology 86: 1097–1107.
157. Vleitez et al. (2011), *Continuous synthesis of castor oil ethyl esters under supercritical ethanol*, The Journal of Supercritical Fluids, 56 (3), 271-276.
158. Wang et al. (2006), *Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil*, J. Mol. Catal. A Chem 252: 107-112.
159. Wang et al. (2009), *Refining of biodiesel by ceramic membrane separation*, Fuel Process Technol., 90, 422-427.
160. Wannahari et al. (2012), *The recovery of used palm cooking oil using bagasse as adsorbent*, American J. of Engineering and Applied Science 5 (1), 59 - 62.
161. Wen et al. (2010), *Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by TiO<sub>2</sub>-MgO*, Bioresource Technology, 101, 9570-9576.
162. Winayanuwattikun et al. (2008), *Potential plant oil feedstock for lipase - catalyzed biodiesel production in Thailand*, Biomass and Bioenergy 32 (12), 1279 - 1286.
163. Wu et al. (2004), *Transesterification of waste oil to biodiesel in solvent free system catalyzed by immobilized lipase*, Chinese Journal of Catalysis 25, 903 - 908.

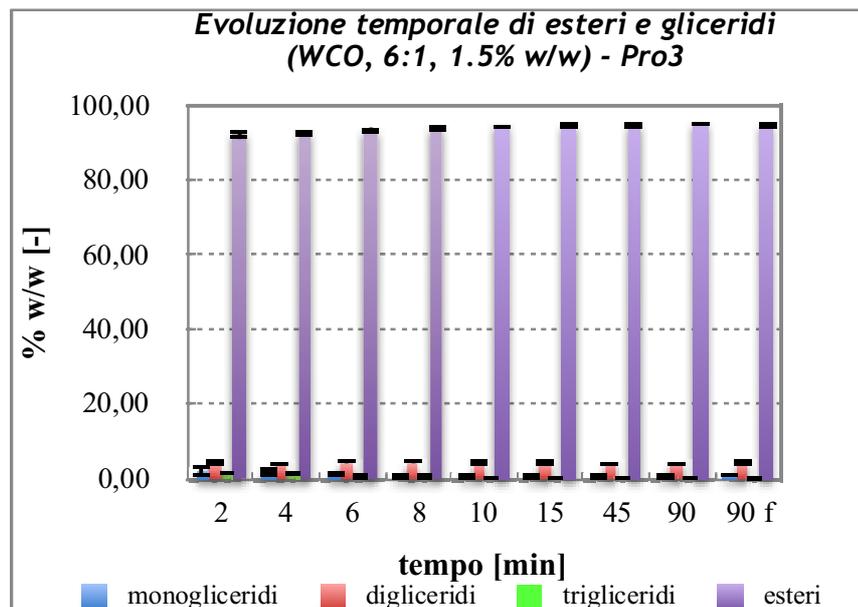
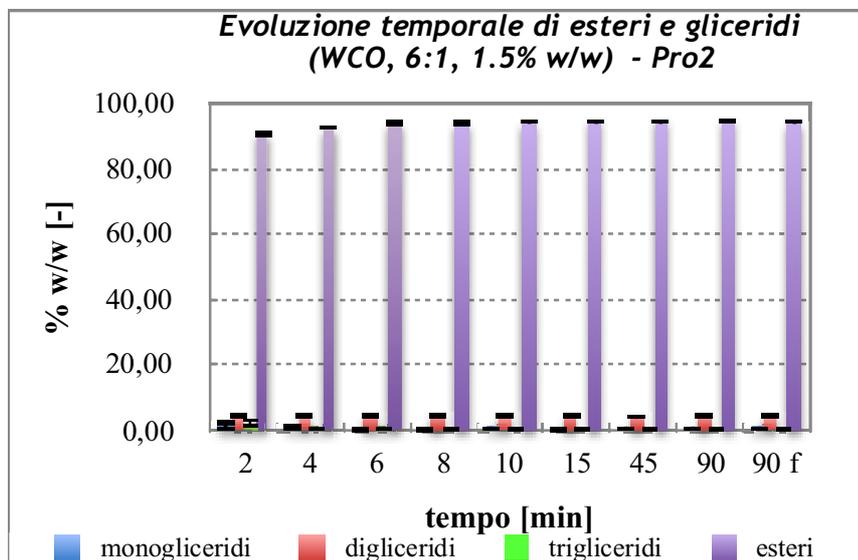
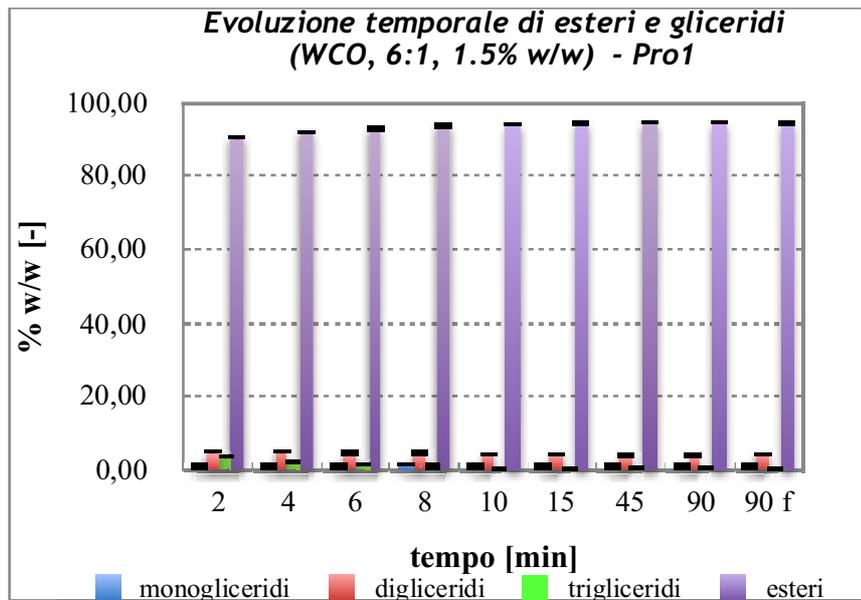
164. Wu et al. (2009), *Atmos. Environ.*, 43, 1481.
165. [www.recoilproject.eu](http://www.recoilproject.eu)
166. Xie et al. (2010), *Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles*, *Biomass and Bioenergy* 34, 890 - 896.
167. Xu et al. (2003), *A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent - free medium*, *Biotechnology Letters* 25 (15), 1239 - 1241.
168. Xu et al. (2006), *Study on immobilized lipase catalyzed transesterification reaction of tung oil*, *Agricultural Sciences in China* 5 (11), 859 - 864.
169. Yaakob et al. (2012), *Development of a novel process for biodiesel production from palm fatty acid distillate*, *Fuel Processing Technology* 104, 271 - 280.
170. Yaakob et al. (2013), *Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, 184-193.
171. Yan et al. (2011), *Preparation of cross-linked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil*, *Bioresource Technology*, 102, 4755-4758.
172. Yang et al. (2009), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 355 - 365.
173. Yin et al. (2008), *Synthesis of biodiesel from soybean oil by coupling catalysis with subcritical methanol*, *Energy Conversion and Management*, 49 (12), 3512-3516.
174. Ying e Chen (2007), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 355 - 365.
175. Yoshiyuki (2000), *JSAE Rev.*, 21, 469.
176. Yuan et al. (2013), *Fatty acids as phase change materials: a review*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 29, 482 - 498.
177. Zalba et al. (2003), *Review on thermal energy storage with phase change: materials, heat transfer analysis and applications*, *Applied Thermal Engineering* 23, 251 - 283.
178. Zhang & Yen (2003), *Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment*, *Bioresource technology* 89 (1), 1-16.
179. Zhang & Yen (2003), *Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis*, *Bioresource technology* 90 (3), 229-240.
180. Zhao et al. (2007), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 236 - 243.
181. Ziejewski M. et al. (1986), SAE Paper No. 860301SAE International, Warrendale.

## Appendice IA

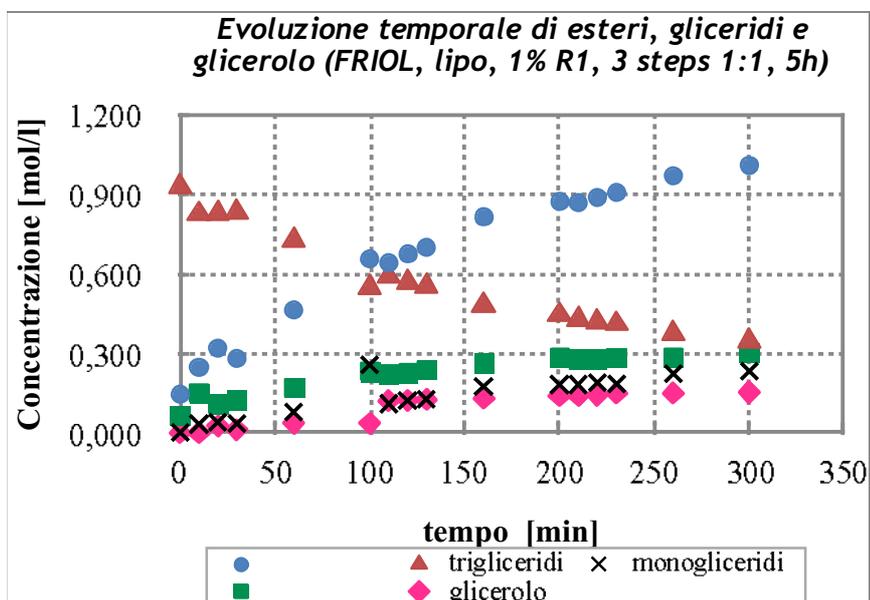
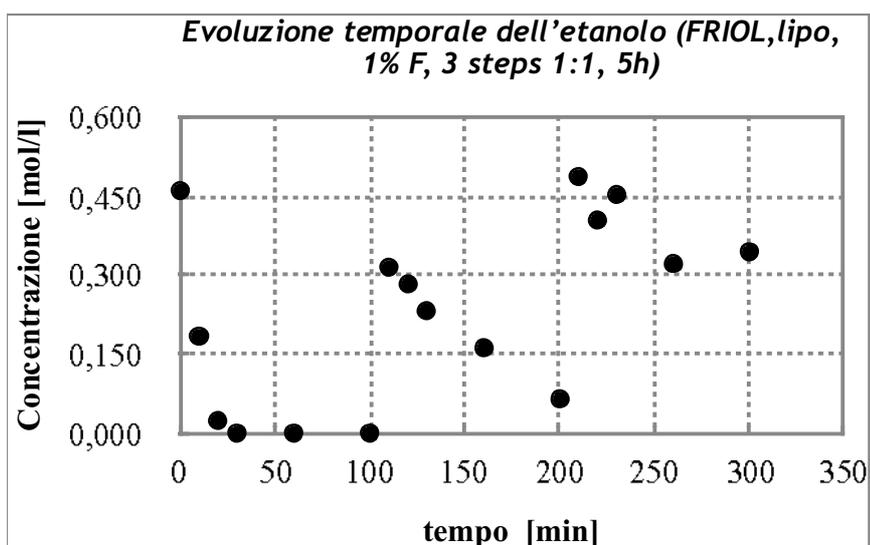
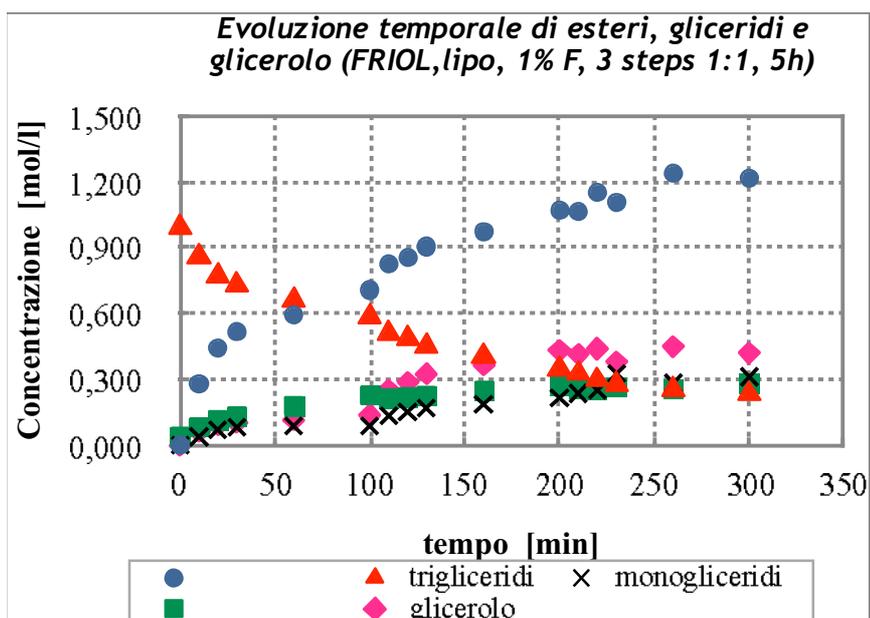


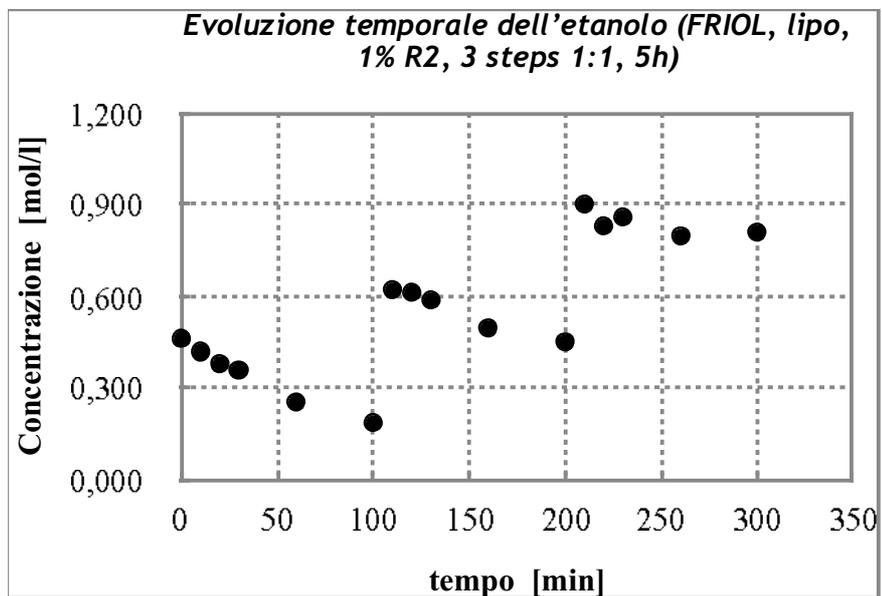
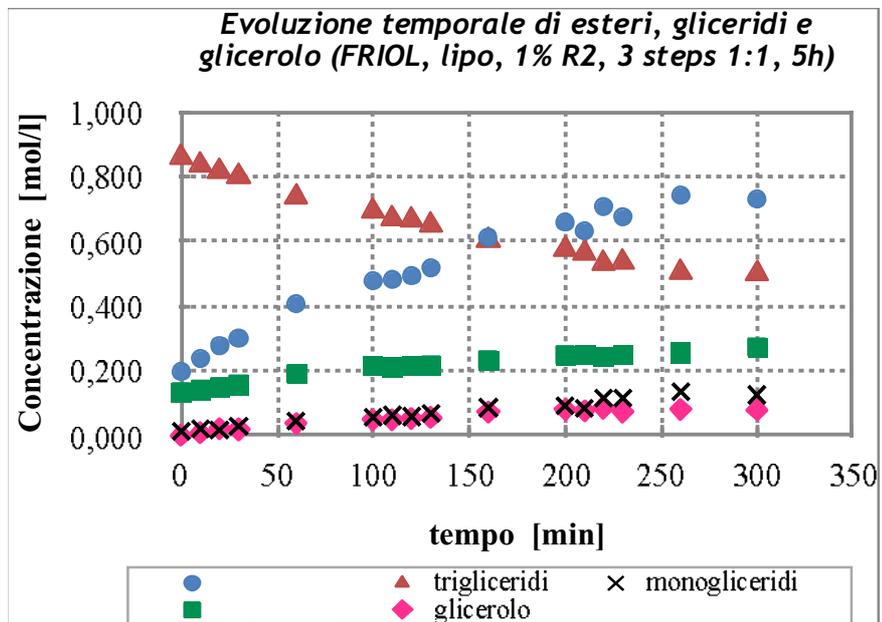
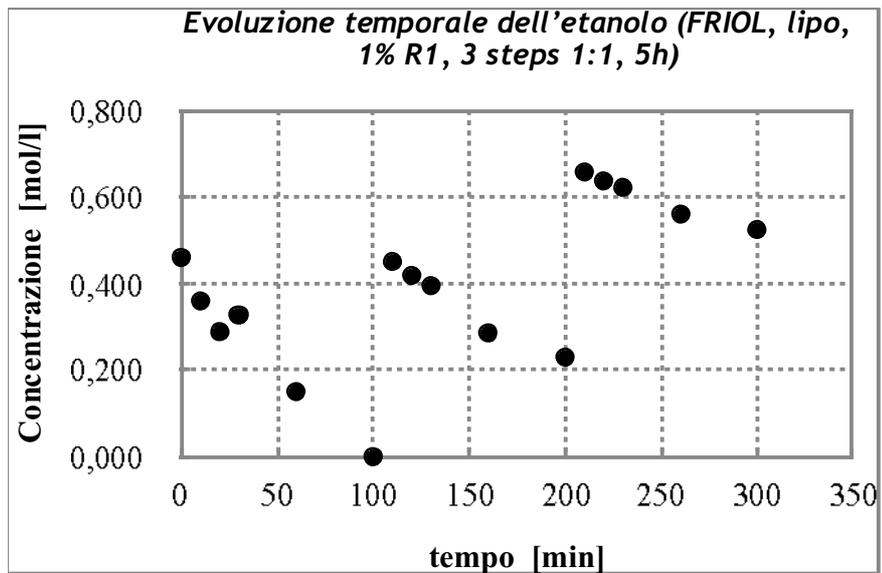


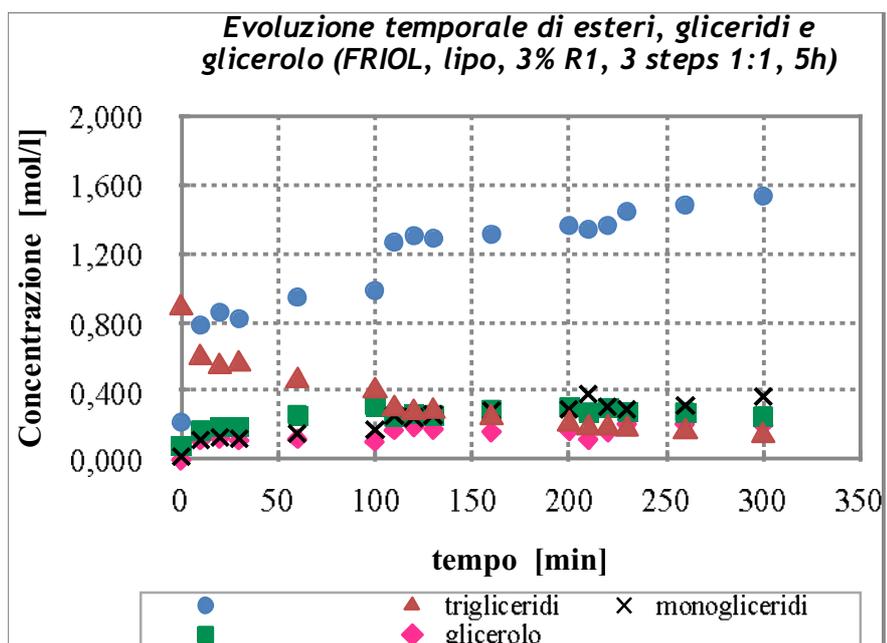
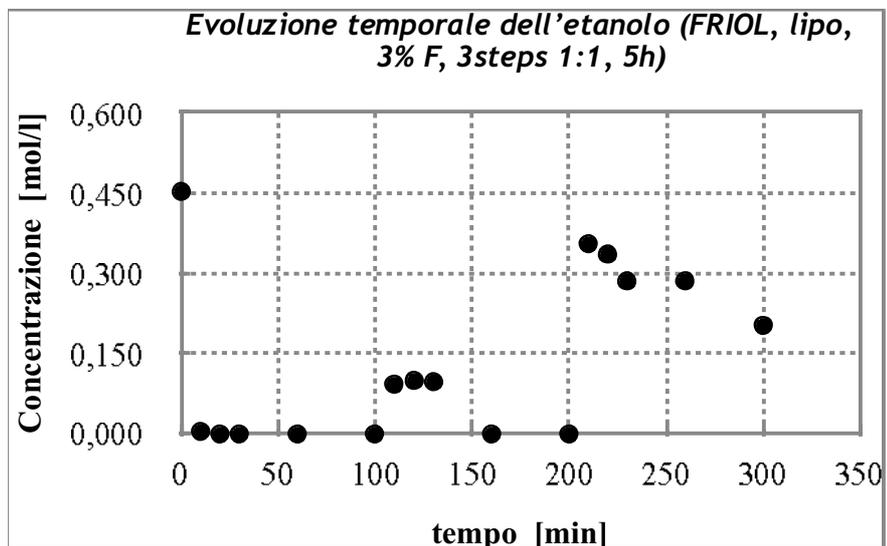
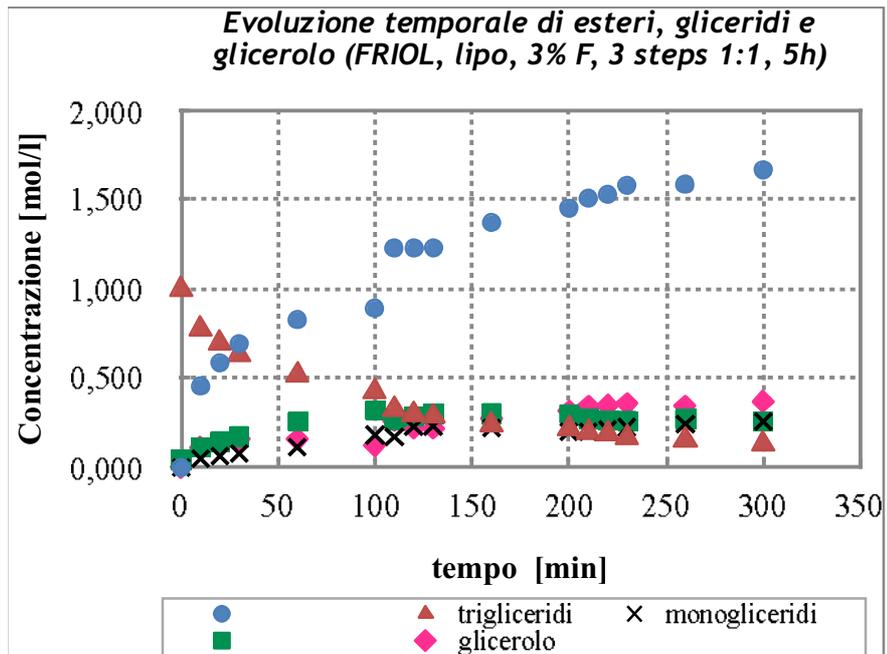


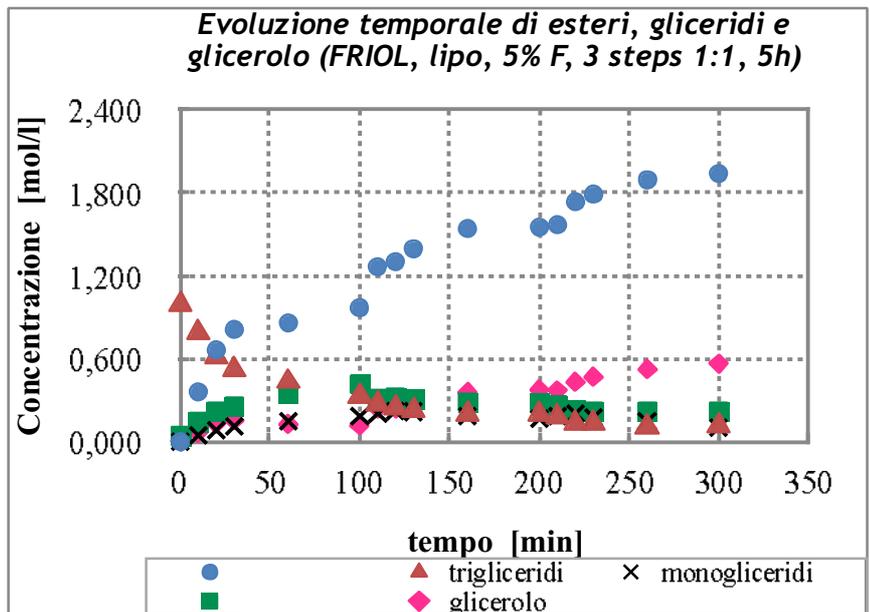
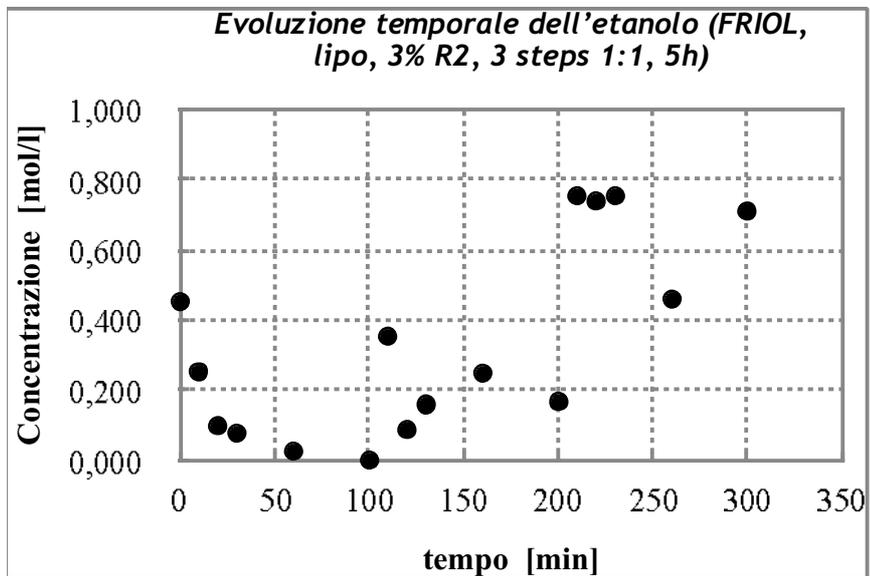
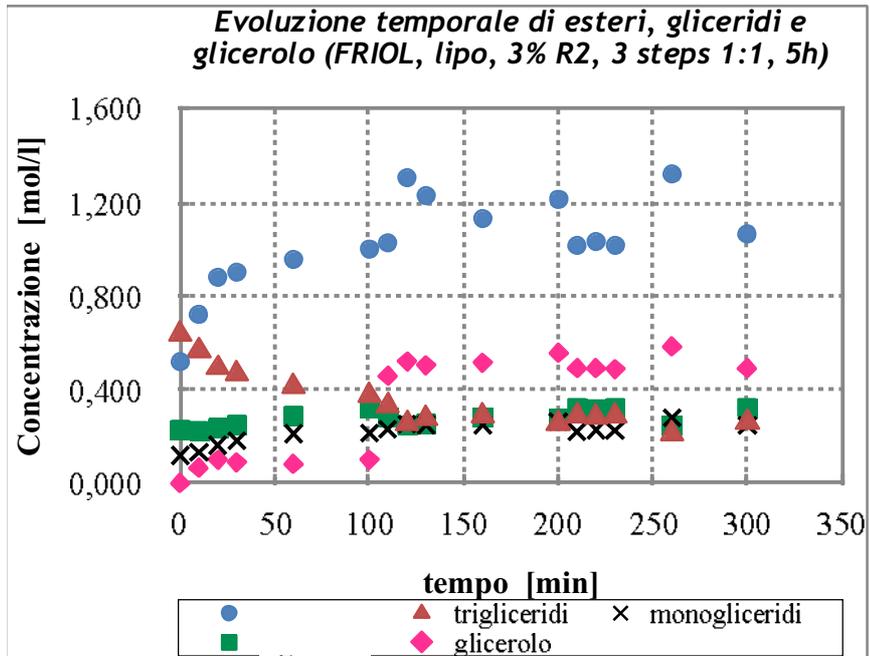


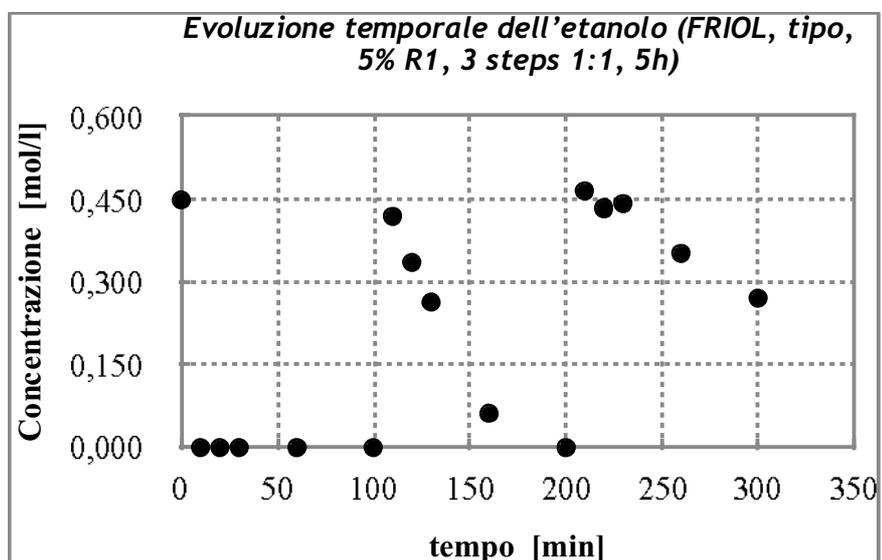
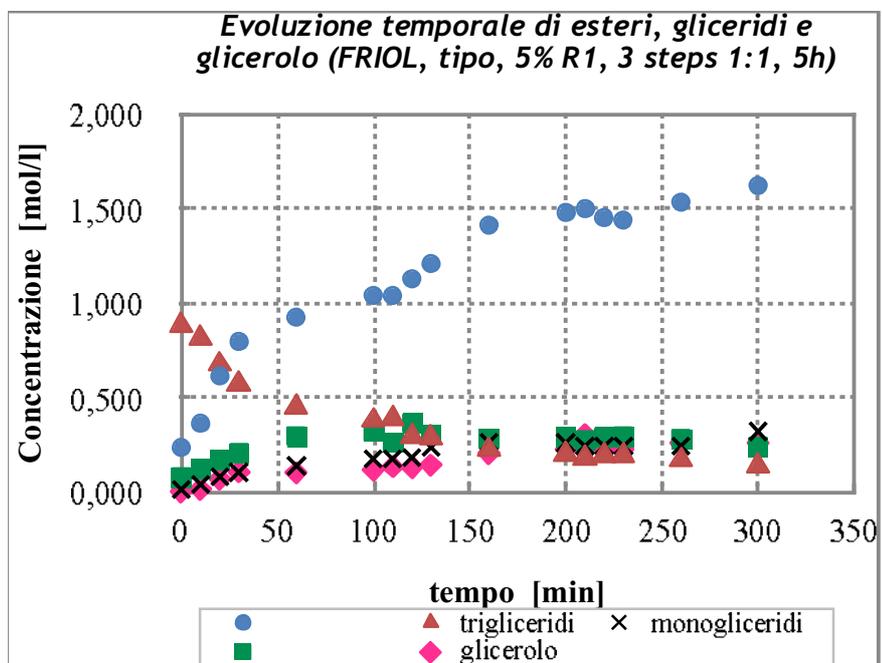
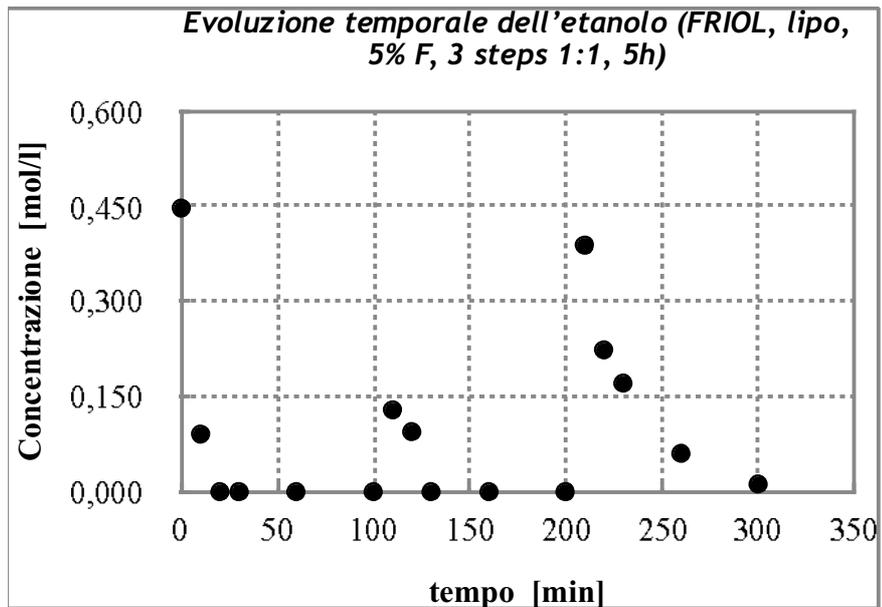
## Appendice IB

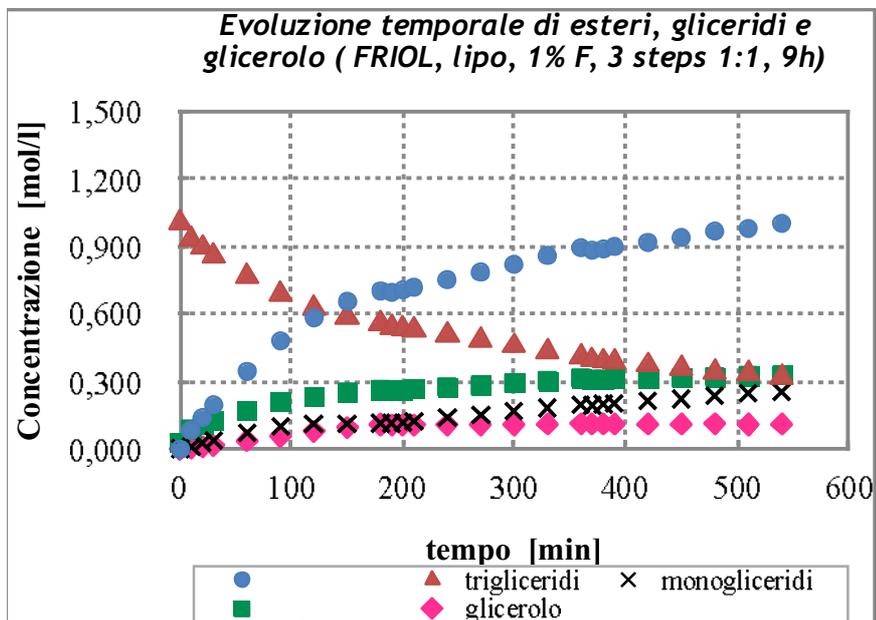
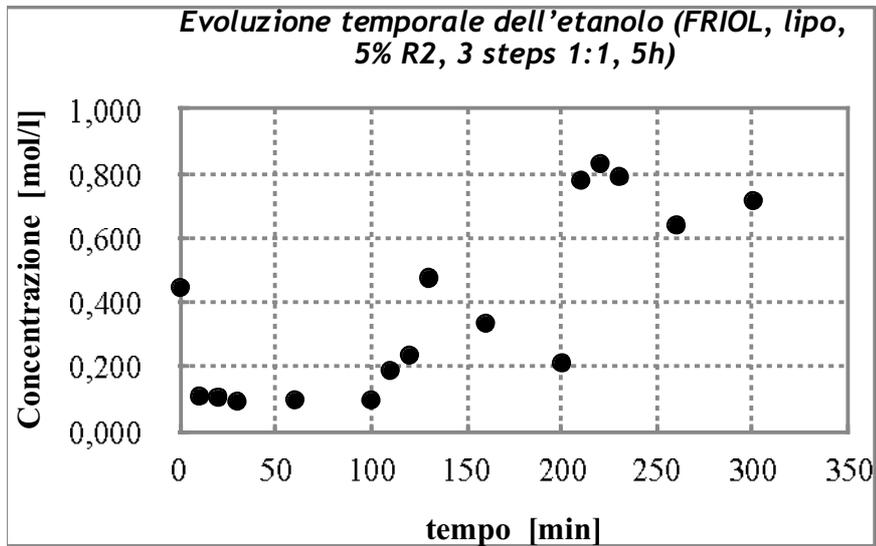
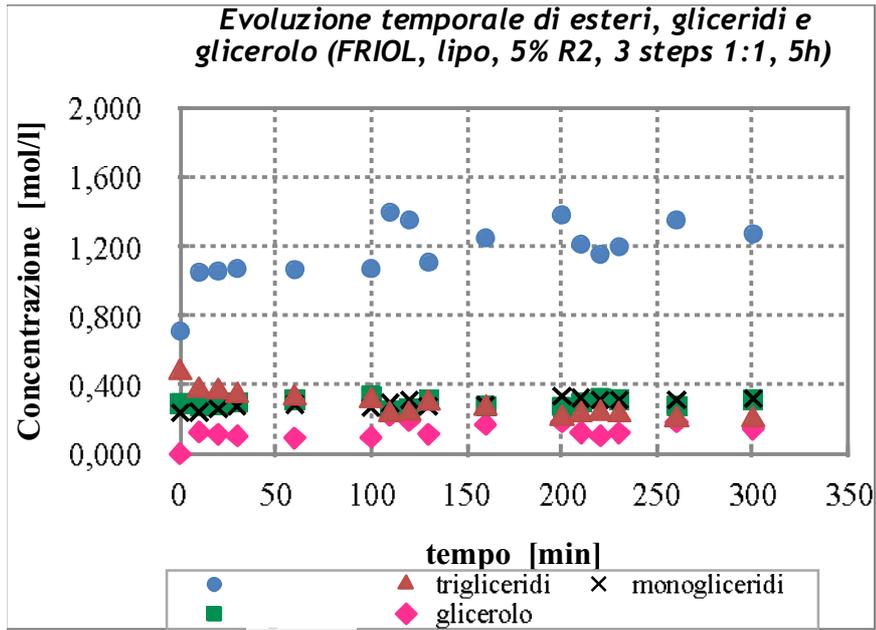


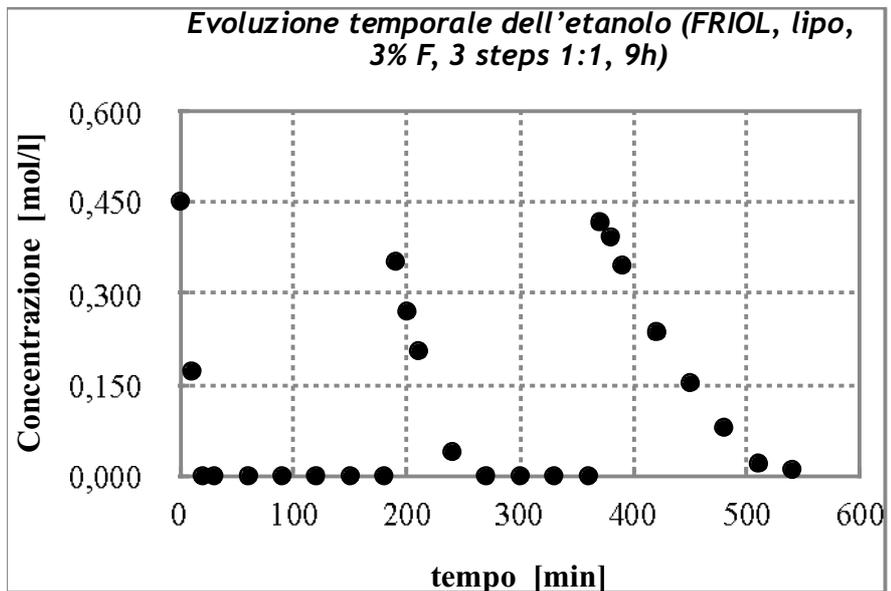
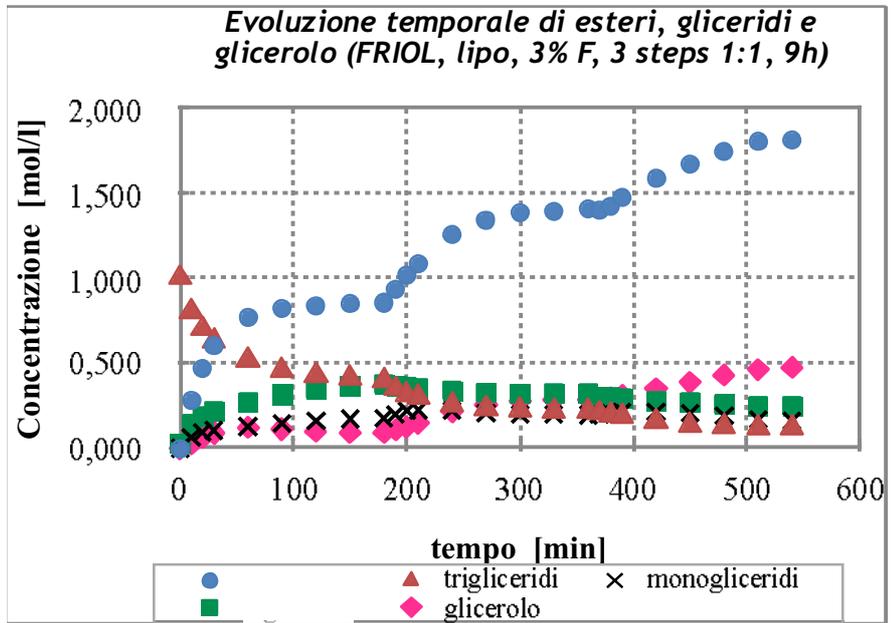
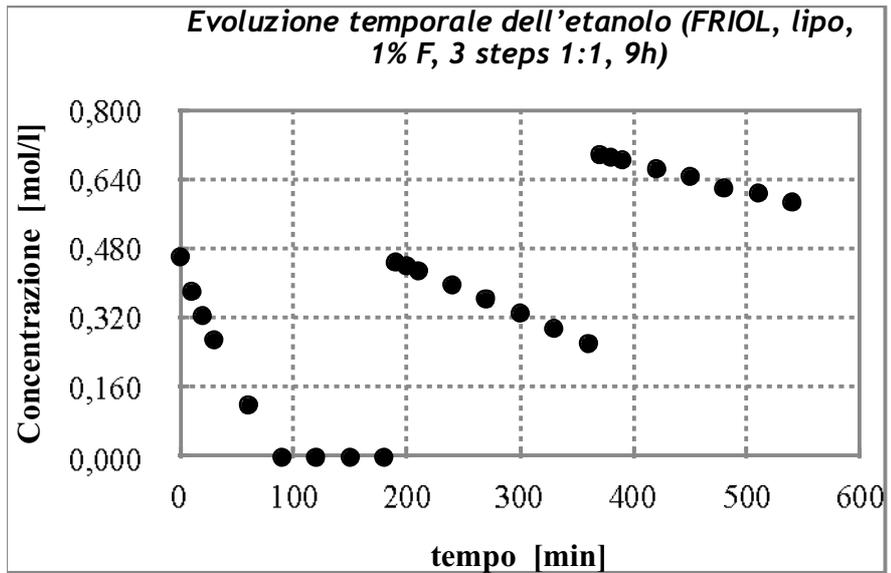


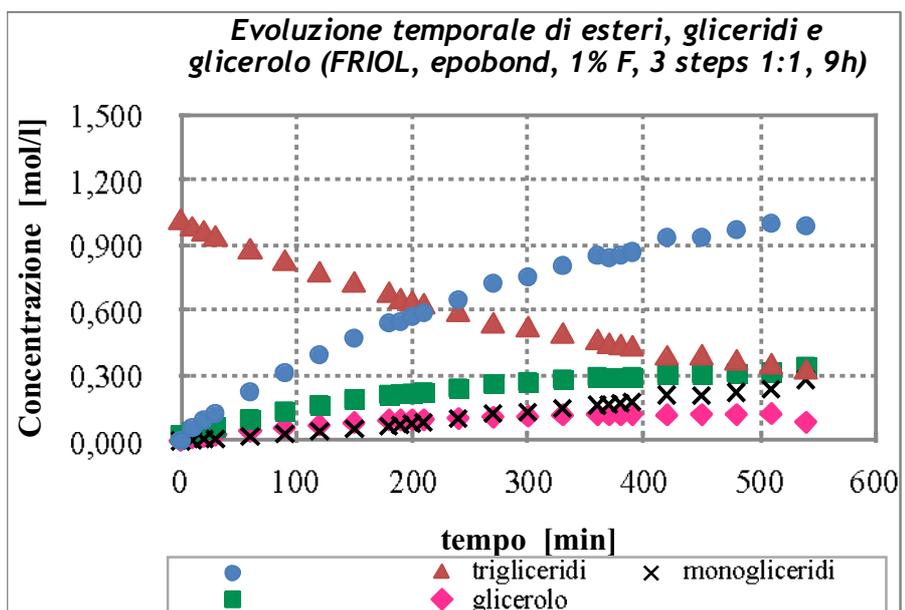
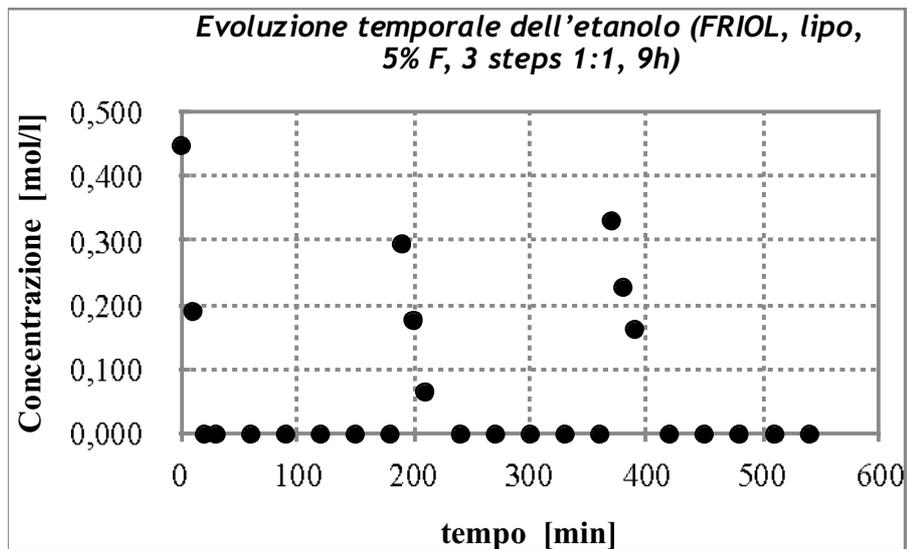
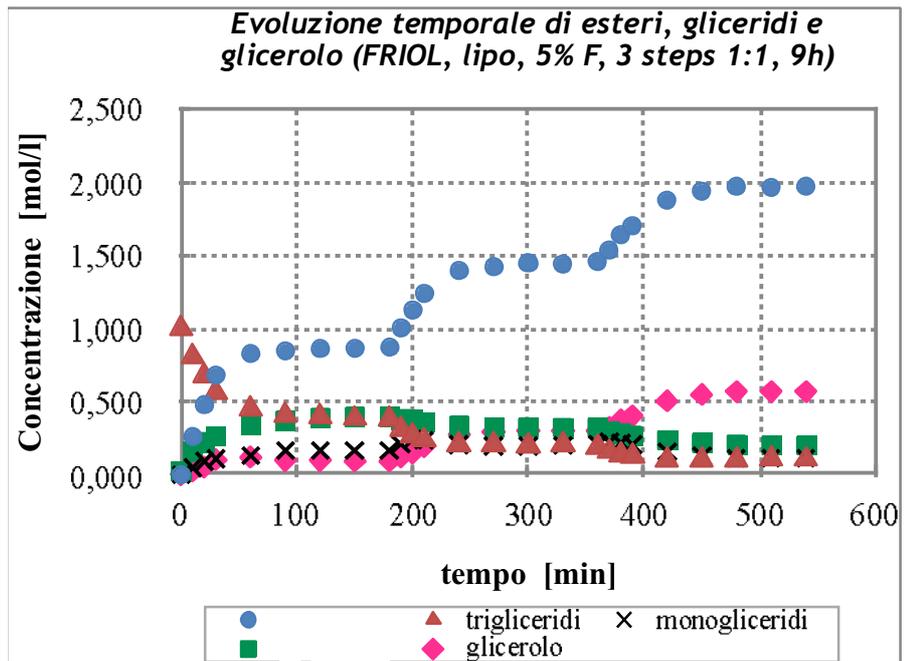


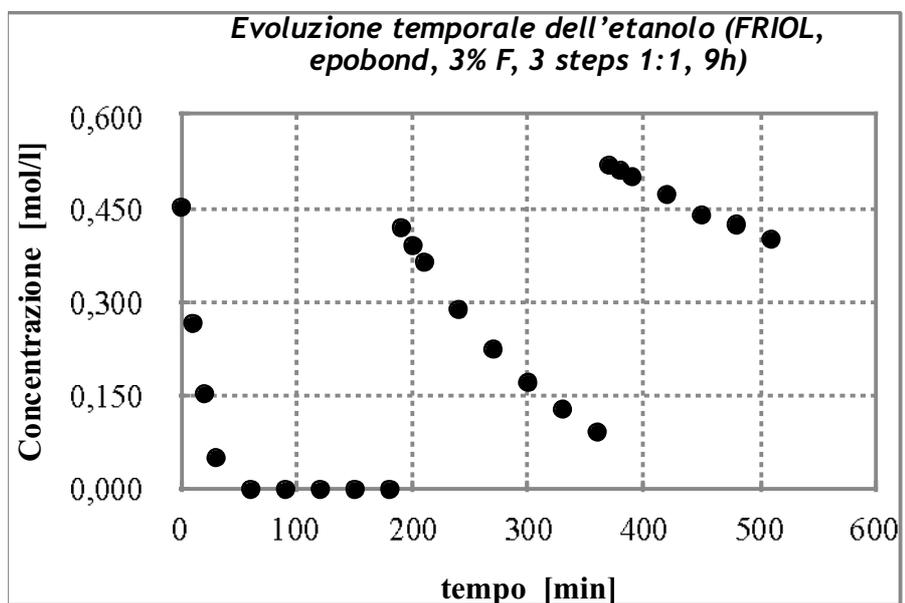
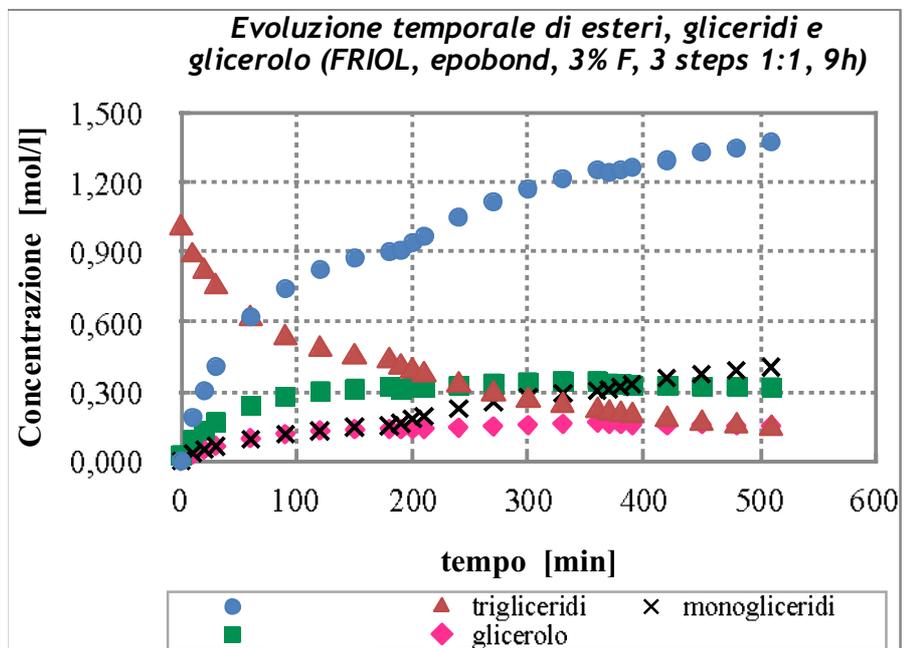
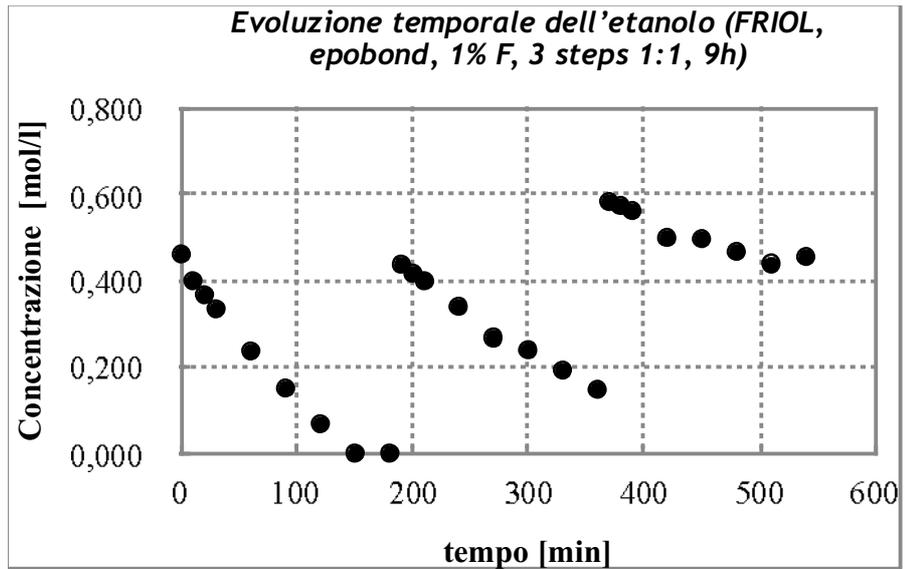


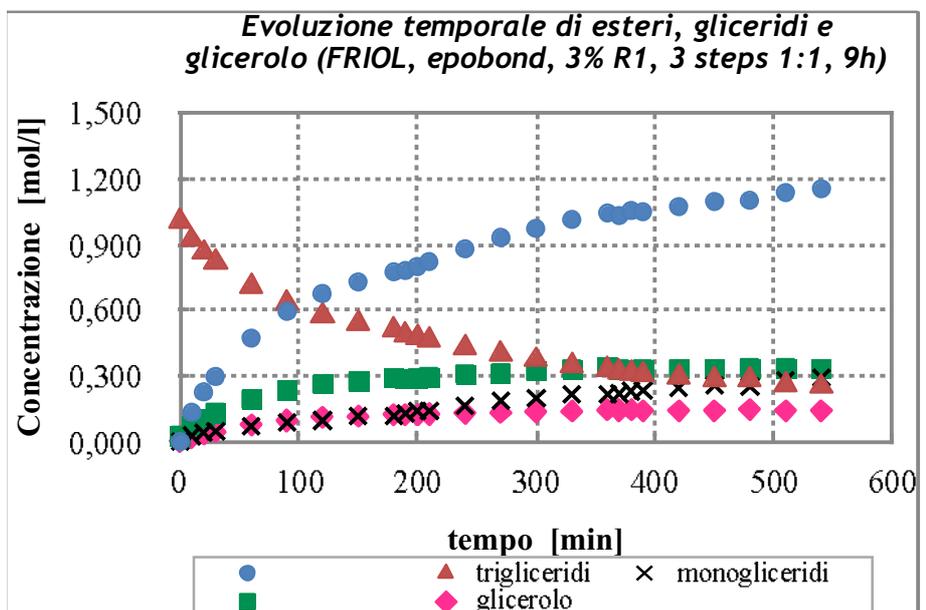
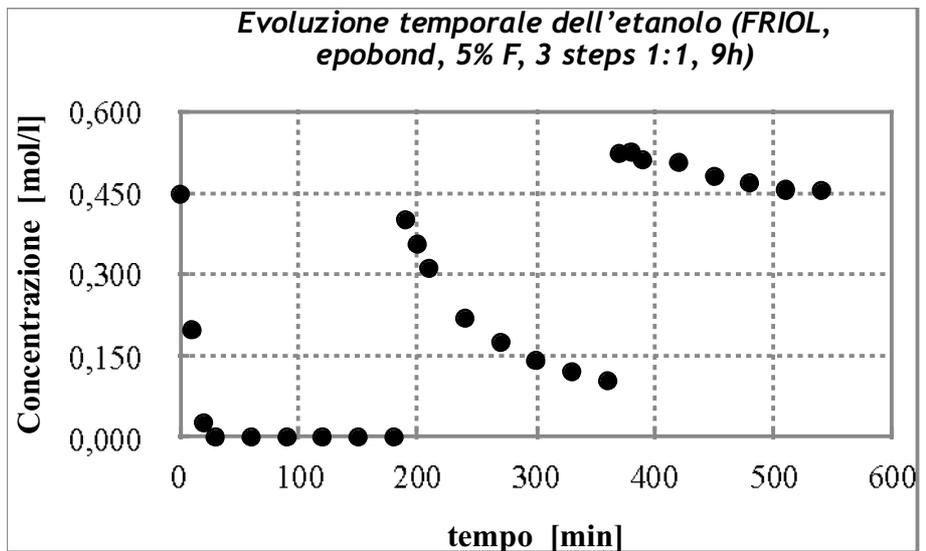
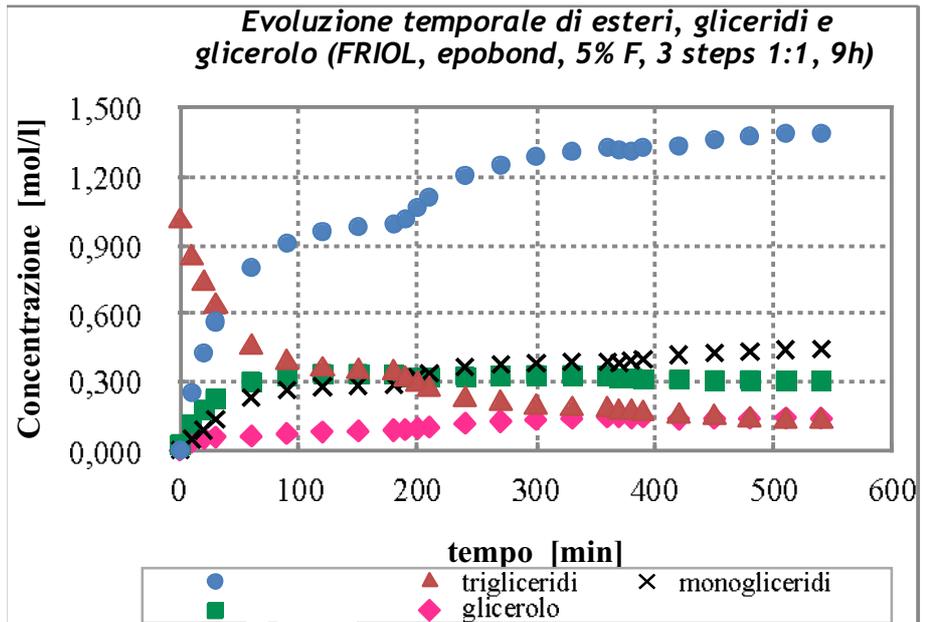


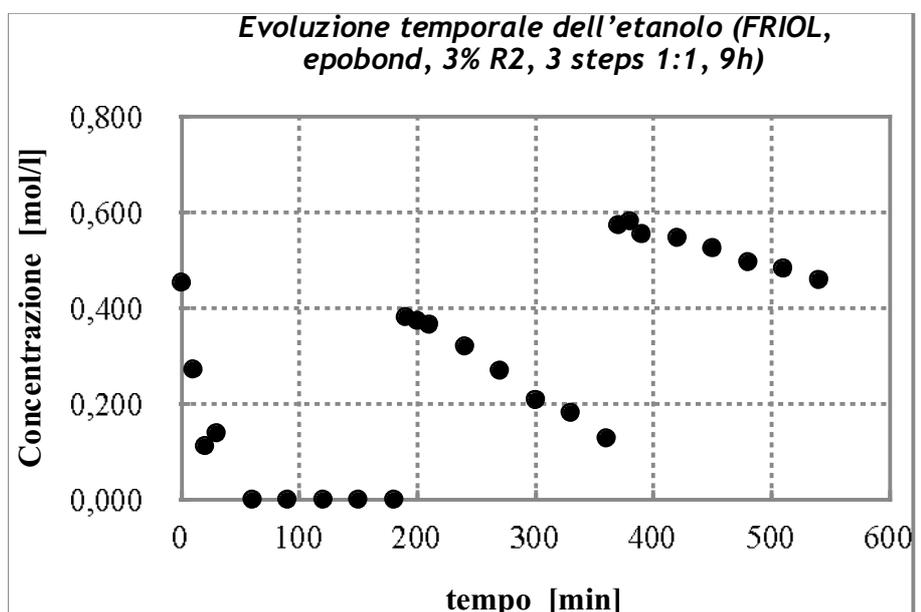
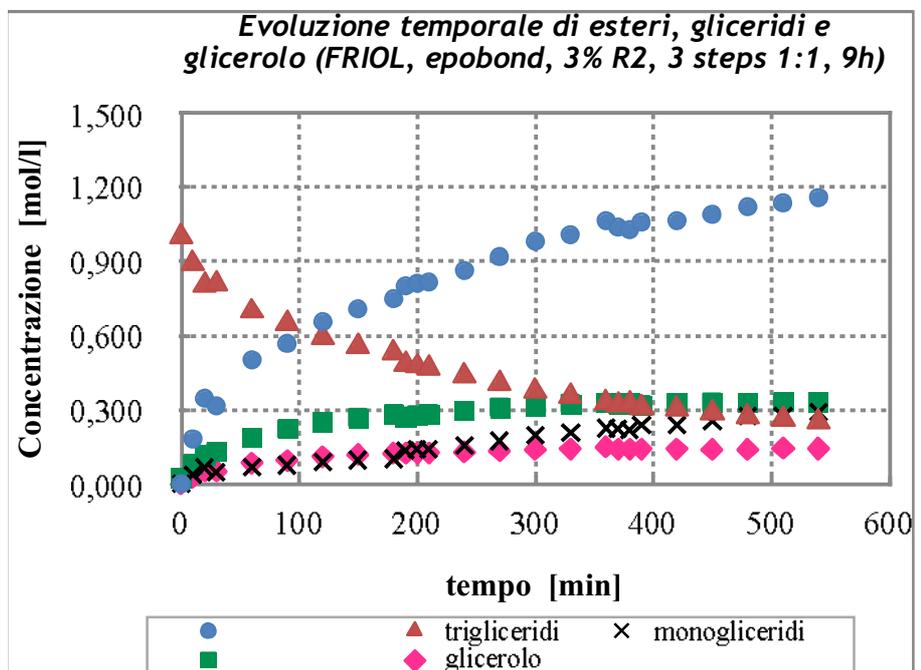
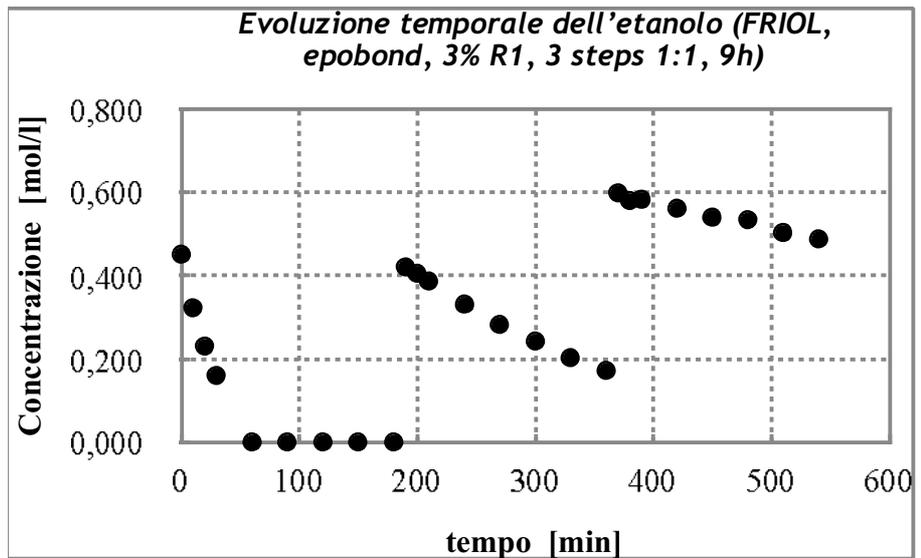


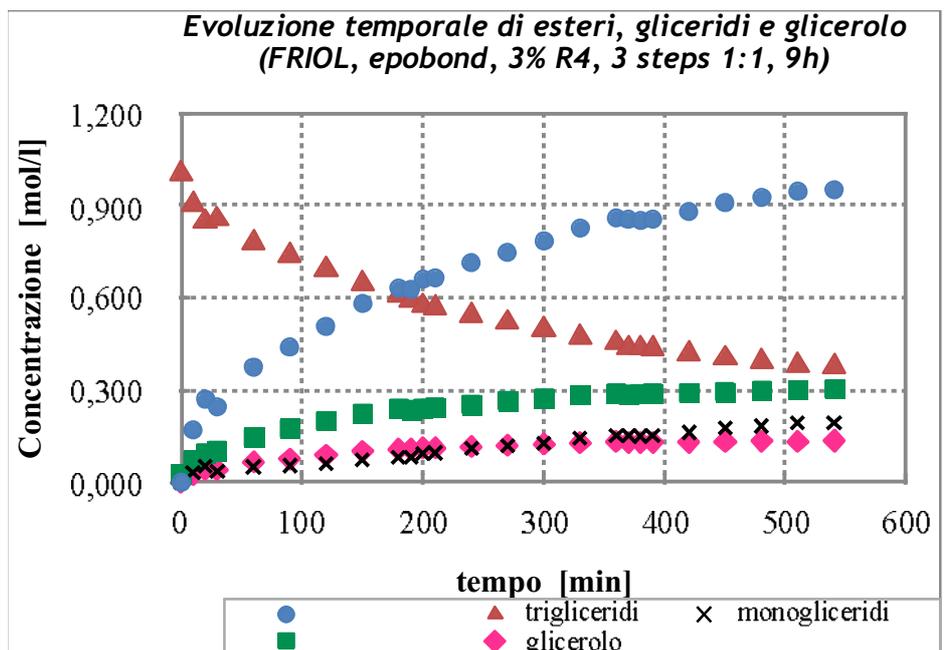
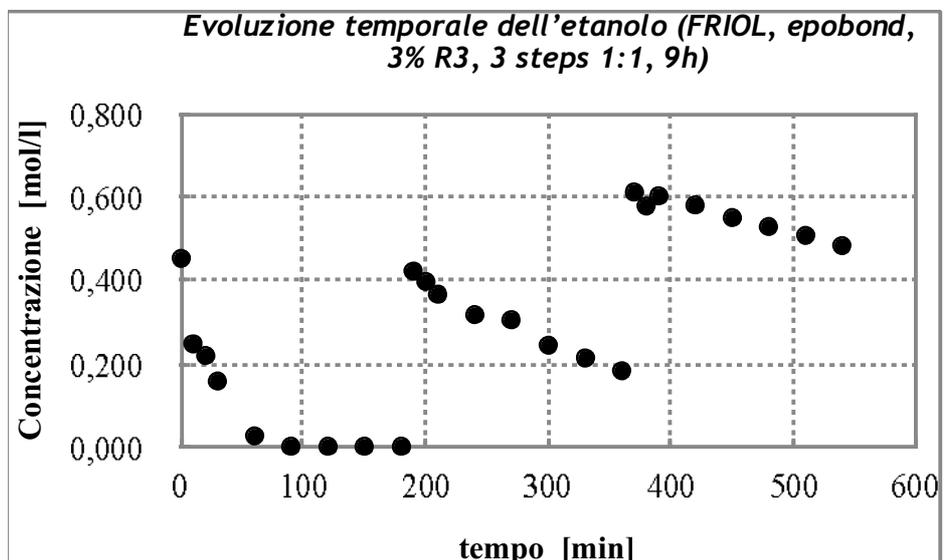
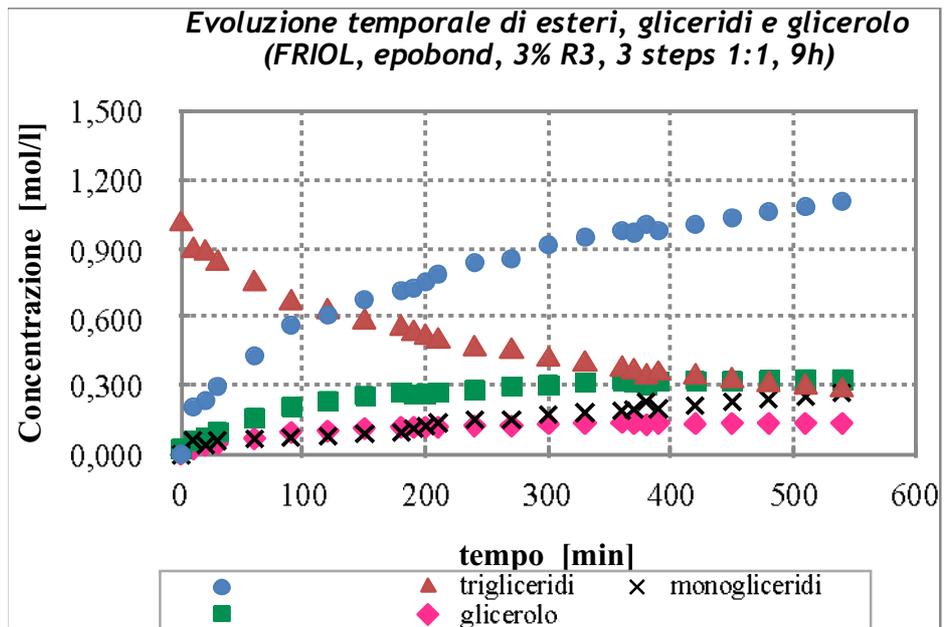


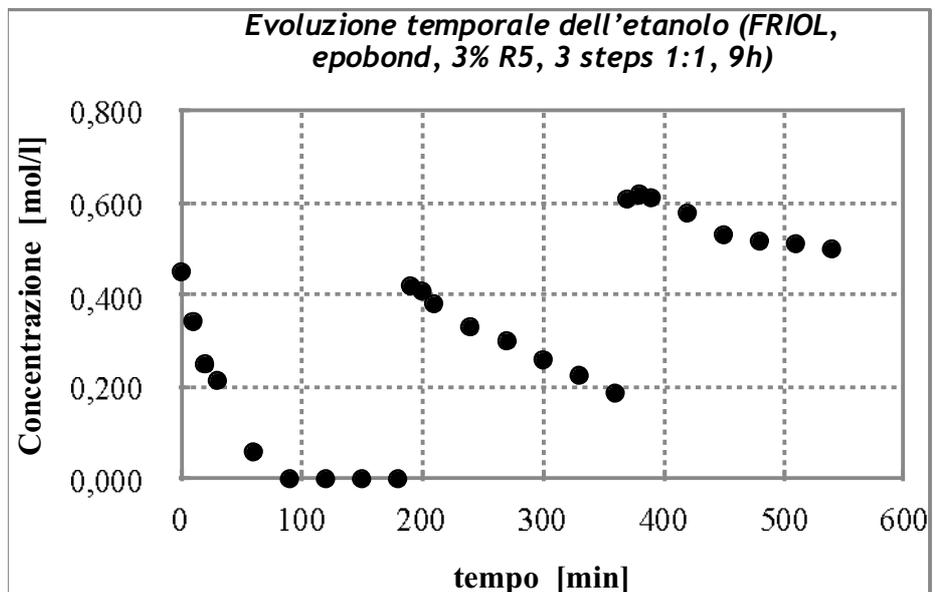
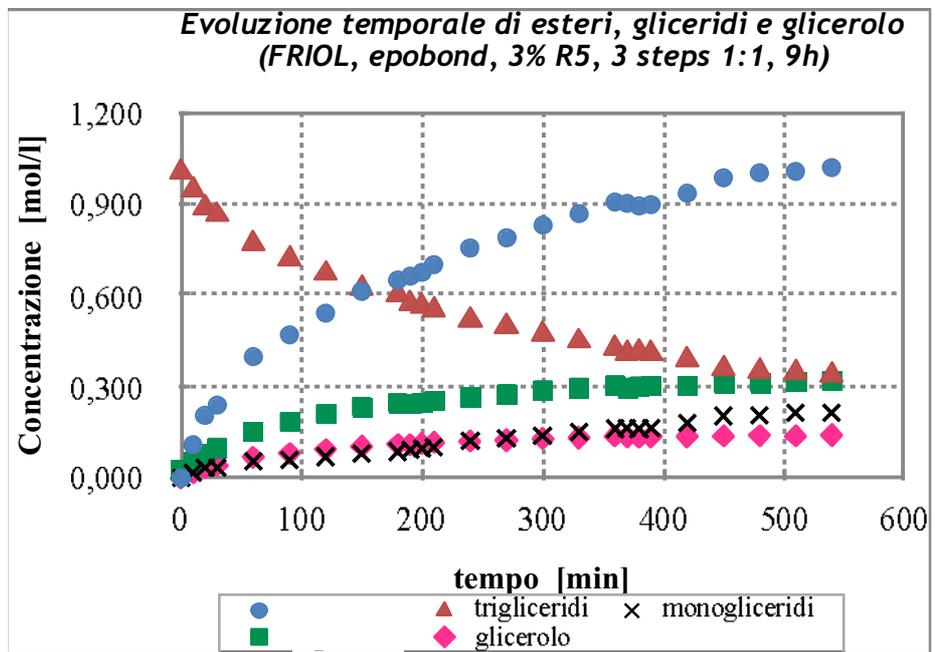
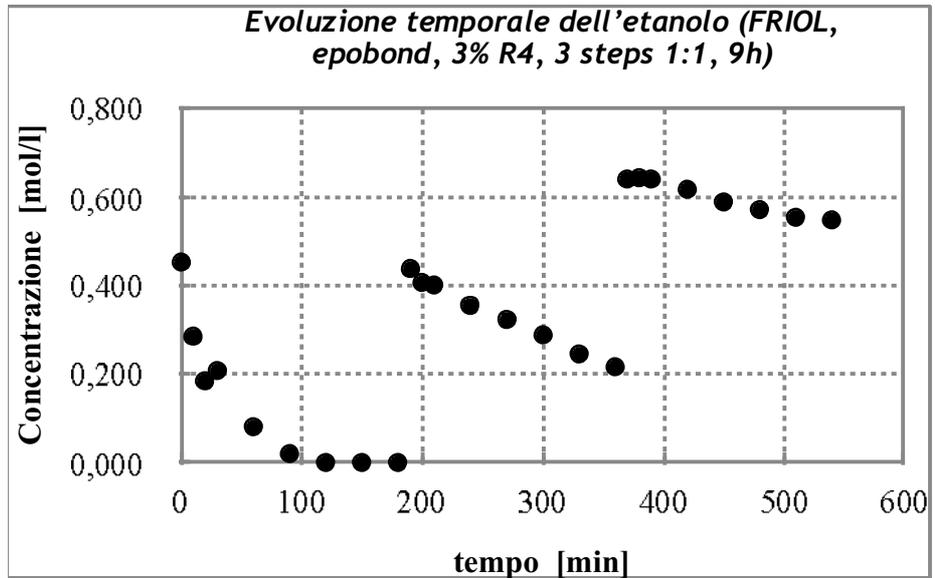


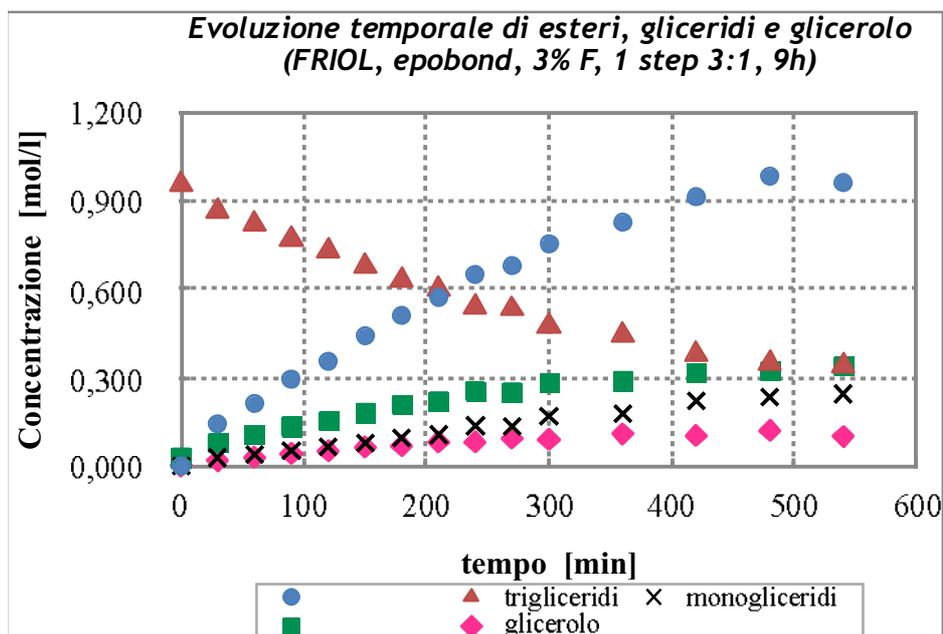
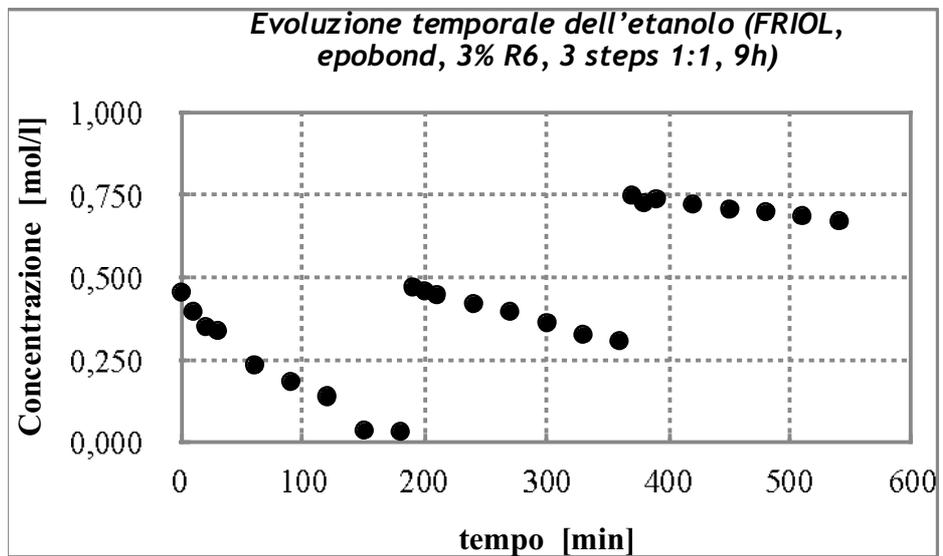
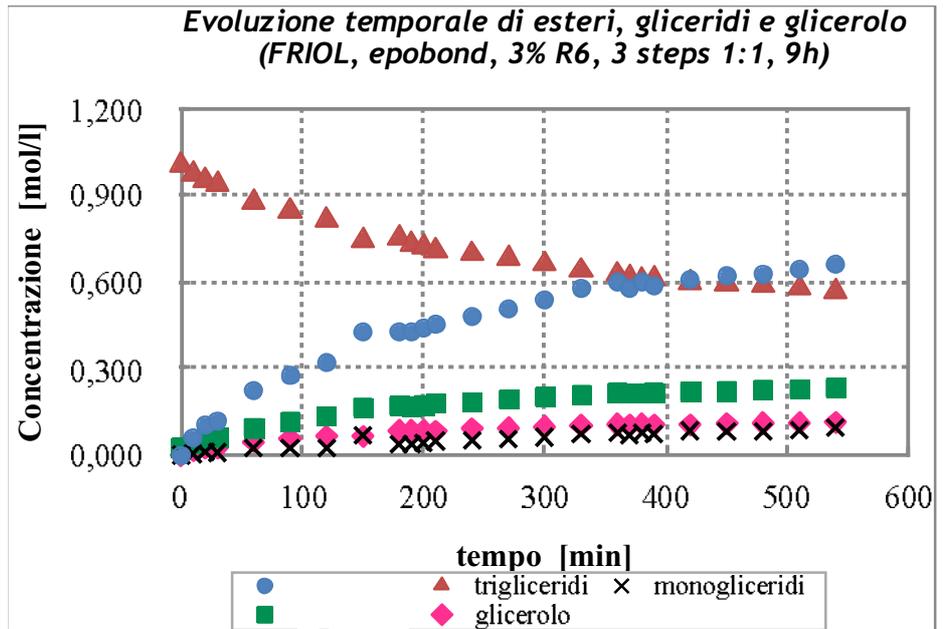


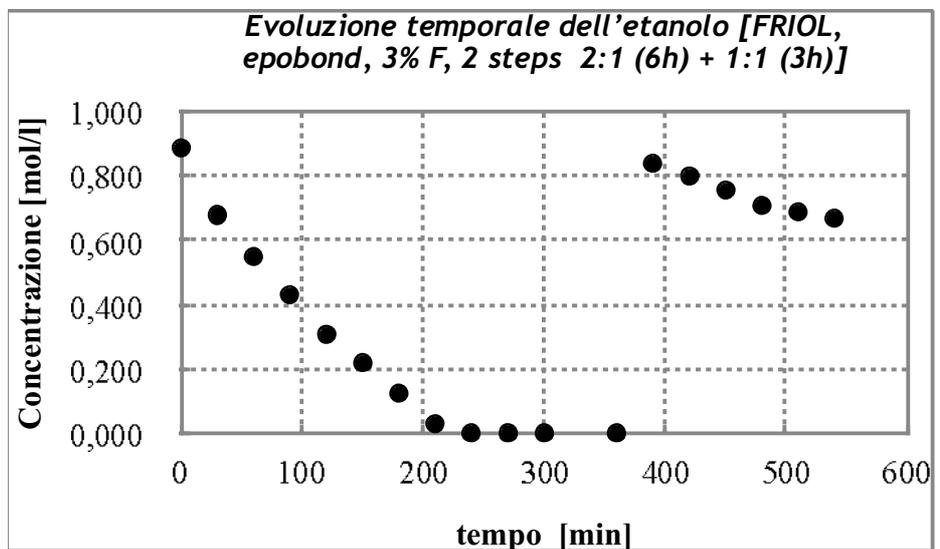
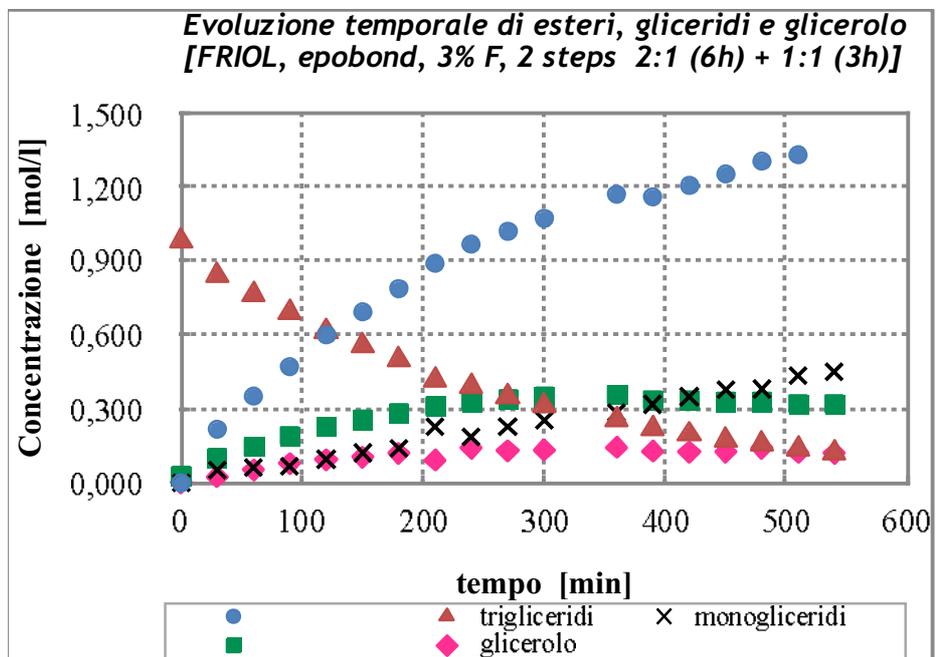
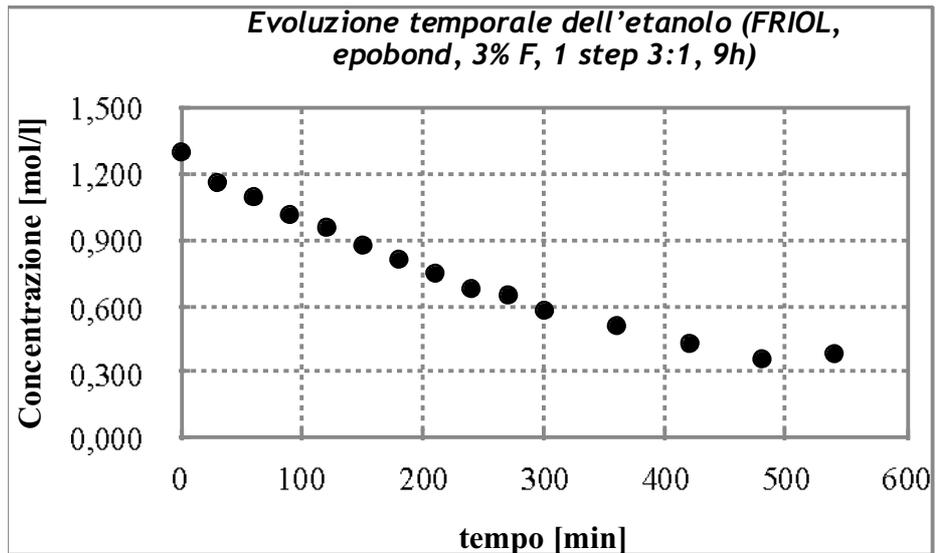


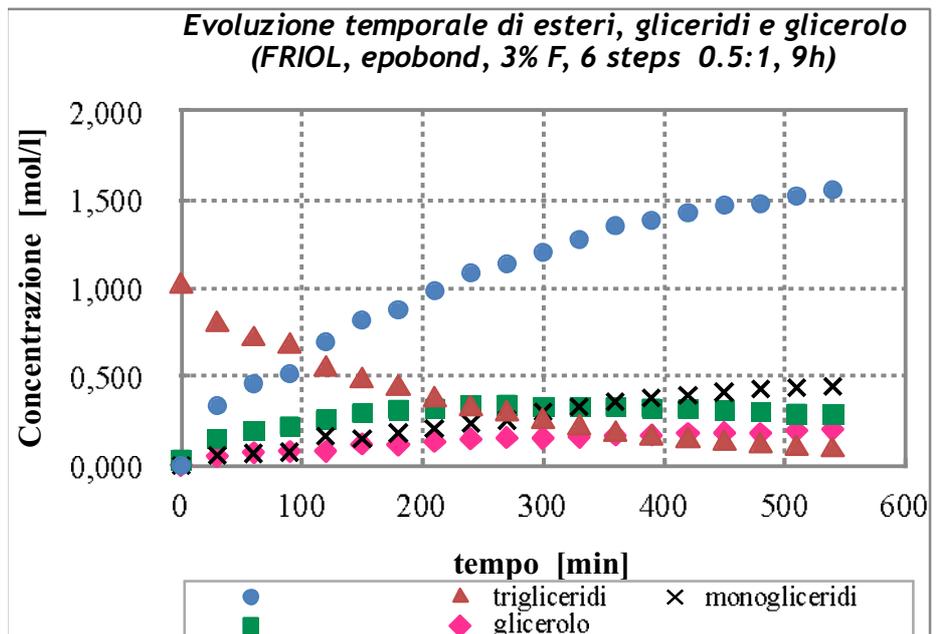
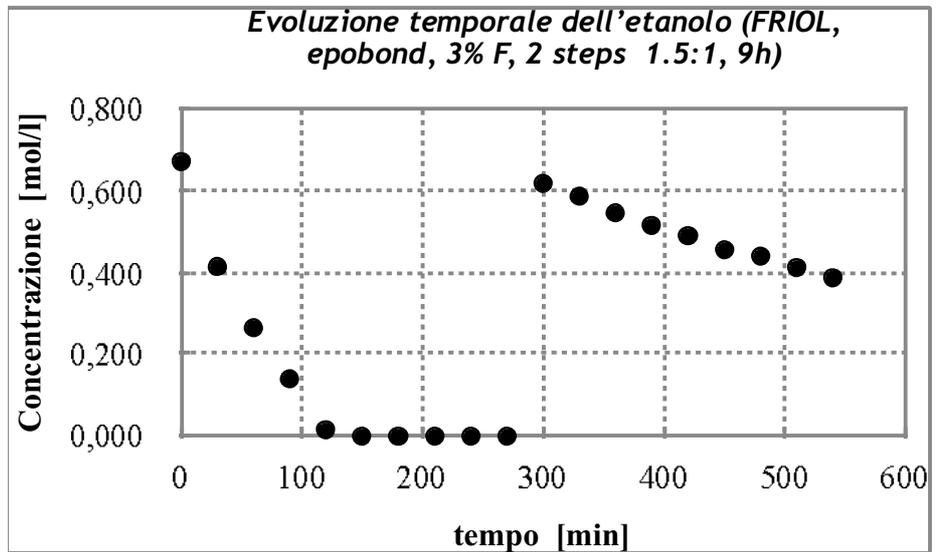
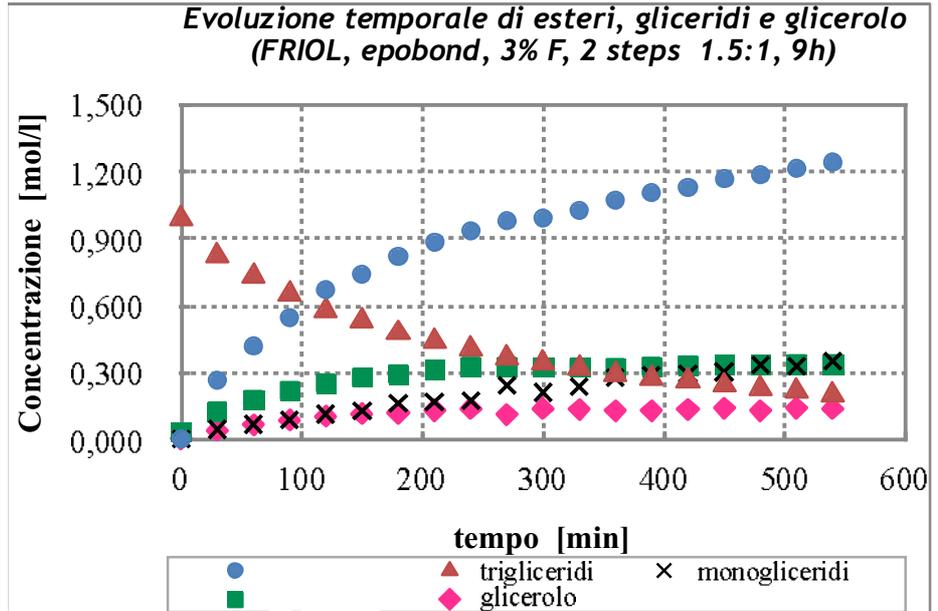


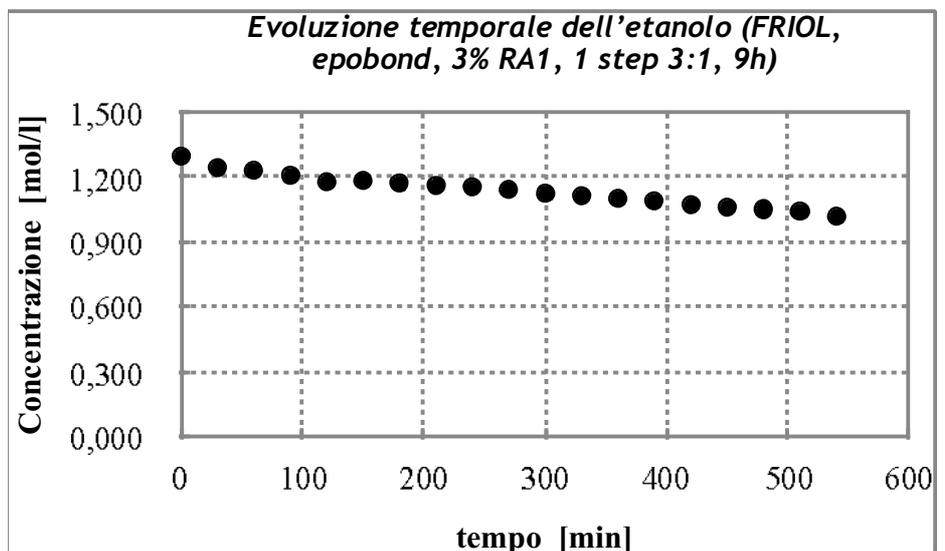
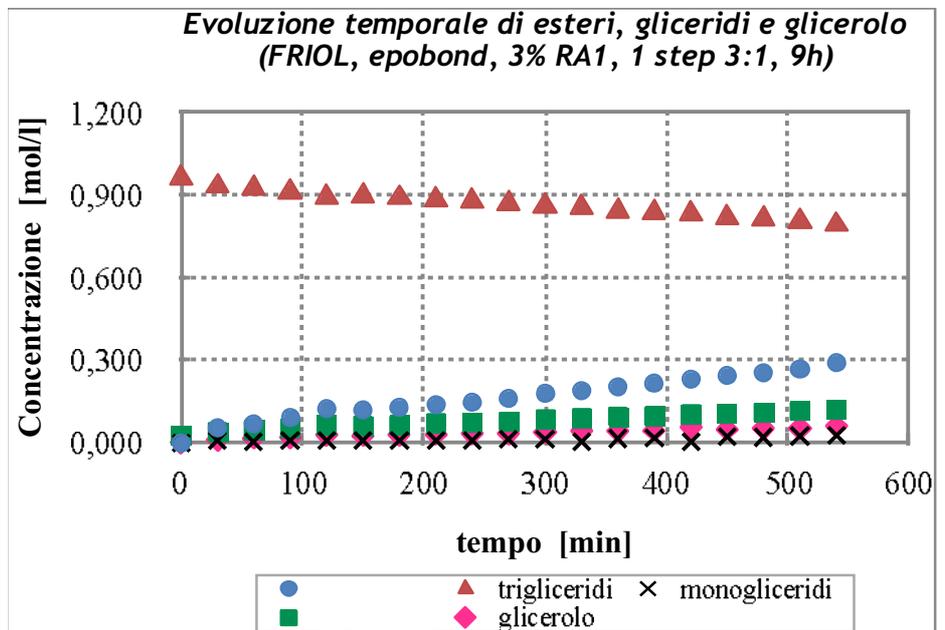
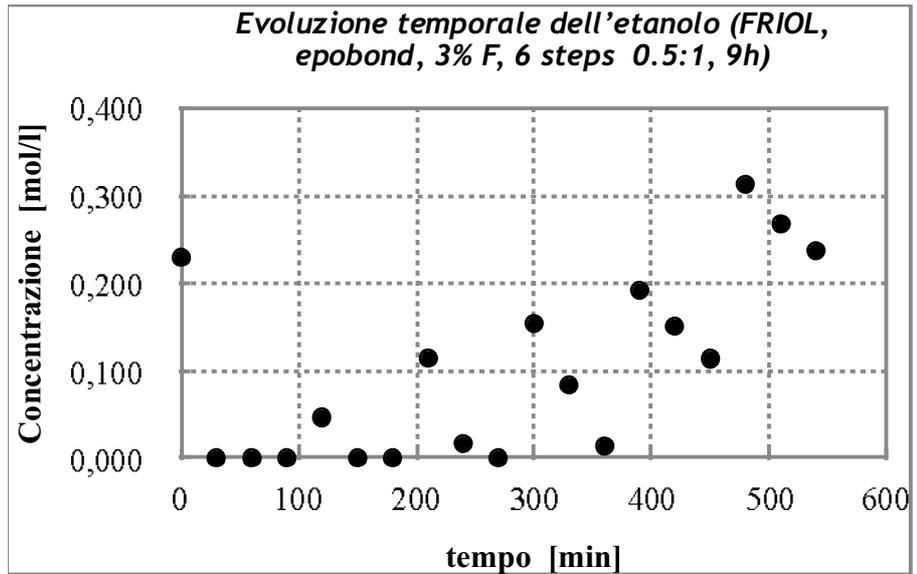


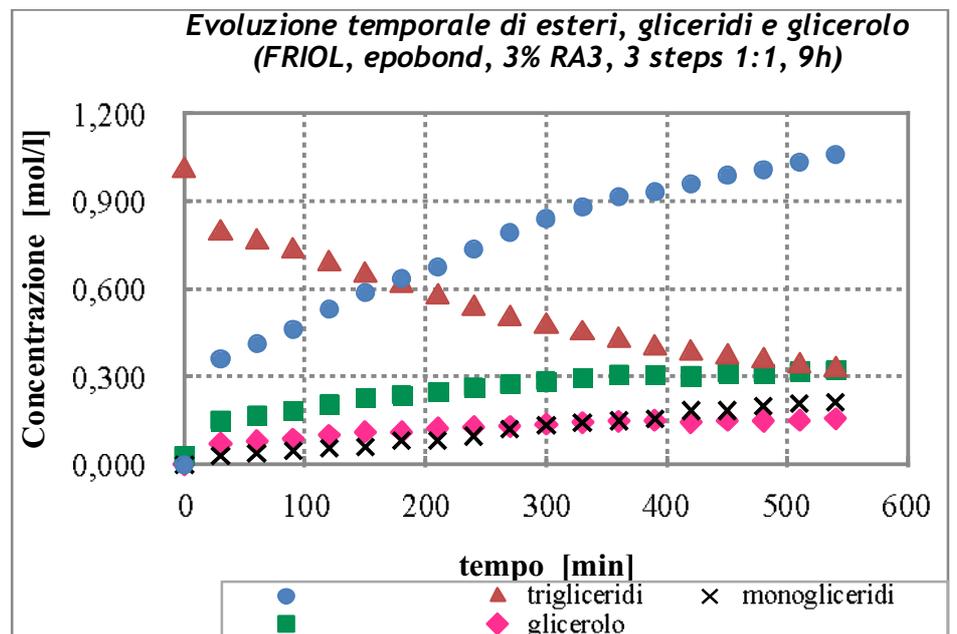
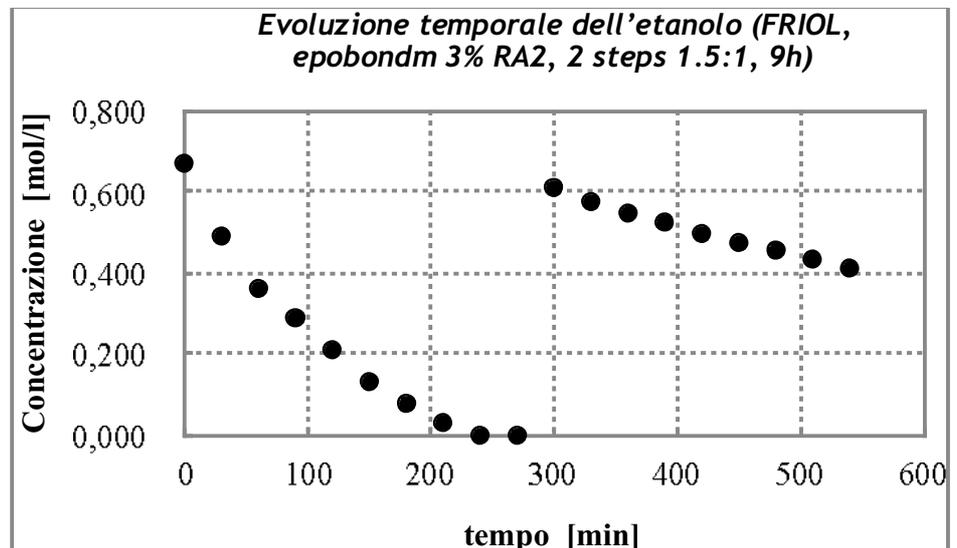
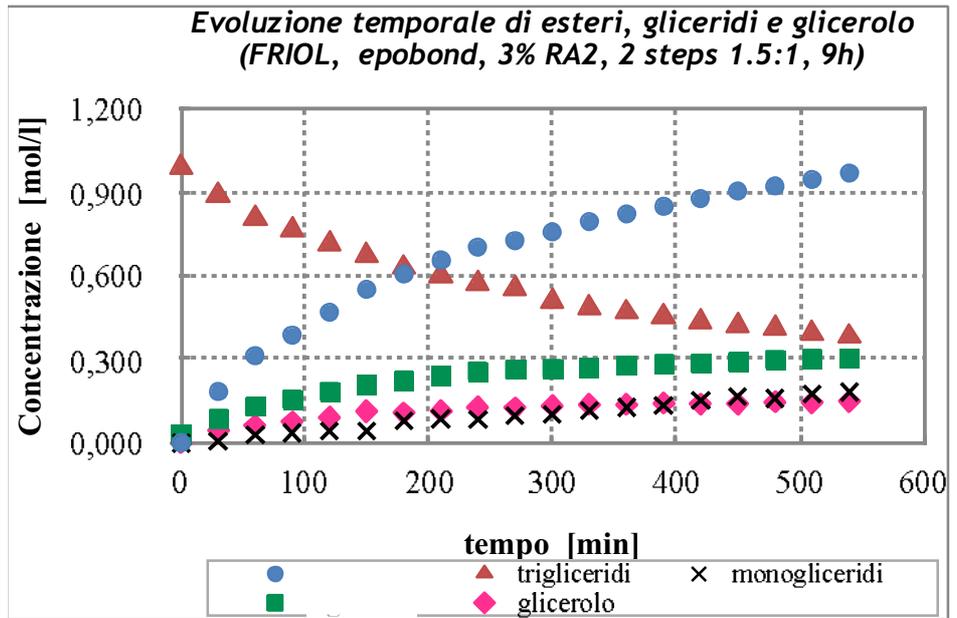


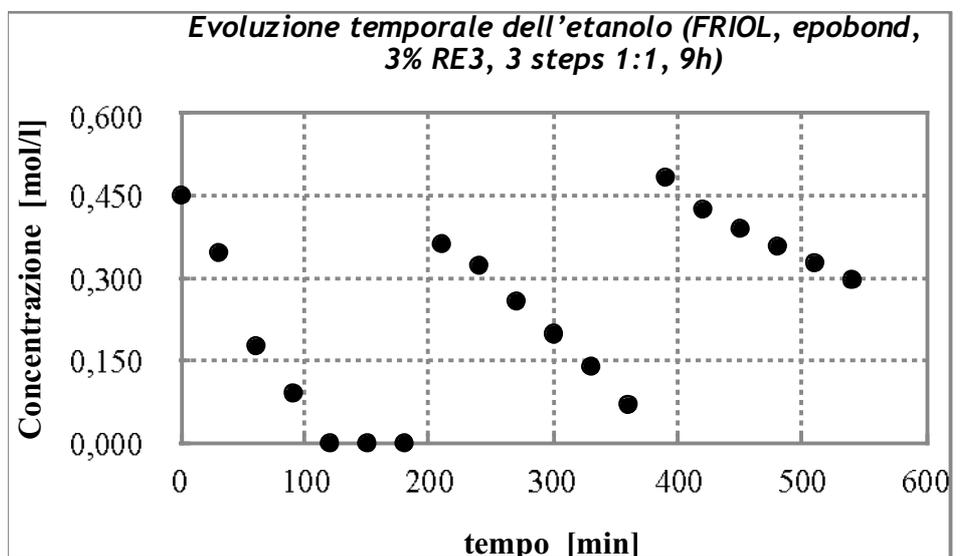
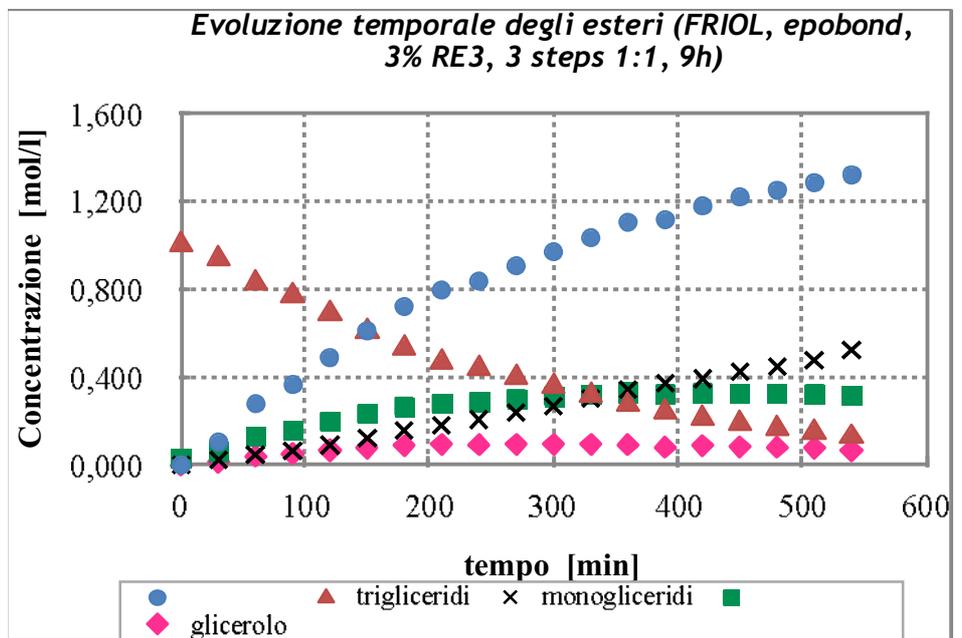
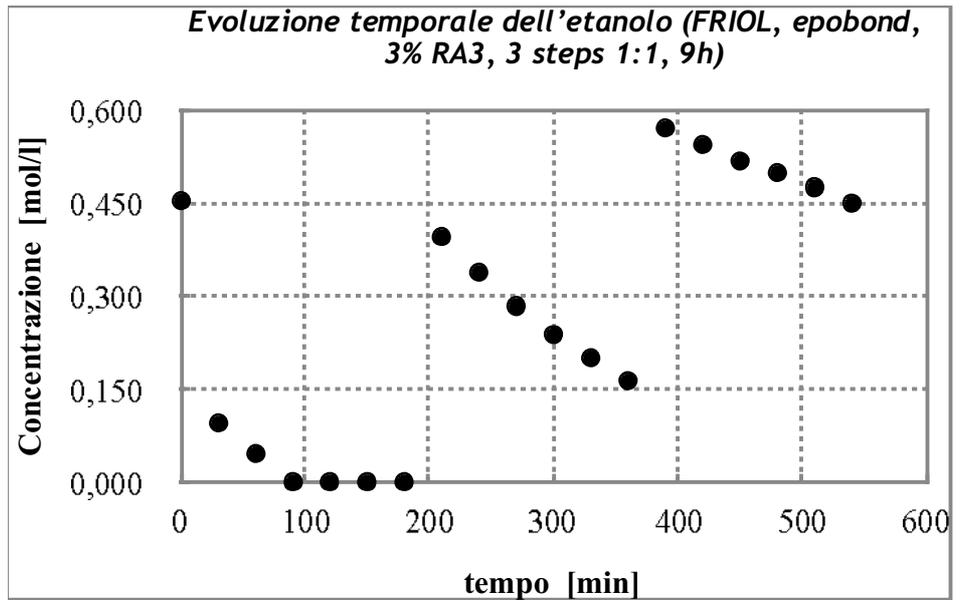


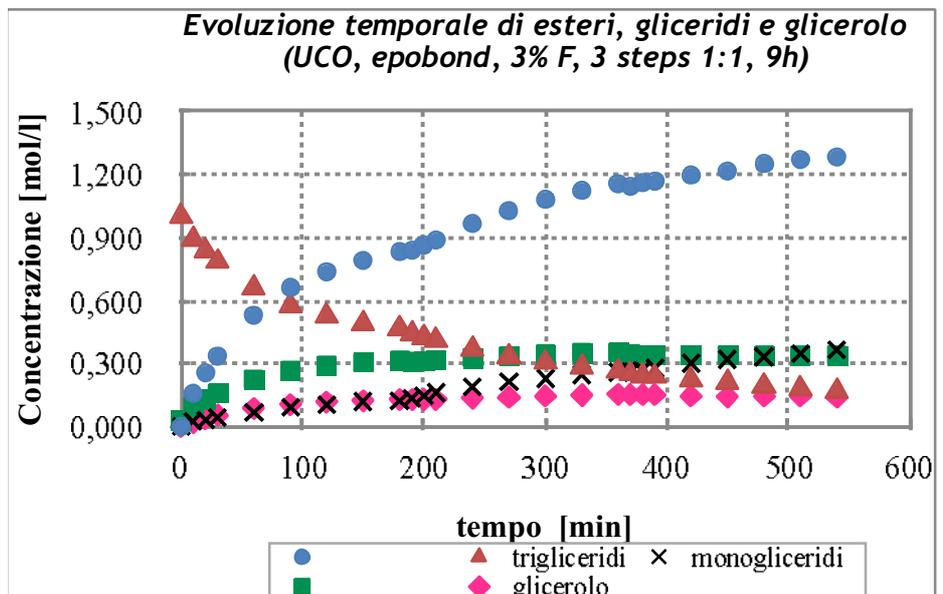
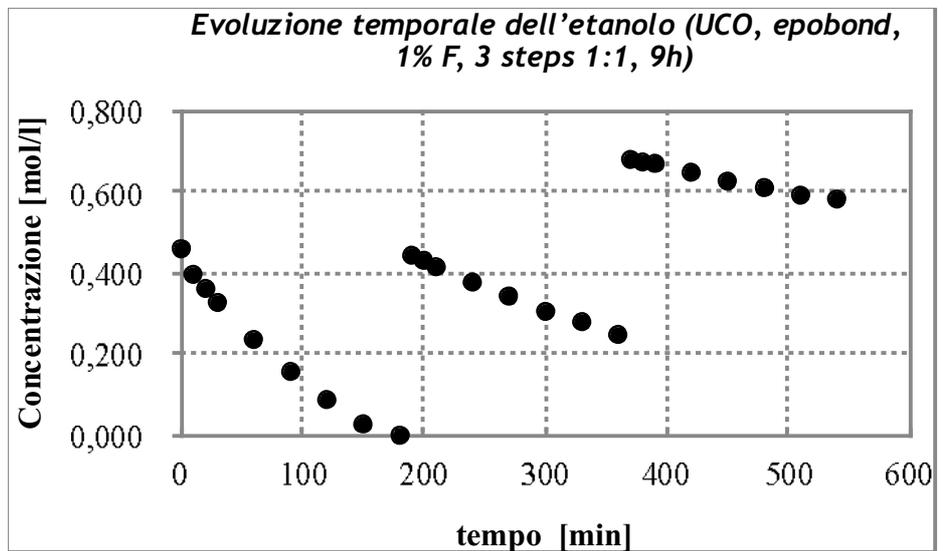
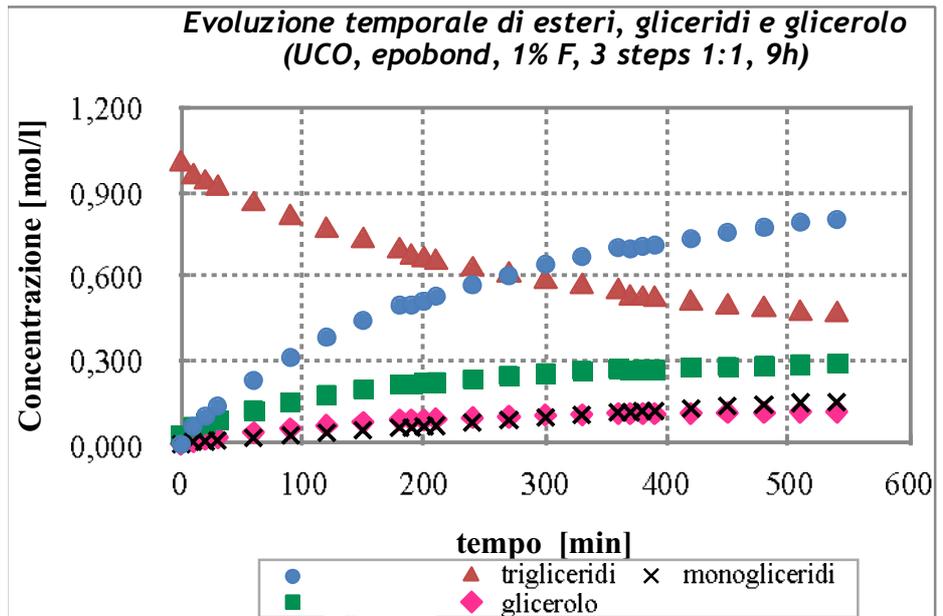


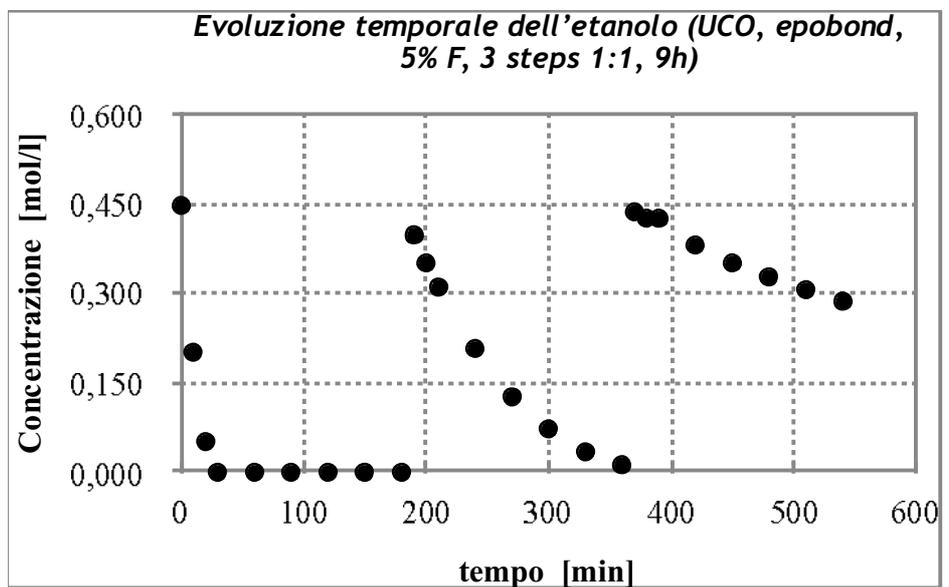
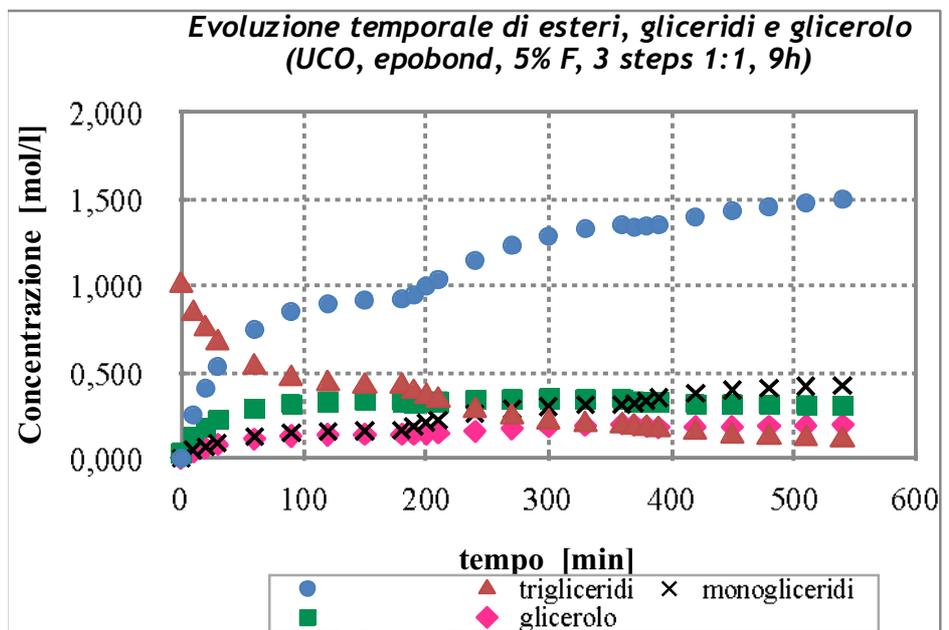
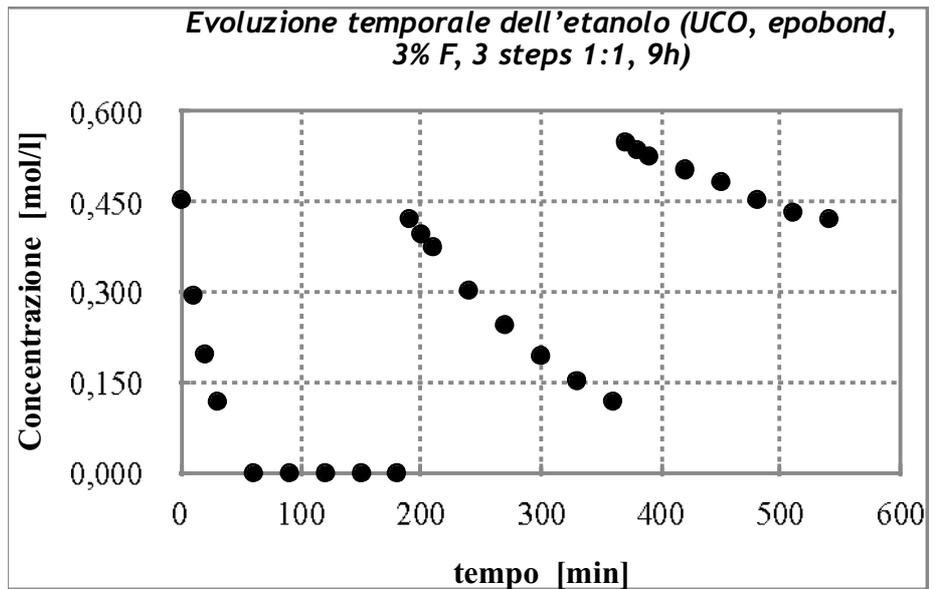


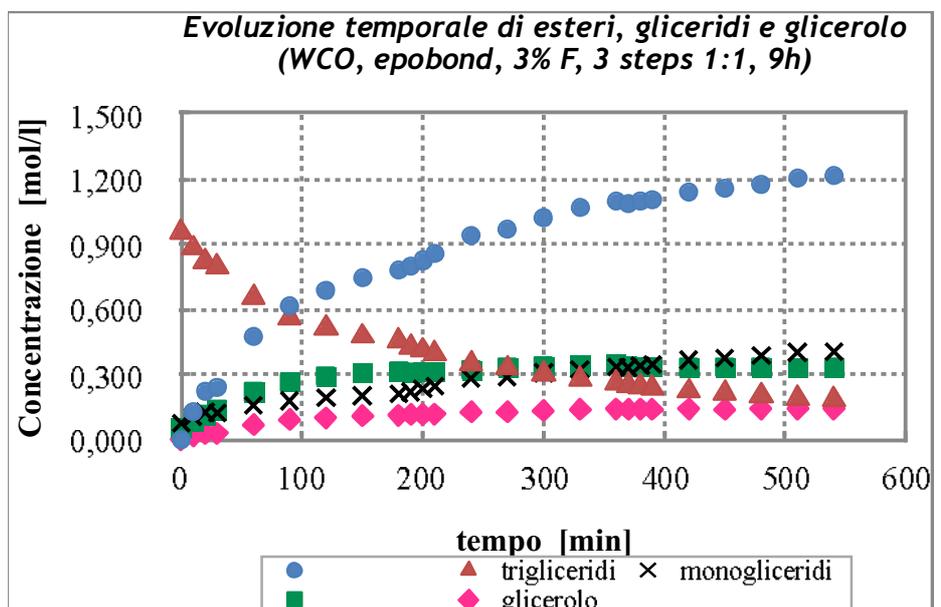
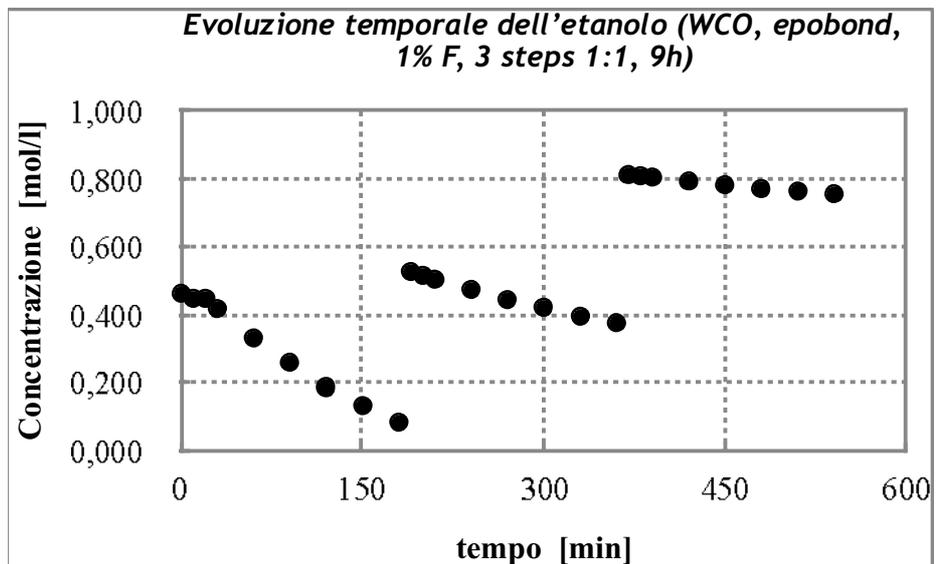
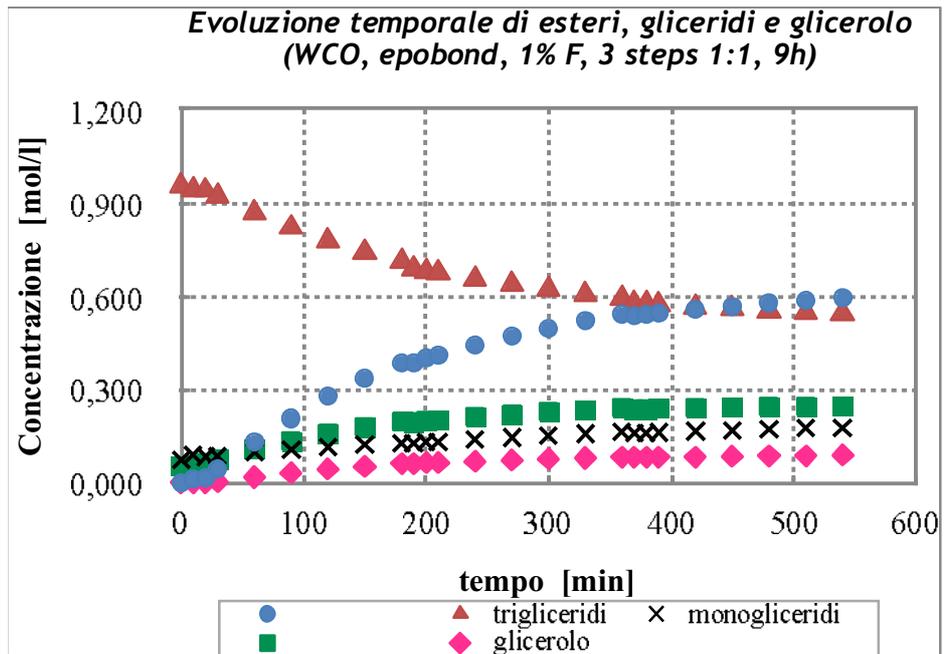


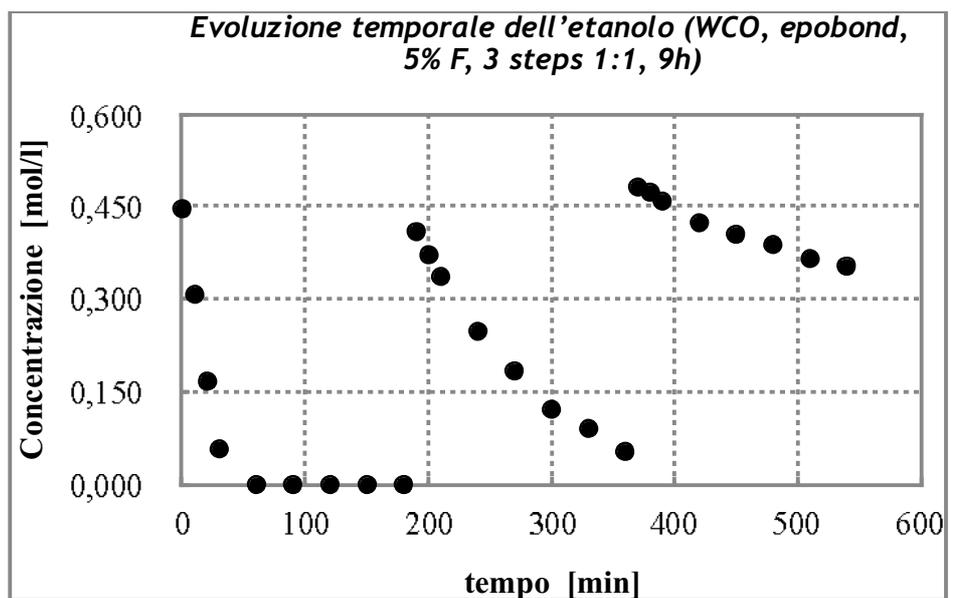
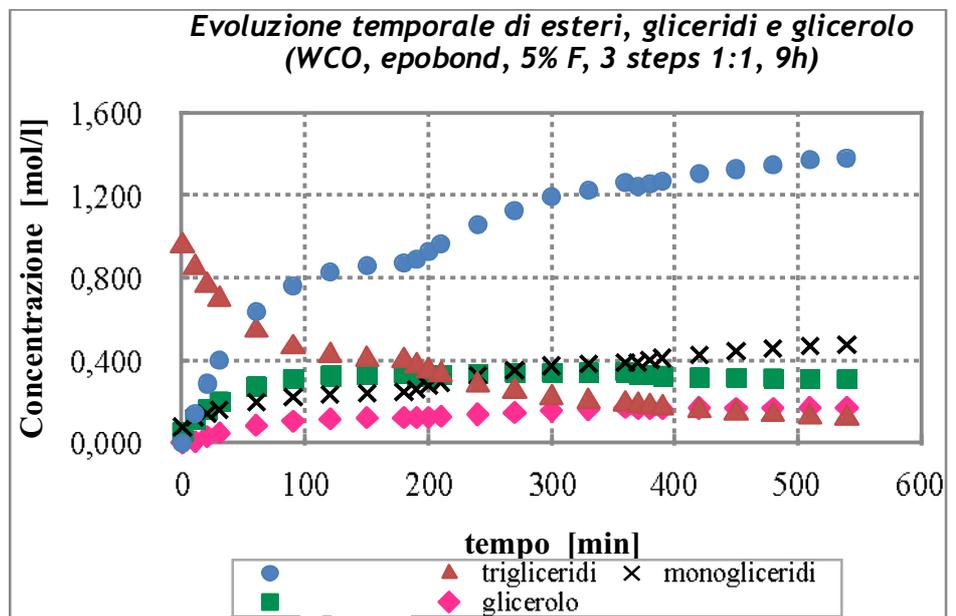
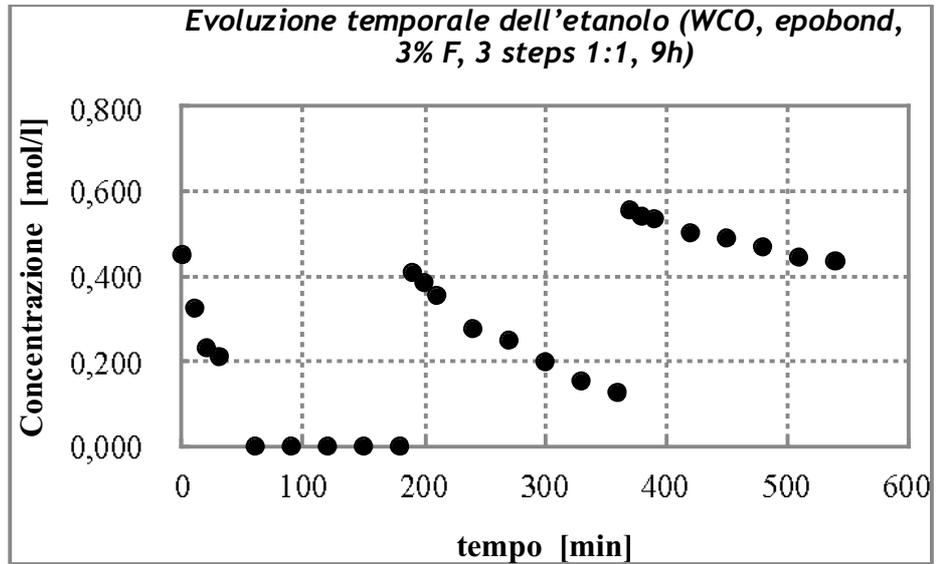












*Parte II*



investiamo nel vostro futuro



Reti Edifici Strade Nuovi Obiettivi Virtuosi per l'Ambiente e l'Energia

## Parte II: Il Progetto Res Novae

### Capitolo 1: Le acque reflue civili e meteoriche

#### 1.1 Descrizione e finalità del progetto *Res Novae*

Il progetto PON 042 a-E RES NOVAE (Reti Edifici Strade Nuovi Obiettivi Virtuosi per l'Ambiente e l'Energia) PON R&C 2007-2013 ha come obiettivo la ricerca e la sperimentazione su scala dimostrativa di un sistema di gestione avanzata dei flussi energetici a livello municipale, avvalendosi dell'integrazione di tecnologie nell'ambito dei settori *energia* ed *informatica*. In particolare, si intende razionalizzare i consumi energetici, potenziare la multi-generazione diffusa di energia da fonti rinnovabili, contenere l'impatto ambientale e accrescere la consapevolezza diffusa della questione energetico-ambientale sia nella comunità scientifica che verso la popolazione locale. Infatti, il progetto coinvolge le città di Bari e Cosenza, due aree urbane densamente popolate dell'Area della Convergenza (Puglia e Calabria), e si propone di affrontare in maniera organica le problematiche delle città, partendo dalle infrastrutture energetiche,

rivisitate in un'ottica *smart*. Pertanto, si studiano e dimostrano le diverse funzionalità per il monitoraggio, il controllo e la gestione ottimizzata dei flussi energetici negli edifici, processo noto come *active demand*. Capofila del progetto *Res Novae* è la Divisione Infrastrutture e Reti di Enel, che si avvale della collaborazione degli altri partners: General Electric e IBM, Asperience ed Elettronika, CNR, Enea (nel ruolo di Responsabilità Scientifica dell'intero progetto), Politecnico di Bari e Università della Calabria.

L'attività di ricerca condotta dall'Università della Calabria contribuisce in maniera diversificata all'innovazione e allo sviluppo di soluzioni tecnologiche e gestionali mirate alla promozione del recupero, della produzione e della gestione integrata delle diverse fonti energetiche rinnovabili e dei relativi sistemi di distribuzione. Tutto ciò è possibile se si tiene conto della necessità di incentivare le relazioni tra la dimensione urbana e quella rurale nell'ambito delle politiche energetiche, ambientali e climatiche delle *smart communities*. In particolare l'attività AR 2.1.4\_RSN "Modellistica e sperimentazioni impianti generazione diffusa a fonti rinnovabili" si occupa della progettazione di un sistema di raccolta, accumulo e riuso delle acque di "sfiore" all'interno di un bacino urbano da realizzare nella città di Cosenza; questo prevede la progettazione di un sistema di vasche che permette l'invaso di volumi di acque meteoriche temporanei, durante eventi piovosi, da poter riutilizzare come fonte di energia idroelettrica per il centro abitato. In una fase preliminare della ricerca è stato progettato un sistema che comprende: una vasca volano interrata posta a monte del bacino di interesse; un laghetto artificiale situato a valle del bacino; una condotta di collegamento tra le due vasche di raccolta, munita di impianto di sollevamento-turbina. La parte II di questo lavoro di ricerca, condotta nel Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, si inserisce nell'attività appena descritta come contributo allo studio, progettazione e realizzazione di un sistema di depurazione delle acque reflue urbane, con particolare riferimento alla rimozione di idrocarburi e metalli pesanti. La rimozione di questi ultimi è stata approfondita in un lavoro di Tesi Magistrale (Pettinato, 2015), incentrato sull'adsorbimento di alcuni metalli pesanti su materiali low-cost, come unità di trattamento integrata ad un sistema di depurazione di acque reflue civili e meteoriche. Le caratteristiche di tali acque e la normativa in materia sono discusse nelle pagine seguenti, mentre nei capitoli 2 e 3 si valuterà la soluzione rappresentata dall'impianto con bioreattore a membrana, in un sistema integrato con l'unità di

adsorbimento dei metalli pesanti, come trattamento alternativo rispetto ai convenzionali processi. L'obiettivo è la progettazione e realizzazione di quest'ultimo in laboratorio e come impianto pilota.

## 1.2 Acque reflue civili e meteoriche: Normativa

La disciplina relativa agli scarichi delle acque reflue è affidata alle seguenti normative italiane:

1. normativa statale di riferimento in vigore dal 29 aprile 2006: **D. Legs 152/2006**, “Norme in materia ambientale”, in particolare la PARTE TERZA, che è divisa in quattro sezioni:
  - sezione I: norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione;
  - sezione II: tutela delle acque dall'inquinamento;
  - sezione III: gestione delle risorse idriche;
  - sezione IV: disposizioni transitorie e finali.
2. **D. Legs 4/2008**: “Ulteriori disposizioni correttive ed integrative del D. Legs 152/06, recante norme in materia ambientale”.
3. **Decreto Ministeriale 06.11.2003 n°367**: “Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose, ai sensi dell'articolo 3, comma 4, del D. Lgs 11 maggio 1999 n°152 (non espressamente abrogato dal D. Lgs 152/2006, ma di fatto sostituito con le disposizioni di cui agli art. 78, 108 e 131 del nuovo Testo Unico in materia ambientale).

### D. Lgs 152/2006: disciplina degli scarichi

Questo decreto, nella sua parte terza e relativi allegati, disciplina la tutela dell'ambiente e in particolare delle acque superficiali, marine e sotterranee; è la norma più recente in materia ambientale, riprendendo integralmente i contenuti della normativa

precedente, senza modificarli ma abrogandoli. Già con il decreto 152/1999 era stato superato il cosiddetto “standard allo scarico”, precedentemente utilizzato come unico criterio di compatibilità di un effluente, introducendo il concetto di obiettivo di qualità del corpo idrico. Seguendo lo stesso approccio, la direttiva europea sulle acque “Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60” prevede l’approvazione da parte delle Regioni di Piani di Tutela, aventi la finalità di definire per ogni corpo idrico un obiettivo di qualità e i carichi ammissibili, i quali dovranno essere compatibili con la capacità autodepurativa del corpo idrico, così da poter stabilire in maniera più adeguata i limiti allo scarico. I principi chiave, presenti nelle direttive precedenti e in quest’ultima, riguardano: l’individuazione del bacino idrografico come unità spaziale di riferimento; la definizione di obiettivi di qualità ambientale dei corpi idrici mediante il passaggio dalle norme regolatorie sui fattori di pressione alla definizione di obiettivi per gli ecosistemi; la classificazione integrata dello stato ecologico dei corpi idrici; l’introduzione dell’analisi economica nella pianificazione delle misure e nell’allocazione dei diritti di utilizzo, e di strumenti economici basati sul principio di “chi inquina o usa paga”; la partecipazione pubblica come nuovo metodo per la pianificazione e la gestione, condizione necessaria per la definizione dei Piani di Gestione e, più in generale, per prendere decisioni realmente efficaci <sup>[1,2]</sup> (in questa *parte II* i riferimenti sitografici sono numerici, per comodità di lettura). Il governo italiano si sta adoperando con iniziative coerenti con i principi dello sviluppo sostenibile; in particolare si individuano gli obiettivi di qualità ambientale e per specifica destinazione dei corpi idrici; si applica la tutela integrata degli aspetti qualitativi e quantitativi nell’ambito di ciascun distretto idrografico ed un adeguato sistema di controllo e sanzioni; si intende rispettare i valori limite agli scarichi fissati dallo Stato e si definiscono quelli in relazione agli obiettivi di qualità del corpo ricettore; per i sistemi di fognatura si predispongono l’adeguamento, il convogliamento e la depurazione degli scarichi nell’ambito del servizio idrico integrato. Si individuano le misure per la prevenzione e la riduzione dell’inquinamento nelle zone vulnerabili e nelle aree sensibili, così come quelle mirate alla conservazione, al risparmio, al riutilizzo e al riciclo delle risorse idriche; si adottano misure per la graduale riduzione degli scarichi, delle emissioni e di ogni altra fonte di inquinamento diffuso contenente sostanze pericolose o per la graduale eliminazione degli stessi che presentano sostanze pericolose prioritarie. Con queste misure si contribuisce a raggiungere, nell’ambiente marino, dei

valori di concentrazione vicini a quelli del fondo naturale per le sostanze presenti in natura e prossime allo zero per le sostanze sintetiche antropogeniche. E' prevista l'adozione di misure volte al controllo degli scarichi e delle emissioni nelle acque superficiali secondo un approccio combinato.

I piani e i programmi di intervento sul territorio sono sottoposti alla procedura per la valutazione di impatto ambientale, costituendo così il presupposto del procedimento ordinario di autorizzazione o approvazione; i piani e i programmi di competenza regionale o degli enti locali sono valutati in sede regionale o provinciale secondo le disposizioni delle specifiche normative in materia. In questa sede sono da considerare gli articoli 73 e 74 del decreto in esame. Il primo è relativo alla prevenzione e alla riduzione dell'inquinamento, e all'attuazione del risanamento dei corpi idrici inquinati, l'uso sostenibile e durevole delle risorse idriche, con priorità per quelle potabili, e il mantenimento della capacità naturale di autodepurazione dei corpi idrici. Nell'articolo 74 si definisce *scarico* una "qualsiasi immissione di acque reflue in acque superficiali, sul suolo, nel sottosuolo e in rete fognaria, indipendentemente dalla loro natura inquinante, anche sottoposte a preventivo trattamento di depurazione".

[2] Gli scarichi urbani sono costituiti principalmente da acque reflue domestiche, cioè provenienti da insediamenti di tipo residenziale e da servizi, ottenute dal metabolismo umano e da attività domestiche. Le acque reflue industriali confluiscono negli scarichi industriali; si tratta di reflui provenienti da edifici o installazioni in cui si svolgono attività commerciali o di produzione di beni, differenti qualitativamente dalle acque reflue domestiche e da quelle meteoriche di dilavamento, intendendosi per tali anche quelle venute in contatto con sostanze o materiali, anche inquinanti, non connessi con le attività esercitate nello stabilimento.

Gli scarichi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue urbane (come miscuglio di acque reflue domestiche, industriali e di ruscellamento; queste ultime comprendono le acque meteoriche di dilavamento e quelle di lavaggio delle strade) devono conformarsi, secondo le scadenze temporali indicate, ai valori limiti definiti dalle leggi regionali vigenti alla data di entrata in vigore del presente decreto; perciò, in caso di scarichi già esistenti, questi devono rispettare, secondo le scadenze temporali indicate nel medesimo articolo, i limiti delle norme di emissione riportate in tabella 1.1; se nuovi, devono essere conformi alle stesse disposizioni dalla loro entrata in esercizio.

Potenzialità impianto in AE	2000 - 10000		>10000	
	concentrazione	% di riduzione	concentrazione	% di riduzione
Parametri (media giornaliera) <sup>(1)</sup>				
BOD5 (senza nitrificazione) [mg/L] <sup>(2)</sup>	≤ 25	70 - 90 (5)	≤ 25	80
COD [mg/L] <sup>(3)</sup>	≤ 125	75	≤ 125	75
Solidi sospesi [mg/L] <sup>(4)</sup>	≤ 35 (5)	90 (5)	≤ 35	90

tabella 1.1: Limiti di emissione per gli impianti di acque reflue indicati nella tabella 1 dell'allegato 5 del D. Lgs 152/06

Note alla tabella 1.1:

Con le sigle BOD e COD si indicano dei metodi di misura del grado di inquinamento attraverso la quantità di ossigeno da somministrare all'acqua, per ripristinare l'originale condizione di purezza. <sup>[3]</sup> In particolare, BOD è l'acronimo di Biochemical Oxygen Demand e rappresenta la quantità di ossigeno (mg/L) richiesta dai processi biochimici di depurazione delle acque di rifiuto attraverso l'azione dei batteri saprofiti aerobi. La determinazione del BOD si ottiene mettendo un campione dell'acqua in esame a contatto, alla temperatura di 20°C, con una certa quantità di acqua satura di ossigeno e rimisurando la quantità di ossigeno ancora presente dopo 20 giorni, trascorsi i quali si ritiene esaurito il processo di biodegradazione. In genere, però, si preferisce abbreviare il periodo della prova ad un tempo di 5 giorni (BOD<sub>5</sub>), che corrisponde al consumo del 70% dell'ossigeno disciolto in un litro d'acqua alla temperatura di 20°C.

Il COD (Chemical Oxygen Demand) indica la quantità di ossigeno richiesta per l'ossidazione di sostanze allo stato ridotto presenti in acqua. La determinazione del COD è basata sulla digestione a caldo del campione di acqua analizzato in presenza di una soluzione 0,25 N di dicromato di potassio e di acido solforico per un periodo di due ore. In tali condizioni si ossida quantitativamente il carbonio contenuto nelle sostanze organiche presenti nell'acqua, mentre non viene ossidata l'ammoniaca libera né l'azoto legato alle sostanze organiche. La misura del COD fornisce, quindi, un'indicazione del grado di inquinamento dell'acqua esaminata e, abbinata al BOD<sub>5</sub>, consente di valutare la biodegradabilità delle sostanze inquinanti.

- (1) *Le analisi sugli scarichi provenienti da lagunaggio o fitodepurazione devono essere effettuati su campioni filtrati, la concentrazione dei solidi sospesi non deve superare i 150 mg/L.*
- (2) *La misurazione deve essere fatta su campione omogeneizzato non filtrato, non decantato. Si esegue la determinazione dell'ossigeno anteriormente e posteriormente ad un periodo di incubazione di 5 giorni a  $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , in completa oscurità, con aggiunta di inibitori di nitrificazione.*
- (3) *La misurazione deve essere fatta su un campione omogeneizzato non filtrato, non decantato con bicromico di potassio.*
- (4) *La misurazione deve essere fatta mediante filtrazione di un campione rappresentativo attraverso membrana filtrante con porosità di  $0,45\mu\text{m}$  ed essiccazione a  $105^{\circ}\text{C}$  con conseguente calcolo del peso, oppure mediante centrifugazione per almeno 5 minuti (accelerazione media di 2800 - 3200 g), essiccazione a  $105^{\circ}\text{C}$  e calcolo del peso.*
- (5) *La percentuale di riduzione del  $\text{BOD}_5$  non deve essere inferiore a 40. Per i solidi sospesi la concentrazione non deve superare i 70 mg/L e la percentuale di abbattimento non deve essere inferiore al 70%.*

Nella tabella 1.2 si considerano i parametri azoto totale e fosforo totale, le cui concentrazioni o percentuali di riduzione del carico inquinante indicate devono essere raggiunti per uno o entrambi a seconda della situazione locale. Nello stesso decreto è, inoltre, riportato all'articolo 106 la possibilità per le Regioni di imporre, al posto del trattamento più spinto degli scarichi provenienti da agglomerati di consistenza di oltre 10000 AE, una riduzione di almeno il 75% del carico di azoto e fosforo in ingresso a tutti gli impianti di trattamento. Devono inoltre essere rispettati, nel caso di fognature che convogliano anche scarichi di acque reflue industriali, i valori limiti riportati nelle tabelle 1.2 e 1.3, oltre a quelli già presentati nella 1.1.

Potenzialità impianto in AE	10000 - 100000		>100000	
	concentrazione	% di riduzione	concentrazione	% di riduzione
Parametri (media annua)				
Fosforo totale P [mg/L] <sup>(1)</sup>	≤ 2	80	≤ 1	80
Azoto totale N [mg/L] <sup>(2) (3)</sup>	≤ 15	70 - 80	≤ 10	70 -80

tabella 1.2: Limiti di emissione per gli impianti di acque reflue urbane indicati nella tabella 2 dell'allegato 5 del D. Lgs. 152/06

Note alla tabella 1.2:

- (1) Il metodo di riferimento per la misurazione è la spettrofotometria di assorbimento molecolare.
- (2) Per azoto totale si intende la somma dell'azoto Kjeldhal (N organico + NH<sub>3</sub>) + azoto nitrico + azoto nitroso. Il metodo di riferimento per la misurazione è la spettrofotometria di assorbimento molecolare .
- (3) In alternativa al riferimento alla concentrazione media annua, purché si ottenga una analogo livello di protezione ambientale, ci si può fare riferire alla concentrazione media giornaliera che non può superare u 20 mg/L per ogni campione in cui la temperatura dell'effluente sia pari o superiore a 12°C.

Parametro	Unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria (*)
pH		5,5 - 9,5	5,5 - 9,5
temperatura	°C	(1)	(1)
colore		non percepibile con diluizione 1:20	non percepibile con diluizione 1:40
odore		non deve essere causa di molestie	non deve essere causa di molestie
materiali grossolani		assenti	assenti
solidi speciali totali	mg/L	≤ 80	≤ 200
BOD <sub>5</sub> (come O <sub>2</sub> )	mg/L	≤ 40	≤ 250
COD (come O <sub>2</sub> )	mg/L	≤ 160	≤ 500

alluminio	mg/L	≤ 1	≤ 2
arsenico	mg/L	≤ 0,5	≤ 0,5
bario	mg/L	≤ 20	
boro	mg/L	≤ 2	≤ 4
cadmio	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,2
cromo totale	mg/L	≤ 2	≤ 4
cromo VI	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,2
ferro	mg/L	≤ 2	≤ 4
manganese	mg/L	≤ 2	≤ 4
mercurio	mg/L	≤ 0,005	≤ 0,005
nichel	mg/L	≤ 2	≤ 4
piombo	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,3
rame	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,4
selenio	mg/L	≤ 0,03	≤ 0,03
stagno	mg/L	≤ 10	
zinco	mg/L	≤ 0,5	≤ 1
cianuri totali (come CN)	mg/L	≤ 0,5	≤ 1
cloro attivo libero	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,3
solfori (come H <sub>2</sub> S)	mg/L	≤ 1	≤ 2
solfiti (come SO <sub>3</sub> )	mg/L	≤ 1	≤ 2
solfati (come SO <sub>4</sub> )	mg/L	≤ 1000	≤ 10000
cloruri	mg/L	≤ 1200	≤ 1200
fluoruri	mg/L	≤ 6	≤ 12
fosforo totale (come P)	mg/L	≤ 10	≤ 10
azoto ammoniacale (come NH <sub>4</sub> )	mg/L	≤ 15	≤ 30
azoto nitroso (come N)	mg/L	≤ 0,6	≤ 0,6
azoto nitrico (come N)	mg/L	≤ 20	≤ 30
grassi e oli vegetali/ animali	mg/L	≤ 20	≤ 40
idrocarburi totali	mg/L	≤ 5	≤ 10
fenoli	mg/L	≤ 0,5	≤ 1
aldeidi	mg/L	≤ 1	≤ 2
solventi organici aromatici	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,4

solventi organici azotati	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,2
tensioattivi totali	mg/L	≤ 2	≤ 4
pesticidi fosforati	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,1
pesticidi totali (esclusi i fosforati)	mg/L	≤ 0,05	≤ 0,05
<i>tra cui</i>			
aldrin	mg/L	≤ 0,01	≤ 0,01
dieldrin	mg/L	≤ 0,01	≤ 0,01
endrin	mg/L	≤ 0,002	≤ 0,002
isodrin	mg/L	≤ 0,002	≤ 0,002
solventi clorurati	mg/L	≤ 1	≤ 2
Escherichia coli	UFC/100mL		
saggio di tossicità acuta		il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 80% del totale

tabella 1.3: Limiti di emissione per gli impianti di acque reflue urbane indicati nella tabella 3 dell'allegato 5 del D. Lgs. 152/06

Note alla tabella 1.3:

(\*) I limiti per lo scarico in rete fognaria sono obbligatori in assenza di altri limiti stabiliti dall'autorità competente o in assenza di un impianto di trattamento in grado di rispettare i limiti di emissione dello scarico finale.

(1) Per i corsi d'acqua la variazione massima tra le temperature medie di qualsiasi sezione del corso d'acqua a monte e a valle del punto di immissione non deve superare i 3°C. Su almeno metà di qualsiasi sezione a valle tale variazione non deve superare 1°C. Per i laghi la temperatura dello scarico non deve superare i 30°C e l'incremento di temperatura del corpo recipiente non deve in nessun caso superare i 3°C oltre 50 metri dalla distanza del punto di immissione. Per i canali artificiali il massimo valore medio della temperatura dell'acqua di qualsiasi sezione non deve superare i 35°C, la condizione suddetta è subordinata all'assenso del soggetto che gestisce il canale. Per il mare e per le zone di foce di corsi d'acqua non significativi, la temperatura dello scarico non deve superare i 35°C e

*l'incremento di temperatura del corpo ricevente non deve in nessun caso superare i 3°C oltre 1000 metri di distanza dal punto di immissione. Deve inoltre essere assicurata la compatibilità ambientale dello scarico con il recipiente ed evitata la formazione di barriere termiche alla foce del fiume [4].*

All'interno del D. Lgs 152/2006 sono previste delle disposizioni riguardo ai rifiuti presso impianti di trattamento delle acque reflue urbane: i fanghi provenienti dagli impianti di depurazione delle acque reflue sono considerati come rifiuti prodotti dall'attività stessa. Se essi provengono da un impianto la cui attività è esclusivamente quella di depurare acque reflue, i rifiuti possono essere classificati come pericolosi o non pericolosi a seconda delle sostanze in essi contenute. I fanghi, in quanto rifiuti, sono soggetti a specifica normativa. Proprio nell'articolo 110 si disciplina il trattamento dei rifiuti presso impianti di trattamento delle acque reflue urbane. Normalmente tale trattamento non è ammesso, ma sono contemplate delle eccezioni. L'autorità competente, in relazione a particolari esigenze e nei limiti della capacità residua di trattamento, autorizza il gestore del servizio idrico integrato a smaltire nell'impianto di trattamento di acque reflue urbane rifiuti liquidi, purché compatibili con il processo di depurazione. Il gestore del servizio idrico integrato è autorizzato ad accettare in impianti con caratteristiche e capacità depurative adeguate, che rispettino i valori limite, i seguenti rifiuti e materiali, purché provenienti dal proprio Ambito territoriale ottimale oppure da altro Ambito territoriale ottimale sprovvisto di impianti adeguati:

- rifiuti costituiti da acque reflue che rispettino i valori limite stabiliti per lo scarico in fognatura;
- rifiuti costituiti dal materiale proveniente dalla manutenzione ordinaria di sistemi di trattamento di acque reflue domestiche previsti;
- materiali derivanti dalla manutenzione ordinaria della rete fognaria nonché quelli derivanti da altri impianti di trattamento delle acque reflue urbane, nei quali l'ulteriore trattamento dei medesimi non risulti realizzabile tecnicamente e/o economicamente.

Il gestore deve indicare la capacità residua dell'impianto e le caratteristiche e quantità dei rifiuti che intende trattare. L'autorità competente può indicare quantità diverse o vietare il trattamento di specifiche categorie di rifiuti. Il produttore e il trasportatore dei rifiuti sono tenuti al rispetto della normativa in materia di rifiuti. Il gestore del servizio idrico integrato che tratta rifiuti è soggetto all'obbligo di tenuta del registro di carico e

scarico secondo quanto previsto dalla vigente normativa in materia di rifiuti [2].

I fanghi provenienti da impianti di depurazione, a seconda delle sostanze contenute e della concentrazione, possono essere avviati ad operazioni di smaltimento o di recupero (Allegati B e C della parte IV). I metodi maggiormente utilizzati per lo smaltimento sono: il deposito sul suolo o nel sottosuolo; il trattamento biologico non specificato; l'incenerimento a terra.

I metodi di recupero possono essere così riassunti: riciclo/recupero delle sostanze organiche non utilizzate come solventi; riciclo/recupero delle sostanze inorganiche; spandimento sul suolo a beneficio dell'agricoltura o dell'ecologia, in conformità a quanto previsto dalla normativa vigente.

### **1.3 Acque reflue urbane**

L'articolo 74 del D. Lgs 152/2006 stabilisce che per liquami urbani o acque reflue urbane si intendono “*acque reflue domestiche o il miscuglio di acque reflue domestiche, di acque reflue industriali ovvero meteoriche di dilavamento convogliate in reti fognarie, anche separate, e provenienti da agglomerato*”. Queste acque, dopo essere state utilizzate in diversi processi o attività di varia natura, hanno perduto le caratteristiche qualitative originarie, divenendo inadatte per un uso diretto o per uno scarico diretto in un corpo idrico. Le acque reflue urbane presentano caratteristiche estremamente variabili, che dipendono da diversi fattori, tra cui il numero di abitanti serviti, la localizzazione geografica del nucleo urbano servito, gli usi e i costumi degli abitanti della zona e l'eventuale presenza di acque di scarico industriali. I reflui urbani devono, pertanto, le loro caratteristiche non solo ai contributi dell'attività metabolica umana, ma anche in parte all'uso di prodotti chimici quali detersivi, solventi, oli e acidi. Inoltre, sono da considerare le acque di drenaggio delle aree urbane (strade, piazzali), e la presenza nei centri urbani di utenze come lavanderie, stazioni di servizio, laboratori artigianali e garages che scaricano nelle fognature reflui di carattere industriale [5].

I residui delle attività umane che accompagnano tali acque modificano la qualità dei

corpi idrici che le ricevono, causando il fenomeno di “inquinamento delle acque”, classificato in diversi gradi:

- primo grado di inquinamento: si verifica per cause naturali. È il caso dell’acqua piovana che viene a mescolarsi con le sostanze presenti nel suolo, comprese quelle inquinanti. Il grado di inquinamento è, però, tale da consentirne comunque l’uso, salvo in casi particolari nei quali deve essere sottoposta a trattamenti, in particolare se utilizzata per uso potabile.
- Secondo grado di inquinamento: più grave del primo grado di inquinamento, si ottiene quando l’acqua, pur ricevendo dall’esterno sostanze inquinanti, presenta caratteristiche tali da poter essere depurata naturalmente, senza l’intervento umano, ma grazie all’azione di alcuni microrganismi che, sfruttando l’ossigeno disciolto nell’acqua, consentono la decomposizione delle sostanze nocive in prodotti semplici.
- Terzo grado di inquinamento: è il caso in cui il contenuto delle sostanze inquinanti è tale da non poter essere eliminato naturalmente, perché la capacità autodepurativa del corpo idrico ricettore è insufficiente per affrontare l’alto contenuto di sostanze inquinanti presenti nelle acque reflue.

Le reti fognarie raccolgono e allontanano le acque reflue e meteoriche dagli insediamenti civili e produttivi; si possono classificare in:

- *miste*, se raccolgono sia i reflui urbani che le acque meteoriche;
- *separate*, se si utilizzano reti distinte per convogliare i reflui (fogna nera) e le acque meteoriche (fogna bianca).

A loro volta le acque reflue possono essere distinte nel seguente modo:

- acque nere, contenenti anche elementi solidi organici;
- acque bianche, costituite da acqua meteorica, ossia pioggia, neve e grandine;
- acque grigie, costituite da acque saponate, in genere provenienti da docce, vasche e scarichi di lavatrici, che devono confluire nel degrassatore;
- acque industriali, inquinate da numerosi prodotti, che necessitano di reti fognarie e depuratori dedicati <sup>[6]</sup>.

Nelle acque di scarico urbane sono presenti diverse sostanze che, in prima analisi, possono essere raggruppate in otto categorie. La tabella 1.4 sintetizza per ciascun gruppo il tipo di sostanza presente e gli eventuali effetti sull'ambiente:

Categoria	Sostanze comprese	Effetti sull'ambiente
Solidi sospesi	Sostanze in sospensione di natura organica e inorganica che possono depositarsi come fanghi nei corpi idrici recettori	Alterano il normale equilibrio dell'ecosistema in conseguenza dell'aumento della torbidità (limitazione della quantità di luce che penetra nell'acqua con effetti dannosi sugli organismi fotoautotrofi; riduzione e morte degli organismi bentonici sessili per eccessivo deposito di sedimenti)
Sostanze organiche biodegradabili	Sostanze che possono essere degradate biologicamente dagli organismi decompositori presenti in ambiente acquatico (proteine 40-60%), carboidrati (25-50%), grassi (circa 10%). La totalità delle sostanze organiche biodegradabili presenti nei liquami urbani viene comunemente espressa in termini di BOD <sub>5</sub> (domanda biologica di ossigeno) o di COD (domanda chimica di ossigeno)	L'incremento dei normali processi di decomposizione biologica può determinare condizione di anossia
Nutrienti	Elementi indispensabili per l'accrescimento della vita acquatica come il fosforo e l'azoto	Provocano fenomeni di eutrofizzazione (eccezionale sviluppo di fitoplancton in superficie, stimolato dall'eccesso di nutrienti, con conseguente anossia dovuta al materiale biodegradabile derivante dalle alghe morte)
Microrganismi patogeni	Organismi che causano malattie infettive a trasmissione oro-fecale	Possibile trasmissione di infezioni, soprattutto se i corpi idrici ricettori dei liquami trattati possono essere utilizzati come fonte di approvvigionamento idrico, come acque adibite alla balneazione o per l'allevamento di molluschi

Sostanze prioritarie	Elenco di 33 classi di sostanze prioritarie e pericolose adottato dalla Comunità Europea, per le quali deve essere bandito o limitato l'uso.	Sostanze di cui si sospetta o si conosce l'alta tossicità, la cancerogenità, la mutagenicità e la capacità di alterare il normale funzionamento del sistema endocrino (modificatori endocrini)
Sostanze organiche refrattarie	Sostanze che non vengono degradate con i naturali processi biologici (fenoli, coloranti, pesticidi, diserbanti)	
Metalli pesanti	Elementi chimici metallici che hanno una densità relativamente alta e sono tossici in basse concentrazioni (mercurio, piombo, cromo, arsenico, cadmio, zinco)	
Solidi inorganici disciolti	Composti inorganici disciolti la cui concentrazione aumenta durante il ciclo di utilizzo dell'acqua stessa	

tabella 1.4: *Classificazione di sostanze potenzialmente presenti nelle acque di scarico urbane* <sup>[5]</sup>

La presenza delle sostanze contaminanti, presentate nella tabella 1.4, può dar luogo ad alcune problematiche, qui di seguito evidenziate. Ad esempio, i solidi sospesi nelle acque di scarico non trattate possono portare allo sviluppo di depositi di fango e di condizioni anaerobiche, mentre gli organismi patogeni possono trasmettere malattie. I composti organici biodegradabili, costituiti essenzialmente da proteine, carboidrati e grassi, sono comunemente misurati come BOD e COD. Se scaricati nell'ambiente senza alcun trattamento, la loro stabilizzazione biologica può portare all'esaurimento delle risorse naturali di ossigeno e allo sviluppo di condizioni settiche. I nutrienti come l'azoto e il fosforo, insieme con il carbonio, sono essenziali per la crescita. Quando riversati negli ambienti acquatici causano lo sviluppo di indesiderate forme di vita acquatiche (eutrofizzazione); se scaricate in grosse quantità sui terreni, determinano l'inquinamento delle acque sotterranee. I metalli pesanti sono solitamente presenti nelle acque di scarico delle attività commerciali e industriali; se ne deve predisporre la rimozione nel caso di riutilizzo dell'acqua di scarico. I composti organici ed inorganici supposti o noti come cancerogeni, mutageni o ad elevata tossicità si trovano frequentemente nelle acque di scarico, così come i composti organici refrattari, cioè

resistenti ai metodi convenzionali di trattamento; esempi di questi sono i tensioattivi, fenoli e pesticidi agricoli. I composti inorganici disciolti sono costituiti da calcio, sodio, solfati e cloruri; questi sono aggiunti all'acqua in conseguenza del suo utilizzo comune e devono essere rimossi se l'acqua di scarico deve essere riutilizzata.

Le acque reflue <sup>[7]</sup> presentano del materiale organico, che può essere raggruppato nel seguente modo:

- *Proteine*: sono i principali costituenti degli organismi animali; contengono carbonio, elemento comune a tutte le sostanze organiche, così come ossigeno e idrogeno; possono contenere azoto fino al 16% e in molti casi zolfo, ferro e fosforo.
- *Carboidrati*: molto comuni in natura, includono zuccheri, cellulosa e fibre vegetali. Contengono carbonio, idrogeno e ossigeno; solo alcuni sono solubili in acqua.
- *Grassi e oli*: costituiscono il terzo componente principale del cibo; sono composti da gliceridi.
- *Tensioattivi*: grandi molecole organiche poco solubili in acqua e causa di schiume negli impianti di trattamento e nei corsi d'acqua in cui sono scaricati; derivano principalmente dai detersivi sintetici.
- *Composti a basso peso molecolare (VOC)*: composti organici che hanno punto di ebollizione pari a 100°C e tensione di vapore intorno a 1 mmHg a 25°C, considerati volatili. Una volta allo stato gassoso sono mobili e possono quindi essere rilasciati facilmente nell'ambiente.
- *Pesticidi*: molto tossici per qualunque forma di vita.

Le varie sostanze inquinanti possono essere presenti nelle acque reflue sia in forma solubile che associate al materiale particolato. È diffusa la classificazione di queste in quattro classi granulometriche:

- frazione sedimentarie ( $> 100\mu\text{m}$ );
- frazione sovracolloidale ( $1 \div 100\mu\text{m}$ );
- frazione colloidale ( $0,001 \div 1\mu\text{m}$ );
- frazione solubile ( $< 0,001\mu\text{m}$ ).

Nei reflui di origine civile il carico organico, valutato in termini di COD, presenta diversi esempi di ripartizione granulometrica, come riportato nella tabella 1.5; qui si nota che i limiti delle classi granulometriche possono variare in funzione della

metodologia adottata per separarle (sedimentazione, centrifugazione, filtrazione) oltre alle diverse caratteristiche delle acque di scarico urbane. La gran parte delle sostanze organiche presenti nelle acque di scarico urbane è relativa al materiale particolato, sia sedimentabile che finemente disperso sottoforma colloidale o sovracolloidale [5].

Riferimento	COD totale [mg/L]	% di COD per classe granulometrica			
		sedimentabile	sovracolloidale	colloidale	solubile
Rickert & Hunter, 1971	418	29	21 (sedimentabile - 1 $\mu$ m)	10 (0,001 - 1 $\mu$ m)	40 (< 0,001 $\mu$ m)
Munk et al., 1980	498	43 (> 106 $\mu$ m)	30 (106 - 3 $\mu$ m)	15 (3 - 0,025 $\mu$ m)	12 (<0,025 $\mu$ m)
Orhon et al., 1997	410	27	39 sedimentabile - 1,2 $\mu$ m)	34 (< 1,2 $\mu$ m)	
Vaillant et al., 1999	430	29	31 (sedimentabile - 1,2 $\mu$ m)	31 (1,2 $\mu$ m - 10 kD)	9 (<10 kD)
Marani et al.	162 - 392	34 - 49	30 - 46 (sedimentabile - 1 $\mu$ m)	3 - 10 (1 - 0,2 $\mu$ m)	13 - 28 (<0,2 $\mu$ m)

tabella 1.5: Esempi di distribuzione granulometrica del COD in acque di scarico urbane [5]

Per quanto riguarda le acque meteoriche l'art.113 del D. Lgs 152/06 "Acque di prima pioggia e lavaggio di aree esterne" afferma che:

- ai fini della prevenzione di rischi idraulici e ambientali le regioni, previo parere del Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio, disciplinano le forme di controllo degli scarichi di acque meteoriche di dilavamento provenienti da reti fognarie separate ed i casi in cui è richiesto che le immissioni delle acque meteoriche di dilavamento, effettuate tramite altre condotte separate, siano sottoposte a particolari prescrizioni, ivi compresa l'eventuale autorizzazione.
- Le Regioni disciplinano altresì i casi in cui può essere richiesto che le acque di prima pioggia e di lavaggio delle aree esterne siano convogliate e opportunamente trattate in impianti di depurazione per particolari casi nelle quali, in relazione alle attività svolte, vi sia il rischio di dilavamento delle superfici impermeabili scoperte di sostanze

pericolose o di sostanze che creano pregiudizio per il raggiungimento degli obiettivi di qualità dei corpi idrici.

- È comunque vietato lo scarico di acque meteoriche nelle acque sotterranee [8].

Questo articolo e le sue direttive rispondono all'esigenza di contenere e ridurre l'inquinamento delle acque meteoriche di dilavamento provenienti dalle pavimentazioni delle strade urbane ed extraurbane, oltre che alle loro aree di pertinenza (aree di parcheggio, di servizio, di caselli a pedaggio, ecc...). L'acqua di pioggia subisce una contaminazione dilavando l'atmosfera, le strade e le pertinenze stradali: la prima interazione tra l'acqua e gli inquinanti avviene in atmosfera, in cui sono presenti sia contaminanti di origine naturale che antropica; successivamente, l'acqua di pioggia dilava le superfici stradali trascinando una parte del materiale che si è accumulato durante il tempo asciutto. La deposizione atmosferica sul suolo ha luogo sia in tempo asciutto che durante la pioggia: nel primo caso l'entità dell'inquinamento è minore e si manifesta per particelle molto piccole (di dimensioni inferiori a 60  $\mu\text{m}$ ), nel secondo caso si verifica prima l'incorporazione di sostanze nelle goccioline dentro la nube (*rainout*) e successivamente il dilavamento atmosferico (*washout*). Il carico inquinante di origine atmosferica riguarda i composti disciolti come i metalli, i cloruri e il sodio.

Perciò, le sedi stradali e le loro aree di pertinenza sono caratterizzati da una fase di accumulo durante il tempo asciutto e il successivo dilavamento operato dalla pioggia; gli inquinanti su queste superfici provengono dalla deposizione atmosferica di tempo asciutto, dal traffico veicolare (derivati da combustione dei carburanti, usura di pneumatici, parti meccaniche e impianto frenante dei veicoli principalmente), da rifiuti in prevalenza organici, dalla vegetazione, dall'erosione del manto stradale (Papiri & Todeschini, 2004).

La tabella 1.6 mostra i principali agenti inquinanti che si depositano su strade e pertinenze stradali insieme con le principali fonti di emissione:

<b>Agenti inquinanti</b>	<b>Principali fonti di emissione</b>
particolato	consumo della pavimentazione, deposizione atmosferica, manutenzione stradale
azoto e fosforo	deposizione atmosferica, fertilizzanti utilizzati sul bordo della strada
piombo	gas di scarico, consumo freni, oli lubrificanti, grassi, consumo cuscinetti
zinco	usura pneumatici, olio motore, grassi, corrosione dei guard-rail
ferro	usura delle parti meccaniche del veicolo, corrosione delle carrozzerie, strutture in ferro sulle strade (pannelli, guard-rail, segnaletica)
rame	usura freni, carrozzeria veicoli, usura delle parti meccaniche, insetticidi e anticrittogamici
cadmio	usura pneumatici
cromo	carrozzeria veicoli, consumo freni e frizione
nichel	combustione a diesel, oli lubrificanti, carrozzerie, asfalto, consumo freni
manganese	usura parti meccaniche
sodio, calcio, cloro	prodotti antigelo
zolfo	benzine, prodotti antigelo
petrolio	perdite dei motori, asfalti e bitume
bromo	gas di scarico dei motori
gomma	consumo pneumatici
amianto	consumo freni e frizione

tabella 1.6: *Agenti inquinanti di infrastrutture viarie e loro fonti di emissione (Ball et al., 1998)*

Durante il *washout* l'acqua di pioggia dilava gli inquinanti accumulati sulla superficie nel periodo antecedente all'evento meteorico sia attraverso l'impatto delle gocce che con lo scorrimento superficiale; in questo modo si realizza il distacco e il trasporto delle particelle. L'entità di questi fenomeni dipende dall'intensità e dalla durata delle precipitazioni, ma anche dalle caratteristiche della superficie dilavata, come la morfologia delle sedi stradali, la tipologia del traffico veicolare e la destinazione d'uso delle aree considerate (Bannerman, 1999). All'aumentare dell'importanza della strada in termini di flusso veicolare aumentano i carichi inquinanti in termini di concentrazioni di nutrienti, sostanze organiche e metalli pesanti.

Le acque piovane contengono diverse sostanze chimiche derivanti da: eruzioni vulcaniche, emissioni di gas e sublimazioni di solidi della crosta terrestre, polveri e altri solidi portati nell'atmosfera dal vento, spray marini, gas e altri prodotti introdotti nell'atmosfera dagli organismi viventi e inquinanti antropici. Pertanto, sono presenti sostanze e ioni, tra cui calcio, magnesio, potassio, sodio, bicarbonato, cloro, solfati, composti azotati, fosfati, cadmio, rame, ferro, piombo, nickel e zinco.

Ball et al. (1998) hanno, inoltre, evidenziato che nelle aree destinate al parcheggio degli autoveicoli la concentrazione di idrocarburi è superiore rispetto a quella misurate nelle strade, dal momento che nella fase di accensione il veicolo consuma più carburante rispetto alla normale marcia e durante la sosta le perdite di oli e benzine sono più frequenti. I valori limite di concentrazione per gli idrocarburi sono indicati nel D. Lgs 152/06 e dai Decreti Ministeriali Ambiente del 27/09/2010 e 8/11/2011, come riportati nella tabella 1.7:

<b>Matrice</b>	<b>Normativa</b>	<b>Parametro</b>	<b>Valore Limite</b>
<i>Acque sotterranee</i>	D.Lgs 152/06 Parte IV, Titolo V All.5, Tab.2	Idrocarburi totali espressi come n-esano	350 µg/L
<i>Acque reflue</i>	D.Lgs 152/06 Parte III All.5, Tab.3	Idrocarburi totali	·5 mg/L (acque superficiali) ·10 mg/L (rete fognaria)
<i>Acque superficiali (destinate ad acqua potabile)</i>	D.Lgs 152/06 Parte III All.2, Tab.1/A	Idrocarburi disciolti o emulsionati	0,05 mg/L (*) 0,2 mg/L (*) 0,5 mg/L (*) 1 mg/L (*)
<i>Acque superficiali</i>	D.M. Ambiente 8/11/2011 n.260, All.1, Tab.3	Idrocarburi totali espressi come n-esano	350 µg/L
<i>Suolo e sottosuolo</i>	D.Lgs 152/06 Parte IV Titolo V All.5 Tab.2	Idrocarburi leggeri C <sub>≤</sub> 12	10 mg/kg ss (siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale)
			250 mg/kg ss (siti ad uso industriale e commerciale)
		Idrocarburi pesanti C <sub>&gt;</sub> 12	50 mg/kg ss (siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale)
			750 mg/kg ss (siti ad uso industriale e commerciale)
<i>Rifiuti inerti</i>	D.M. Ambiente 27/09/2010	Olio minerale (da C10 a C40)	500 mg/kg discarica

tabella 1.7: Valori limite per gli idrocarburi nelle diverse matrici e normativa di riferimento

Per le acque reflue i dati relativi ai valori limiti sono stati già evidenziati in tabella 1.3. e qui confrontati con le diverse matrici.

## Parte II

### **Capitolo 2: Processi di trattamento di acque reflue civili e meteoriche**

#### **2.1 Processo di trattamento alternativo: il bioreattore a membrana**

La necessità di disporre di acqua pura è un problema dalle proporzioni globali, caratterizzato dalla crescente richiesta di fornitura e disponibilità di ingenti quantitativi (Howell et al., 2004; Bixio et al., 2006). Il trattamento di acque reflue, note come *wastewaters*, coinvolge i singoli individui, le comunità, le industrie e le Nazioni; il riciclo dell'acqua costituisce un approccio pragmatico e sostenibile in diversi Paesi. In questo contesto si ricercano soluzioni tecnologiche competitive mirate al trattamento delle acque reflue (Jefferson et al., 2000); tra queste i sistemi a membrana rivestono un ruolo preminente nella purificazione e riuso dell'acqua in diversi campi. I bioreattori a membrana (*Membrane BioReactors, MBRs*), combinando il processo a membrane con quello biologico per il trattamento delle acque reflue, si pongono come una soluzione tecnologica alternativa per ottenere un effluente di alta qualità, che può essere destinato a diversi tipi di riutilizzo (Tadkaew et al., 2007; Jimenez & Asano, 2008). La qualità dell'effluente, privo in molti casi di elementi patogeni e sottoposto nelle fasi successive a blandi trattamenti di potabilizzazione dell'acqua, è il fattore predominante nel confronto con altri processi; inoltre i bioreattori a membrana presentano scarso ingombro, consentono di operare a concentrazioni di biomassa superiori rispetto ai trattamenti a fanghi attivi, rendendo così il processo indipendente dall'età del fango (*Solid Retention Time, SRT*) o dal tempo di residenza idraulico (*Hydraulic Retention Time, HRT*). Hanno, inoltre, tempi di avviamento brevi e buona flessibilità ai

cambiamenti nella composizione del refluo influente (Melin et al., 2006). I principali svantaggi legati ai MBRs riguardano principalmente i costi delle membrane e la problematica del *fouling*, di cui si parlerà più avanti (Saturno et al., 2008).

Come precedentemente accennato, un bioreattore a membrana per trattamento di acque reflue assolve due azioni contemporaneamente: una di tipo biologico, che tramite la popolazione batterica consuma le sostanze inquinanti presenti nel sistema di reazione, e un'ultrafiltrazione a membrana, che separa il prodotto desiderato (effluente purificato) dai fanghi ancora presenti nel reattore. Il posizionamento dell'unità filtrante rispetto al comparto biologico divide i sistemi MBRs in due categorie (Judd, 2006):

- sistemi a membrana sommersa, in cui l'unità filtrante è interna alla vasca di ossidazione;
- sistemi *side-stream* (a membrana esterna), in cui la membrana è situata all'esterno del bioreattore.

I due sistemi sono mostrati in figura 2.1, dove nello schema a sinistra il modulo a membrana è collocato all'interno della vasca di ossidazione biologica a diretto contatto con il refluo. Qui l'acqua reflua costituisce l'influente al bioreattore; una pompa autoadescante realizza una lieve depressione all'interno del modulo di filtrazione che consente la permeazione dell'effluente attraverso la membrana stessa, con conseguente separazione sia di particelle solide che di sostanze ad elevato peso molecolare non processate nella vasca. L'effluente trattato e depurato non richiede, perciò, successivi trattamenti di sedimentazione ed è raccolto come permeato, mentre periodicamente è necessario predisporre lo scarico dei fanghi dalla vasca. Inoltre, il refluo sottoposto a trattamento nel sistema a membrana sommersa può sporcare i moduli di ultrafiltrazione, per i quali è necessario il controllo del *fouling*. Un'azione limitante di tale sporcamiento è affidata all'aria insufflata nel bioreattore come agente ossidante: le bolle che risalgono dal diffusore si muovono in *cross-flow* rispetto alla membrana, rimuovendone i depositi sulla superficie.

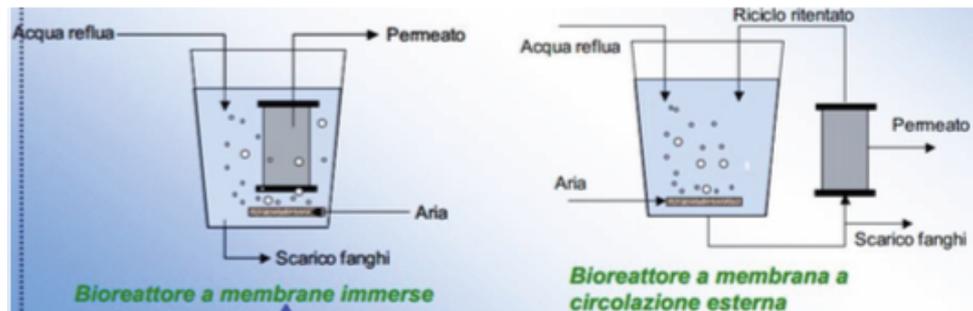


figura 2.1: Configurazione del bioreattore a membrana immersa (sinistra) ed esterna (destra)

Il sistema a destra in figura 2.1 è uno schematizzazione di un bioreattore a membrana a circolazione esterna o *side-stream*; anche in questo caso il processo complessivamente garantisce l'ossidazione biologica dell'acqua reflua e l'ultrafiltrazione a membrana con recupero del permeato, ma l'unità filtrante è posta all'esterno della vasca ossidante. L'effluente dalla vasca di ossidazione (MLSS - *Mixed Liquor Suspended Solids*) è pompato al modulo di filtrazione a membrana, da cui fuoriescono due correnti: la corrente di permeato, che costituisce il prodotto del processo, e quella di retentato, che è re-immessa nella vasca per mantenere la concentrazione del fango costante. Il MLSS di fatto costituisce il refluo, come somma di influente alla vasca e corrente di riciclo del retentato, sottoposto ad ossidazione biologica. Solitamente per il sistema *side-stream* si impiegano membrane tubolari per l'unità filtrante, in cui il controllo del *fouling* è effettuato imponendo un *cross-flow* turbolento sulla superficie della membrana, cioè portate tra 1 e 1,4 m/s (Li et al., 2008).

Nei paragrafi che seguono si considereranno gli aspetti relativi ai trattamenti biologici e quelli pertinenti alle membrane e alla loro applicazione, prima di valutare nel capitolo 3 l'impiego di sistemi MBR nel trattamento di acque reflue contenenti idrocarburi (e metalli pesanti) e procedere con la progettazione dell'impianto.

## 2.2 Trattamenti biologici

I processi di trattamento biologico (o biotattamento) consentono di rimuovere le sostanze organiche disciolte o sospese attraverso la biodegradazione e i solidi sospesi attraverso la separazione fisica. Sono richieste appropriate condizioni nel reattore per consentire ai microrganismi di degradare il materiale organico, generalmente indicato in termini di BOD e COD come misurazioni indirette del livello di carico organico in termini di quantità di ossigeno utilizzato per l'ossidazione di tali composti (Muller et al., 1995). I microrganismi che crescono sul substrato organico di cui si nutrono possono essere aerobici o anaerobici; al termine del processo sono separati dall'acqua, ottenendosi un effluente pulito e chiarificato. La caratteristica più interessante dei processi biologici è l'elevata efficienza di conversione chimica ottenibile: a differenza dei processi di ossidazione chimica, quelli aerobici sono in grado di mineralizzare in maniera quantitativa grandi molecole organiche, a temperatura ambiente e senza la significativa produzione di sottoprodotti. Nel far questo la biomassa "produce" una grande varietà di materiali identificati come sostanze polimeriche extra-cellulari (*Extracellular Polymeric Substances*, EPS), le quali contengono dei componenti che possono contribuire al *fouling* della membrana. Durante il processo dalla degradazione della sostanza organica si ottengono composti semplici come anidride carbonica, acqua, azoto e metano, che rientrano nel ciclo naturale, e nuovi organismi che, insieme ai detriti cellulari e al materiale inerte, costituiscono i fanghi di supero (Judd, 2006). Nei processi biologici l'energia è prodotta nel trasferimento, catalizzato dalla popolazione batterica, di un elettrone da un donatore (sostanza organica) ad un accettore. La quantità di energia dipende dal tipo di accettore di elettroni, secondo il seguente ordine di energia decrescente per i comuni accettori di elettroni:  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  (Marani, 2007). La figura 2.2 mostra nel dettaglio la quantità di energia prodotta per mole di glucosio in ciascuna reazione considerata:

	FREE ENERGY kJ/mol GLUCOSE
<b>Aerobic Oxidation</b> $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \longrightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$	-2,880
<b>Denitrification</b> $5 C_6H_{12}O_6 + 24 NO_3^- + 24 H^+ \longrightarrow 30 CO_2 + 42 H_2O + 12 N_2$	-2,720
<b>Sulfate Reduction</b> $2 C_6H_{12}O_6 + 6 SO_4^{2-} + 9 H^+ \longrightarrow 12 CO_2 + 12 H_2O + 3 H_2S + 3 HS^-$	-492
<b>Methanogenesis</b> $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3 CO_2 + 3 CH_4$	-428
<b>Ethanol Fermentation</b> $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2 CO_2 + 2 CH_3CH_2OH$	-244

figura 2.2: *Quantità di energia prodotta nell'ossidazione biologica di una mole di glucosio*

I diversi microrganismi impiegati per le reazioni di ossidazione biologica sono stati studiati ed impiegati in diversi sistemi (Lee & Welander, 1994; Manz et al., 1994; Cicek et al., 1999; Ghyoot & Verstraete, 2000; Witzig et al., 2002; Sofia et al., 2004); dai dati emersi finora si può ottenere una classificazione basata sulla specifica caratteristica metabolica:

Componente	Processo	Accettore di elettroni	Tipo
<i>carbonio organico</i>	biodegradazione aerobica	O <sub>2</sub>	aerobico
<i>ammoniaca</i>	nitrificazione	O <sub>2</sub>	aerobico
<i>nitrati</i>	denitrificazione	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	facultativo
<i>solfati</i>	riduzione dei solfati	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	anaerobico
<i>carbonio organico</i>	metanogenesi	CO <sub>2</sub>	anaerobico

tabella 2.1: *Tipi di metabolismo microbico nei processi di biotattamento delle acque reflue*

Si può, inoltre, considerare che in base al tipo di substrato utilizzato i batteri possono essere classificati in:

- eterotrofi (carbonio organico): sfruttano il carbonio organico come fonte di energia per sintetizzare nuovo materiale cellulare e sono responsabili della rimozione del BOD e della denitrificazione;
- autotrofi (carbonio inorganico): producono energia tramite reazioni inorganiche e crescono più lentamente degli eterotrofi.

In funzione del tipo di accettore di elettroni i batteri si possono raggruppare in:

- aerobici (ossigeno);
- anossici (nitrito);
- anaerobici (altro).

Oltre al substrato, la popolazione batterica ha bisogno dei nutrienti, elementi essenziali per il proprio metabolismo, come i:

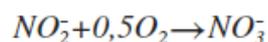
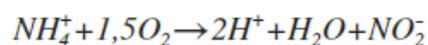
- macronutrienti (N e P);
- altri nutrienti principali (S, K, Mg, Fe, Na, Cl).

L'ossidazione aerobica avviene nel bioreattore mediante l'insufflaggio di aria o ossigeno puro attraverso un diffusore; il sistema di aerazione deve essere adeguato al fine di soddisfare la domanda di ossigeno della biomassa. Il trattamento è usato per rimuovere i composti organici (BOD e COD) e per ossidare nitriti e nitrati. Il parametro di dimensionamento e funzionamento del processo di ossidazione è il carico del fango, valutato come carico di sostanza organica biodegradabile (kg BOD<sub>5</sub>/giorno) sulla massa di solidi sospesi presenti nella vasca di aerazione:

$$F_c = \frac{Q \cdot [BOD_5]}{[SS] \cdot V}$$

*equazione 2.1*

dove  $F_C$  è il fattore di carico del fango [kg BOD<sub>5</sub>/(kg SS\*giorno)];  $Q$  è la portata entrante [m<sup>3</sup>/giorno];  $[BOD_5]$  è la concentrazione di BOD<sub>5</sub> [kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>];  $[SS]$  è la concentrazione di solidi sospesi [kg SS/m<sup>3</sup>];  $V$  è il volume della vasca [m<sup>3</sup>]. La tecnologia MBR, con le fasi di degradazione biochimica e di separazione dei fanghi integrate in un unico reattore, è caratterizzata dalla continua produzione di fanghi biologici, come conseguenza della degradazione dei composti organici presenti nell'influenta e dal decadimento endogeno di parte del fango. La respirazione endogena include tutte le forme di perdita di biomassa e di richiesta non connesse con la crescita, ma legate alla respirazione in condizioni aerobiche: decadimento, mantenimento, lisi, predazione e morte; può essere aerobica o anossica, anche se in condizioni anossiche è notevolmente più lenta. La respirazione endogena della comunità microbica è garantita da età del fango (SRT) elevata, all'aumentare della quale è possibile raggiungere teoricamente una situazione in cui la quantità di energia fornita è uguale a quella richiesta per il mantenimento della comunità (Ricco, 2012). Rispetto ai convenzionali trattamenti di ossidazione biologica, nei MBRs si registra una diversa attività batterica in termini di crescita cellulare e di velocità specifiche di rimozione dei substrati carboniosi e azotati (Saturno et al., 2008). Nei liquami l'azoto è presente come azoto organico e ammoniacale (NH<sub>3</sub>); la parte organica è velocemente idrolizzata ad azoto ammoniacale. L'elevata concentrazione di azoto e fosfati nelle acque superficiali e sotterranee può indurre l'eutrofizzazione di laghi e altri corpi idrici e la crescita incontrollata di specie infestanti da eliminare. Il processo di nitrificazione porta all'ossidazione dell'ammoniacale a nitriti e nitrati con due processi svolti da batteri autotrofi aerobi secondo le seguenti reazioni:



*equazione 2.2*

La seconda reazione è più veloce della prima, per cui nel processo non si ha accumulo di nitriti nel bioreattore. SRT elevate evitano che i batteri nitrificanti siano allontanati dall'ambiente di reazione, migliorando la capacità di nitrificazione dei fanghi attivi. I batteri nitrificanti sfruttano la CO<sub>2</sub> come sorgente di carbonio per la crescita cellulare e, essendo aerobi obbligati, la concentrazione di ossigeno disciolto nei sistemi a crescita sospesa deve essere almeno 1-1,5 mg/ml affinché sia garantita la sopravvivenza. Il processo di denitrificazione ha luogo quando microrganismi facoltativi, che normalmente degradano BOD sotto condizioni aerobiche, sono capaci di convertire i nitrati ad azoto in assenza di ossigeno molecolare. Il contenuto organico delle acque reflue rappresenta la risorsa energetica per la denitrificazione, perciò la zona anossica deve essere configurata in maniera tale da assicurare adeguate risorse di carbonio. Le condizioni anossiche possono essere implementate attuando una pre-denitrificazione in un reattore posto a monte della vasca di ossidazione oppure operando in modalità di aerazione intermittente, anche se per i MBRs sommersi vi è la necessità di aerazione permanente per contenere il *fouling*. La prima opzione è adottata nei MBRs convenzionali, dove i nitrati sono riciclati dalla zona aerobica a quella anaerobica; ciò porta ad una maggiore velocità di denitrificazione dovuta alla materia organica disponibile e non ancora trattata nel serbatoio di ossidazione, ottenendosi un ridotto volume di reazione. Inoltre i nitrati sono capaci di agire come ossidanti, contribuendo così ad una parziale degradazione della materia organica e riducendo di conseguenza la domanda di ossigeno. Nei sistemi con post-denitrificazione il serbatoio anossico è posizionato a valle di quello in condizioni aerobiche; in questo modo la maggior parte della materia organica è rimossa nella zona aerata, per cui si richiede l'aggiunta di una risorsa di carbonio. Nei MBRs ad aerazione intermittente l'ammoniaca è prevalentemente trasformata in nitrati e la maggior parte dei fosfati è rimossa nella fase aerobica, mentre i nitrati accumulati sono convertiti in azoto gassoso nella fase anossica. La rimozione completa del fosforo è garantita dall'allontanamento del fango aerobico al termine dell'aerazione, poiché la biomassa contiene un'elevata concentrazione di polifosfati. Solo una piccola quantità di fosforo (1-2% della massa di *Total Suspended Solids* TSS della miscela liquida) è impiegata per il metabolismo cellulare e la crescita; in parte si può eliminare tramite precipitazione o adsorbimento.

## 2.3 Filtrazione a membrana

### 2.3.1 Le membrane

Una membrana è una barriera selettiva tra due fasi adiacenti, attraverso la quale alcuni componenti possono passare da una fase all'altra, mentre altri sono trattenuti. La figura 2.3 mostra un esempio di schema idraulico nella filtrazione di un soluto con diversa composizione (Pizzichini et al., 2009):

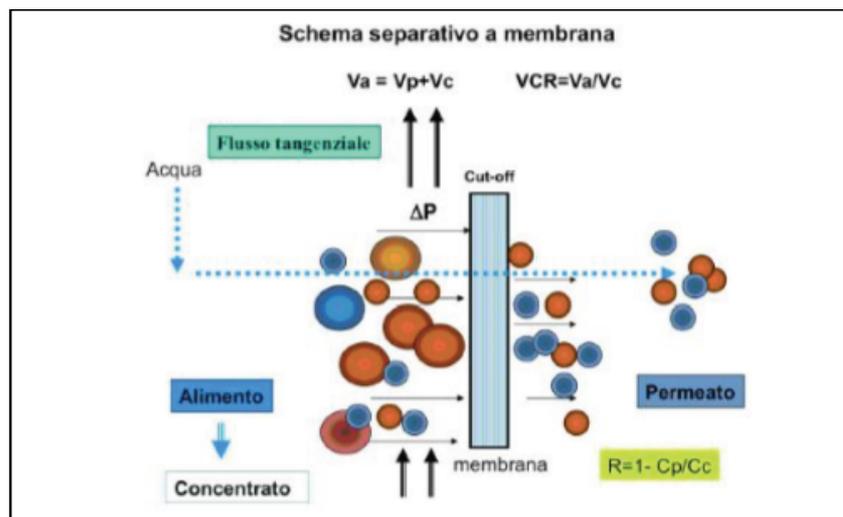


figura 2.3: Schema idraulico rappresentante la fluidodinamica di filtrazione di un soluto con diversa composizione

Il retentato costituisce la parte di materiale trattenuto, mentre il permeato è la frazione di flusso alla quale è consentito l'attraversamento della membrana (Li et al., 2008). Le proprietà chimico-fisiche e meccaniche delle membrane determinano la possibilità di realizzare un processo di separazione attraverso un'unità filtrante; in particolare nelle diverse soluzioni tecnologiche la membrana deve possedere: una buona resistenza meccanica; un'elevata permeabilità in modo da ottenere flussi elevati con superfici ridotte; un adeguato grado di selettività nei confronti delle specie da separare; la capacità di mantenere queste proprietà nel tempo senza deteriorarsi nel normale esercizio e nei cicli di lavaggio.

La performance di una membrana è determinata da diversi parametri, tra i quali la selettività e la permeabilità rappresentano i più importanti. Per quanto riguarda la

selettività si riscontra una diversa definizione in base al materiale su cui si realizza la separazione:

- soluti e particolati in liquidi o gas: la selettività è definita dalla ritenzione, che è la frazione del soluto o del particolato trattenuta rispetto all'alimentazione (*feed*) della membrana;
- miscele di liquidi e gas: la definizione di selettività è basata sul fattore di separazione, come rapporto tra la concentrazione dei componenti chimici nel permeato e quella degli stessi nel fluido alimentato.

Il fattore di separazione  $S$  tra soluto e solvente è espresso come:

$$S = \frac{C_p}{C_f}$$

*equazione 2.3*

in cui  $C_p$  è la concentrazione di soluto nel permeato e  $C_f$  è la concentrazione di soluto nell'alimentazione.

La ritenzione di soluto  $R$ , espressa solitamente in termini di percentuale, è definita dalla seguente relazione:

$$R = 1 - S$$

*equazione 2.4*

in cui  $S$  è il fattore di separazione (Mulder, 1996).

La resistenza complessiva di una membrana è direttamente proporzionale al suo spessore. La permeabilità cresce all'aumentare della densità dei pori, motivo per il quale

si preferisce utilizzare materiali ad elevata porosità; tuttavia la selettività risente di un'ampia distribuzione dell'apertura dei pori. Un compromesso tra le diverse esigenze può ottenersi con una membrana costituita da un sottile strato di materiale (diminuisce la resistenza) con un limitato range della dimensione dei pori (favorisce la selettività) ed un'ampia superficie porosa. La definizione di permeabilità in un processo di ultrafiltrazione si riferisce al solvente che permea la membrana stessa, ottenendosi:

$$L_p = \frac{J}{TMP}$$

equazione 2.5

dove  $J$  è il flusso volumetrico del filtrato, ossia il rapporto tra la portata volumetrica e la superficie della membrana e  $TMP$  è la forza spingente, ossia la pressione di transmembrana.  $L_p$  è spesso riferito alla permeabilità idraulica, quando l'acqua è il solvente e i dati sono normalizzati rispetto alla viscosità del solvente, in modo da potersi affrancare dagli effetti della temperatura (Metha, 2005).

La porosità costituisce un importante parametro, in base al quale le membrane si suddividono in:

- membrane porose: presentano una dimensione dei pori compresa tra 1 nm e 10  $\mu\text{m}$ . A seconda delle dimensioni, i pori delle membrane si possono ulteriormente suddividere in: macropori (aventi dimensioni maggiori di 50 nm), mesopori (con diametro compreso tra 2 e 50 nm), micropori (di dimensioni minori di 2nm). La selettività è determinata dalle dimensioni del soluto rispetto a quelle dei pori. Le membrane porose consentono di ottenere flussi molto elevati.
- membrane dense: i pori raggiungono dimensioni di 1 nm. Il loro campo di applicazione riguarda principalmente il processo di osmosi inversa, consentendo di rimuovere particelle fino a 150-200 Da e trattenendo tutte le specie ioniche; hanno un'elevata selettività, ma flussi ridotti.

Il meccanismo di separazione è diverso per le due tipologie di membrane: quelle porose agiscono come un setaccio, consentendo il passaggio solo alle particelle di dimensioni

inferiori a quella dei pori, e trovano largo impiego per la microfiltrazione (MF), ultrafiltrazione (UF) e nanofiltrazione (NF); quelle dense separano le sostanze in base alla differenza di solubilità e diffusione attraverso lo strato denso della membrana e, perciò, sono utilizzate nell'osmosi inversa.

Un'ulteriore classificazione suddivide le membrane in:

- Membrane neutre: costituite da polimeri sintetici (in prevalenza perfluoropolimeri, poliammidi, polisolfoni e gomme al silicone), da prodotti naturali modificati a base di cellulosa, da mescolanze di membrane inorganiche ceramiche, metalliche e liquide.
- Membrane cariche a scambio ionico: utilizzate nei processi di elettrodialisi per la dissalazione di acque salmastre e per la separazione di componenti ionici in vari fluidi, abbinano all'effetto di setacciatura un meccanismo di separazione dovuto alla mutua carica tra membrana e particella. Questa tipologia include: le membrane a scambio ionico, contenenti gruppi carichi negativamente ( $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{COO}^-$ ) fissati sulla matrice polimerica della membrana, che consente il passaggio ai cationi e lo impedisce agli anioni; le membrane a scambio anionico, caratterizzate da gruppi carichi positivamente (solitamente  $-\text{R}_3\text{N}^+$ ), introdotti nella matrice polimerica idrofobica che consente l'attraversamento ai soli anioni (Cariotti, 2004).

Le proprietà richieste per una data membrana dipendono principalmente da due parametri: 1) la matrice a base polimerica, che conferisce la stabilità termica, chimica e meccanica; 2) i gruppi ionici, che regolano la selettività e le proprietà elettriche della membrana.

La struttura delle membrane può essere:

- isotropa: sono membrane simmetriche, caratterizzate da struttura e composizione uniforme;
- anisotropa: si tratta di membrane asimmetriche, che presentano diverse pellicole di differente struttura e permeabilità assemblate insieme. La loro struttura non uniforme comprende un supporto poroso (*sublayer*) con spessore compreso tra 0,2 e 0,5  $\mu\text{m}$ , al di sopra del quale si trova un denso strato superiore (*skin*) che determina le caratteristiche di flusso della membrana. Sono dette anche membrane di diffusione e

trovano applicazione nell'osmosi inversa e nella pervaporazione; se sono composite, si impiegano nella microfiltrazione e ultrafiltrazione.

### 2.3.2 Applicazioni di membrane sintetiche

Nei processi di separazione a membrana applicati alle acque reflue si realizza la separazione di componenti chimici e fisici sfruttando la permeabilità e selettività dell'unità filtrante (Judd, 2006). In particolare, il grado di selettività di una data membrana dipende dalla dimensione del poro, ottenendosi così quattro tipi di processi: microfiltrazione (MF), ultrafiltrazione (UF), nanofiltrazione (NF) e osmosi inversa (RO), di cui in figura 2.4 si riporta uno schema dei diversi campi di applicazione:

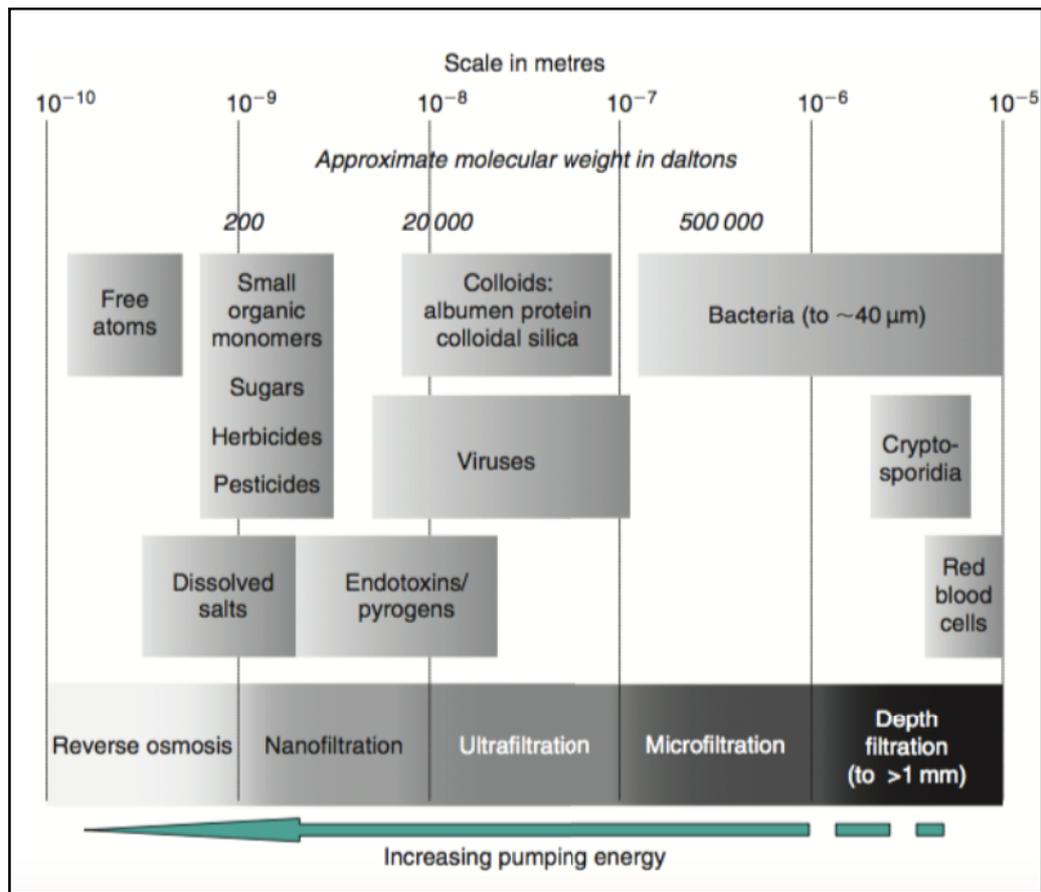


figura 2.4: I diversi processi classificati in base alla dimensione dei pori della membrana (Judd & Jefferson, 2003)

Nel trattamento di acque reflue con membrane dense e porose la forza spingente è generalmente costituita da una differenza di pressione, che “forza” l’acqua a passare

attraverso l'unità filtrante. Tuttavia, in diversi campi la membrana non è impiegata per trattenere i componenti inquinanti e consentire il passaggio all'acqua depurata, ma invece per separare in maniera selettiva alcuni composti (processo estrattivo) o introdurre un componente in forma molecolare (processo diffusivo). Le diverse applicazioni sono raggruppate nella tabella 2.2:

Forza spingente	
<b>Differenza di pressione</b>	<b>Processo estrattivo/diffusivo</b>
Osmosi inversa (RO): separazione determinata da differenze di solubilità e velocità di diffusione del solvente (acqua) e soluti in acqua	Elettrodialisi (ED): separazione causata da differenze di dimensioni degli ioni, dalla carica degli ioni. Si impiegano membrane a scambio ionico
Nanofiltrazione (NF): separazione causata da ritenzione per differenza di carica, solubilità e diffusione, e setacciatura attraverso i micropori	Pervaporazione (PV): stesso meccanismo di RO, ma il soluto (volatile) evapora parzialmente attraverso la membrana, realizzando il vuoto dal lato permeato
Ultrafiltrazione (UF): separazione realizzata dai mesopori	Estrazione a membrana (ME): costituente rimosso da gradiente di concentrazione dai due lati della membrana (retentato e permeato)
Microfiltrazione (MF): separazione dei solidi sospesi dall'acqua attraverso i marcatori	Trasferimento di gas (GT): gas trasferito sotto un gradiente di pressione verso o dall'acqua in forma molecolare

tabella 2.2: *Diversi processi di trattamento di acque reflue con membrane dense e porose (IUPAC, 1985)*

Nel caso delle membrane da ultrafiltrazione la selettività è definita dal *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO), la cui misura è fornita in Da; in questo caso, generalmente, la forza spingente è rappresentata dalla differenza di pressione. Questa è la pressione di trans - membrana (TMP), attraverso la cui imposizione si possono rimuovere particelle aventi ordini di grandezza compreso tra 0,002 e 0,2  $\mu\text{m}$ . Le membrane commerciali più utilizzate per l'operazione di UF sono asimmetriche con uno *skin* spesso 0,1 - 1  $\mu\text{m}$  ed hanno la sottile trama di pori esposta dalla parte dell'alimentazione, che garantisce elevata permeabilità e selettività. Lo *skin* è a sua volta sostenuto da uno strato poroso largo 50 - 250  $\mu\text{m}$ ; le membrane utilizzate sono quelle polimeriche o costituite da materiali ceramici. Come sopra ricordato, la prestazione della membrana è classificata in base al *cut-off* e dalla taglia teorica dei pori, anche se questi valori risultano approssimativi, in quanto le stesse molecole possono avere differente raggio a seconda delle proprietà della soluzione. Inoltre, possono avvenire interazioni chimico-fisiche tra

soluto, solvente e superficie della membrana con conseguente riduzione della permeabilità. In un processo di separazione a membrana le molecole di soluto, trasportate verso il filtro, che non riescono ad attraversarlo, si accumulano sulla superficie e una parte di esse diffonde in verso opposto, in direzione del bulk della soluzione, con un profilo di concentrazione (Pettinato, 2015). Questo aspetto è noto come effetto di *polarizzazione per concentrazione*, dove si osserva la formazione di uno strato gelatinoso sottile nel caso di macromolecole, che forma una “seconda membrana”. Se ciò non avvenisse, un aumento della pressione esercitata porterebbe proporzionalmente ad un flusso maggiore. L’altro fenomeno collaterale è rappresentato dal *fouling*, cioè dall’intasamento derivante da cambiamenti chimici dello strato di gel o dal compattamento di materiale sulla membrana. Per limitare tale problema si possono utilizzare grandi flussi o introdurre sostanze secondarie; in ogni caso la scelta delle condizioni operative che minimizzano la concentrazione di soluto sulla membrana, come si discuterà più avanti, determina l’efficienza del processo (Sengupta & Pittman, 2008). Nei MBRs le membrane polimeriche costituite da PVDF sono largamente impiegate; la loro caratteristica idrofobica le rende suscettibili al *fouling*, al quale parzialmente si ovvia con opportune modifiche della superficie.

### 2.3.3 Configurazioni delle membrane commerciali e geometria dei moduli

Oltre che la natura chimica della miscela polimerica impiegata per la sintesi di membrane da UF per il trattamento di acqua reflue, si tiene conto anche della struttura fisica della configurazione, con l’obiettivo di ricercare l’ottimale configurazione del modulo. Nel campo delle membrane per *modulo* si intende la più piccola unità contenente la membrana, la struttura di supporto del filtro in pressione, le connessioni per l’ingresso e l’uscita dei liquidi e la struttura complessiva di supporto dell’apparecchiatura. Affinché il processo sia efficiente sono richieste le seguenti caratteristiche (Judd, 2006):

- elevata superficie specifica (area della membrana/volume del modulo);
- elevato grado di turbolenza sulla superficie di alimentazione, in modo da favorire il trasferimento di massa;
- basso consumo di energia per unità di volume trattato;

- basso costo specifico (costo per unità di superficie di membrana);
- un *design* che faciliti le operazioni di lavaggio e manutenzione;
- un *design* che agevoli la creazione di moduli, cioè la possibilità di essere facilmente assimilabile e modulare.

Il flusso può attraversare la membrana in due diverse direzioni (figura 2.5):

- ortogonale (*dead-end*): configurazione utilizzata per trattamento di reflui a basso contenuto di solidi sospesi, il flusso di retentato è costituito dal prodotto trattenuto dalla membrana, costituito dal materiale particolato depositato che funge da mezzo filtrante; ciò causa una progressiva diminuzione del flusso e un aumento della resistenza della membrana. Questo strato di materiale è definito come *filter cake*. Non si ha una corrente di retentato ma solo di permeato, per cui il processo è definito “a flusso totale” o “a fondo cieco”.
- tangenziale (*cross-flow*): l'alimentazione scorre tangenzialmente alla membrana ed è forzata ad attraversare il filtro dal gradiente di pressione imposto tra i due comparti del sistema. Si forma una corrente di retentato, nella quale si accumulano le sostanze trattenute dal filtro, ed una di permeato, costituita dal liquido che attraversa la membrana. Questo tipo di flusso è caratterizzato dal fatto che all'aumentare della selettività della membrana corrisponde un incremento della resistenza idraulica.

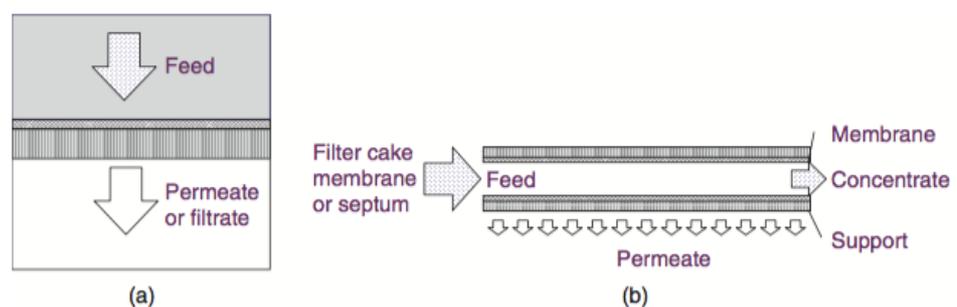


figura 2.5: a) *dead-end filtration*; b) *cross-flow filtration* (Judd, 2006)

La configurazione di una membrana è rappresentata dalla sua geometria e dal modo in cui il modulo (o i moduli) sono orientati rispetto al flusso di acqua. Judd (2006) presenta sei configurazioni principali:

1. moduli piani (*plate-and-frame/flat sheet FS*);
2. modulo a fibre cave (*hollow fibre HF*);
3. moduli tubolari (*multitubular MT*);
4. moduli a spirale avvolta (*spiral-wound SW*);
5. tubo capillare (*capillary tube CT*);
6. filter cartridge (*filter cartridge FC*).

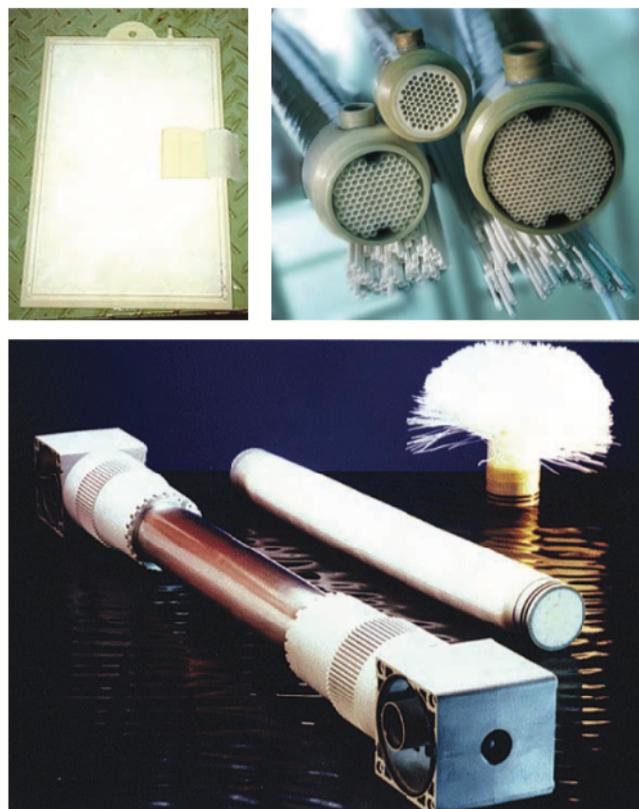


figura 2.6: Membrane commerciali (dall'alto in senso orario): a) FS, b)MT, c) HF

1. Moduli piani (figura 2.6a): la membrana è situata su un supporto piano, con una griglia di drenaggio posta tra i due oggetti al fine di evitare lo schiacciamento del compartimento del permeato. Questi moduli permettono una facile manutenzione grazie alla struttura di supporto, composta da piatti sovrapposti. È il tipo di modulo che per primo fu sviluppato, ma il suo utilizzo è sempre meno frequente a causa

dell'elevato costo di produzione, dovuto al fatto che la produzione richiede notevoli quantità di materiale e inoltre la bassa densità di impaccamento fa aumentare i costi operativi. I moduli piani sono attualmente adoperati per il pretrattamento degli accumuli di materiale organico di flussi e per produrre acqua potabile su piccola scala.

2. Modulo a fibre cave (figura 2.6c): è formato da un fascio di tubicini capillari costituiti da una guaina di supporto ad elevata porosità sulla quale è depositata la membrana. I tubi presentano una struttura asimmetrica e sono inseriti all'interno di un tubo in pressione e tenuti insieme alle estremità da due piastre che fungono anche da connettori. La filtrazione ha luogo grazie alla depressione generata tra l'interno e l'esterno della fibra cava: il permeato filtra attraverso le pareti delle fibre ed è raccolto nella camicia esterna, mentre il concentrato continua a scorrere all'interno delle fibre, uscendo dal modulo dopo la seconda piastra. Queste membrane sono autoportanti e forniscono la maggiore superficie specifica ai costi più bassi. I moduli a fibre cave possono subire cicli periodici di controlavaggi, ottenuti per inversione del flusso.
3. Moduli tubolari (figura 2.6b): uno strato di materiale specifico, che svolge il ruolo di membrana filtrante, è fissato all'interno di un tubo poroso di diametro compreso tra 1 e 2,5 cm, che agisce da struttura portante. Questi tubi sono poi disposti all'interno di un recipiente in acciaio o di materiale plastico che funge da supporto e contenitore. Il flusso è alimentato all'interno dei tubi e lungo il percorso il permeato, che attraversa la membrana, è raccolto all'esterno, mentre il concentrato continua a fluire all'interno dei tubi. Queste unità possono mantenere velocità elevate all'interno dei tubi e sono sfruttate soprattutto per fluidi aventi un contenuto di solidi sospesi notevole. Le membrane tubolari sono molto più semplici da pulire, mediante circolazione di prodotti chimici o meccanicamente, per passaggio di sfere spugnose. Le unità tubolari producono una bassa quantità di permeato in relazione al volume e le membrane sono generalmente costose. Nel caso in cui risulta necessario provvedere spesso alla pulizia meccanica, si utilizzano membrane tubolari aventi diametro interno maggiore.
4. Moduli a spirale avvolta (figura 2.7): in questi moduli un foglio di materiale plastico flessibile è posto tra due fogli di membrana piana per la raccolta del permeato. Le membrane sono poi sigillate su tre lati, mentre il quarto è lasciato

aperto. Il tutto è arrotolato insieme ad una rete flessibile in plastica che ha lo scopo di formare una camera per il passaggio del flusso di alimentazione. Il permeato è raccolto nel cilindro perforato interno. All'esterno la membrana è mantenuta rigida tramite una ricopertura in vetroresina o da una rete rigida. Il termine "spirale" deriva dal percorso eseguito dai flussi di permeato e concentrato: il flusso da trattare è alimentato in pressione da un lato dell'elemento, per effetto della componente radiale della pressione parte del liquido permea attraverso la membrana, mentre il fluido non permeato è spinto verso l'uscita, raccogliendo così le particelle grandi e ripulendo la membrana stessa. Questa tipologia di moduli consente di avere elevati rapporti superficie/volume e buona compattezza, e permette di operare filtrazioni a livello macromolecolare, molecolare e ionico per ottenere concentrazioni, purificazioni e frazionamenti. È una configurazione semplice, di facile realizzazione e garantisce una buona superficie specifica.

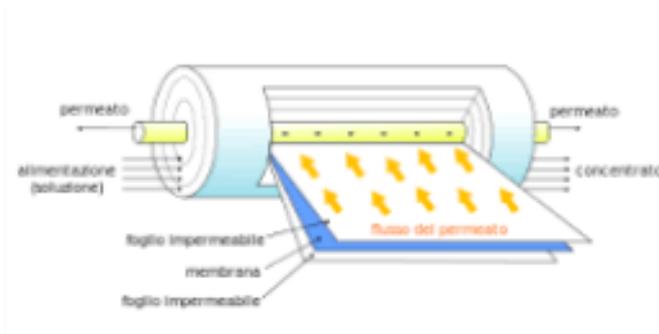


figura 2.7: Modulo a spirale

La tabella 2.3 riassume le caratteristiche tecniche principali delle diverse tecnologie a membrana:

<b>Caratteristica</b>	<b>Tipo di processo</b>			
	<b>microfiltrazione (MF)</b>	<b>ultrafiltrazione (UF)</b>	<b>nanofiltrazione (NF)</b>	<b>osmosi inversa (RO)</b>
<i>pressione di lavoro (bar)</i>	idrostatica 1-4	idrostatica 1-10	idostatica 20-40	idrostatica 15-60
<i>meccanismo</i>	filtrazione fisica	filtrazione, assorbimento	solubilità, diffusione	solubilità, diffusione
<i>cut-off</i>	0,1-20 $\mu\text{m}$	1 - 100 kDa	100 - 250 Da	10 -100 Da 1-10 Å
<i>tipo di membrana</i>	polimerica o ceramica (simmetrica), spessa 10-150 $\mu\text{m}$	polimerica o ceramica (asimmetrica), strato di separazione 0,1-1 $\mu\text{m}$	polimerica (asimmetrica) o composita, strato di separazione 0,1-1 $\mu\text{m}$	polimerica (asimmetrica) o composita, strato di separazione 0,1-1 $\mu\text{m}$
<i>configurazione della membrana</i>	spirale avvolta, fibre cave, tubolare, ceramica, inorganica	spirale avvolta, fibre cave, tubolari	spirale avvolta, tubolare	spirale avvolta, tubolare

tabella 2.3: *Caratteristiche tecniche delle diverse tecnologie a membrane*  
(Pizzichini et al., 2009)

### 2.3.4 Parametri e fattori fondamentali dei processi a membrana

Nei processi di separazione a membrana il trasferimento di materia da una fase all'altra è determinato dall'azione di una forza che agisce sulle molecole di soluto. La grandezza di questa forza è data dal rapporto tra la differenza di potenziale e lo spessore della membrana; nelle diverse applicazioni tecnologiche esempi di forza spingente sono: un gradiente di pressione, un gradiente di concentrazione e una forza elettromotrice. Solitamente nei MBRs la forza spingente è rappresentata da un gradiente di pressione, indicato come pressione di trans-membrana (TMP). L'energia necessaria per il funzionamento dei processi a membrana è fornita da una pompa, che fa muovere il liquido attraverso la membrana e all'interno del modulo. La pressione del retentato è

controllata mediante una valvola, mentre il permeato è generalmente raccolto a pressione atmosferica. A causa della resistenza della membrana si determina una differenza di pressione tra i due letti della membrana, la pressione di trans-membrana appunto, che rappresenta la forza motrice di permeazione. L'espressione per il calcolo della TMP dipende dal tipo di flusso (Mulder, 1996):

- flusso tangenziale:

$$TMP = \frac{1}{2} \cdot (P_A + P_R) - P_P$$

*equazione 2.6*

in cui  $P_A$ ,  $P_R$  e  $P_P$  sono rispettivamente la pressione di alimentazione, di retentato e di permeato. La caduta di pressione totale attraverso il modulo è:

$$\Delta P = P_A - P_R$$

*equazione 2.7*

- flusso ortogonale:

$$TMP = P_A - P_P$$

*equazione 2.8*

Nei MBRs si osserva un aumento della resistenza al trasferimento di materia, causato principalmente dall'accumulo di biomassa e particolato sulla superficie della membrana, e dall'adesione di macromolecole e intasamento dei pori; questi possono dar luogo ad un *fouling* di tipo reversibile o irreversibile (Chang et al., 2002). Lo sporco è reversibile, se può essere rimosso dalla superficie della membrana mediante operazioni di tipo fisico, quali il lavaggio; al contrario la pulizia del filtro può essere realizzata unicamente tramite trattamenti chimici se il *fouling* è irreversibile. I fattori che determinano principalmente il fenomeno del *fouling* nei MBRs, considerato nella sua totalità, sono:

- le caratteristiche della biomassa; la distribuzione della dimensione dei biosolidi e delle sostanze polimeriche extracellulari, aventi un effetto diretto sulla permeabilità della membrana e infine le proprietà di bulk come viscosità e idrofobicità.
- Le caratteristiche del modulo e della membrana: dimensione dei pori, caratteristiche della superficie (polarità, idrofobicità, porosità), geometria e dimensione del modulo (Judd, 2004);
- condizioni operative e metodi di pulizia.

I fattori principali che determinano la resistenza complessiva alle forze di processo sono:

- l'aumento della concentrazione del soluto respinto in prossimità della membrana, che è una conseguenza della selettività. Questo fenomeno è indicato con il termine di polarizzazione per concentrazione (*CP*);
- l'adsorbimento di particelle e soluti sulla superficie della membrana per l'esistenza di forze attrattive;
- la precipitazione di macromolecole poco solubili, con formazione di un *gel layer*, caso molto frequente nell'UF di proteine, o di sali poco solubili (*scaling*) sulla superficie della membrana;
- l'accumulo di materiale solido sulla membrana con formazione di una "torta", come nella MF;
- l'accumulo di microrganismi sulla membrana con conseguente formazione di un biofilm ed intasamento dei pori (*biofouling*).

La diminuzione del flusso è un fattore che condiziona negativamente l'economia di processo; per questo motivo è necessario intervenire in modo da ridurre l'incidenza. Il requisito principale per ottenere un *design* ottimale del processo a membrana è quello di assicurare il massimo flusso di permeato, ottenendo contemporaneamente la massima ritenzione di soluto, con i minimi costi operativi e di esercizio. Tutto ciò si traduce nel desiderare una membrana che mantenga il più possibile nel tempo le sue proprietà. I problemi riguardanti i processi di separazione a membrane e che minano maggiormente il *lifetime* del filtro stesso sono la polarizzazione per concentrazione ed il fouling agente sulla superficie della membrana.

### 2.3.5 Fouling

Con il termine *fouling* si indica in maniera generica l'intasamento della membrana, causato da diversi fattori; tra questi principalmente si considera l'intasamento fisico dei pori e la polarizzazione per concentrazione. L'intasamento dei pori ha ricadute immediate e pesanti sui costi di trattamento e di conseguenza sulla competitività della tecnica adottata rispetto ad altri processi separativi (Pizzichini et al., 2009). Riguardo al fenomeno di polarizzazione per concentrazione, pur essendo teoricamente un processo reversibile, nella pratica si osserva spesso un declino del flusso anche quando viene raggiunto lo stato stazionario. Questa evidenza è il risultato del *fouling* della membrana, ottenuto dalla deposizione (reversibile o irreversibile) di particelle, colloidali, emulsioni, sospensioni, macromolecole e sali all'interno della membrana di un impianto a MBR (Meng et al., 2009). Lo sporco della membrana è frequente nella MF e nell'UF, dove le membrane porose usate sono suscettibili al fenomeno; mentre nei processi con membrane dense il *fouling* è praticamente assente.

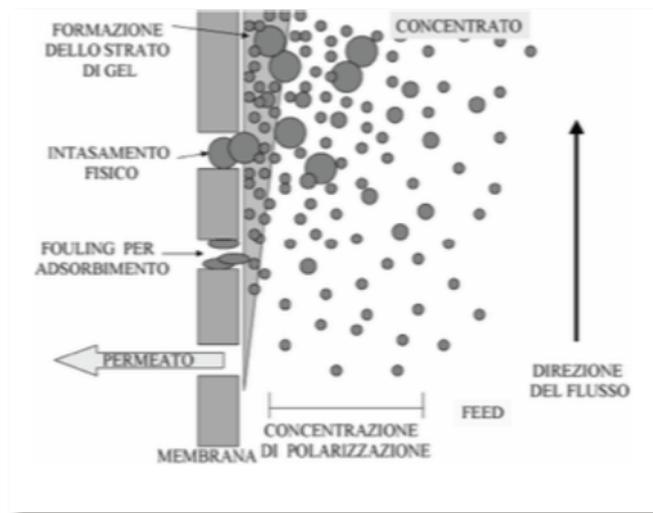


figura 2.8: Schema dei fenomeni di intasamento (Di Franco et al., 2005)

Le cause del fouling possono ricercarsi: nel deposito ed assorbimento di solidi, sostanze colloidali organiche e inorganiche, macromolecole, microrganismi; nella precipitazione di sali disciolti poco solubili (*scaling*); nella formazione di biofilm dovuti a microrganismi (*biofouling*); nei danni alla membrana causati da acidi, basi, pH estremi, cloro libero, batteri, pressioni e temperature elevate. Si è anche stabilito un legame tra questo fenomeno e le proprietà superficiali della membrana, come la dimensione dei pori e la loro distribuzione, la rugosità, la struttura, le proprietà elettrocinetiche e chimiche (membrane idrofobiche/idrofiliche) e la specifica natura chimica (Vrijenhoek et al., 2001). Da un punto di vista operativo il *fouling* provoca una riduzione del flusso ed un aumento della pressione; le membrane richiedono, perciò, frequenti operazioni di pulizia, aumentando così i consumi di energia e riducendo il *lifetime* del filtro. Il lavaggio delle membrane costituisce un passaggio importante anche per il mantenimento della selettività del processo di filtrazione tangenziale. La scelta delle procedure di lavaggio dipende dalla configurazione dei moduli, dalla resistenza chimica e fisica della membrana e dalla natura del *fouling* stesso. Come già affermato, l'intasamento delle membrane è reversibile se dovuto a materiale accumulato sulla superficie della membrana, che può essere rimosso con normali operazioni di lavaggio, eseguite con scadenza periodica. È, invece, irreversibile se le sostanze accumulate causano un blocco dei pori, richiedendo dei trattamenti di pulizia come lavaggi chimici con opportune miscele di prodotti in modo da provare a ripristinare le condizioni iniziali

di permeabilità. Nonostante l'uso di queste tecniche, però, il flusso originario non può essere ristabilito.

Il *fouling* nei MBRs può essere classificato in base al tipo di materiale sporcante, distinguendo quattro categorie del fenomeno (Liao et al., 2004; Pang et al., 2005; Wang et al., 2005; Ramesh et al., 2007; Li et al., 2008):

1. *fouling inorganico* (scaling): è causato dall'accumulo di precipitato inorganico come idrossidi di metallo e “scales” sulla superficie della membrana o all'interno dei pori; si ritrovano perciò elementi come Mg, Al, Fe, Ca e Si soprattutto (Lyko et al., 2007). Il precipitato si forma quando la concentrazione di queste specie chimiche supera la concentrazione di saturazione. Lo *scaling* è la maggiore preoccupazione nei processi di osmosi inversa e nanofiltrazione, dato che le membrane sfruttate rigettano le specie inorganiche. Queste formano un *layer* concentrato nei pressi della membrana dando luogo al fenomeno di *CP*. Per MF e UF il *fouling* inorganico dovuto alla polarizzazione per concentrazione ha un'incidenza minore ma comunque possibile, ed è generato dall'interazione tra ioni e altri materiali sporcanti tramite legame chimico. Sono necessari pretrattamenti, come coagulazione e ossidazione, al fine di evitare l'infiltrazione di idrossidi metallici sulla superficie o nella struttura dei pori. Anche le tecniche di pulizia della membrana, se non operate in maniera adeguata, possono indurre il fenomeno di *scaling*.
2. *Fouling causato da particolato o da materiale colloidale*: a questa categoria di materiale sporcante appartengono alghe, batteri e diverse sostanze organiche naturali. In molti casi lo sporcamento dovuto a queste sostanze risulta reversibile ed eliminabile tramite semplici operazioni di *backwashing* o *air scrubbing*. Le particelle accumulate danno luogo ad una “torta” che riduce il flusso attraverso la membrana. Inizialmente la formazione del *cake* non intacca la produttività in maniera significativa, ma in seguito alla compressione della torta l'efficienza del processo subisce un progressivo declino e l'ostacolo deve essere rimosso. Per controllare questo tipo di *fouling* è consigliata una configurazione del flusso in *cross-flow*.

3. Fouling biologico: è il risultato della formazione di un biofilm sulla superficie della membrana di tipo algale, fungino o batterico che cresce producendo biopolimeri (polisaccaridi, proteine) a causa dell'attività microbica. Ad esempio, quando dei batteri si depositano sulla membrana, questi si moltiplicano e producono sostanze polimeriche extracellulari (EPS) che creano un gel idrato e viscoso. La struttura del gel, inoltre, protegge le cellule batteriche da attacchi da parte di agenti chimici come il cloro, per cui le tecniche di pulizia possono risultare inefficaci. La magnitudine del fenomeno è strettamente legata alle caratteristiche dell'alimentazione.
4. Fouling organico: il NOM (*natural organic matter*) è il maggior responsabile di tale fenomeno, soprattutto in relazione agli agenti sporcanti costituiti da molecole a basso peso molecolare contenenti calcio. Proteine, polisaccaridi e poliossoaromatici contribuiscono in maniera drastica allo sporcamento della membrana, provocando l'intasamento dei pori, soprattutto nelle membrane idrofobiche (Wiesner et al., 1992).

La comprensione del fenomeno del *fouling*, soprattutto se si considera il caso di un MBR piuttosto che di una classica applicazione a membrana, risulta allo stato attuale di difficile comprensione, poiché la biomassa non ha una composizione fissata, ma varia con la composizione del refluo alimentato e le condizioni operative. Tuttavia, per quanto riguarda il *fouling* causato dai solidi si tende a considerare tre diversi meccanismi (Hai & Yamamoto, 2011), così riassunti:

- formazione di una “torta” (*gel/cake*), dovuta all'assorbimento e all'accumulo sulla membrana di materiale solido di dimensioni superiori ai pori; è il risultato del bilancio di forze (*shear stress* sulla superficie della membrane - forza connessa alla filtrazione).
- occlusione di pori (*pore plugging*) da parte del soluto che impedisce così l'attività filtrante;
- restrizione dei pori (*pore narrowing*) dovuta al deposito e assorbimento sulle pareti dei pori di materiale di dimensione inferiore ai pori stessi; la conseguenza di ciò è un aumento del fenomeno di *CP* che a sua volta accresce l'intensità del *fouling*.

È importante distinguere il *fouling* dal *clogging*, fenomeno per il quale si ha l'intasamento dei canali fra le membrane con materiale solido, causato da insufficienti condizioni idrodinamiche. La figura 2.9 schematizza i tre tipi di meccanismi presentati:

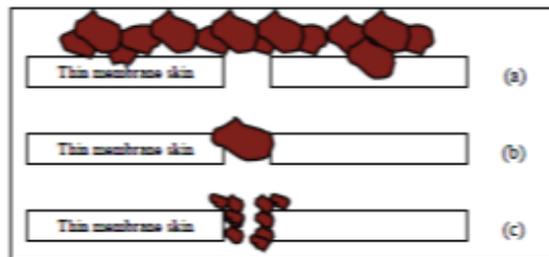


figura 2.9: Meccanismo del fouling causato da a) formazione della "torta"; b) pore plugging; 3) pore narrowing

Zhang et al. (2006) hanno evidenziato che il *fouling* della membrana nei MBRs ha luogo solitamente in tre momenti (figura 2.10): il primo stadio (*stage 1*) è caratterizzato da un iniziale rapido aumento della TMP, mentre il secondo (*stage 2*) è rappresentato da un "debole" aumento della pressione di trans-membrana e tempi lunghi; il terzo *step* presenta un brusco aumento della TMP, noto come "salto di TMP" (*TMP jump*).

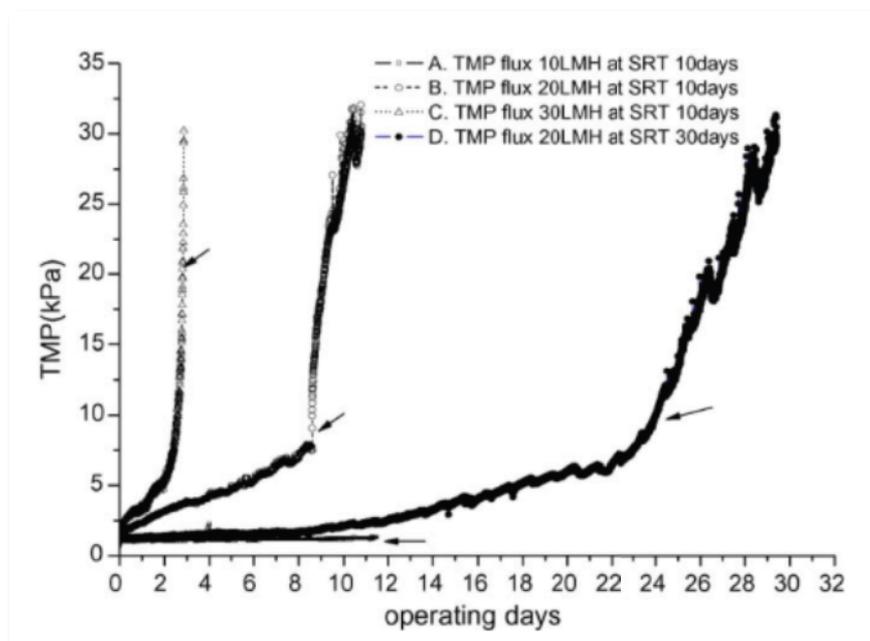


figura 2.10: Andamento della TMP nel tempo, per diversi valori di flusso, in presenza di fouling, in MBR

Nel *design* di un processo a membrana è fondamentale mantenere elevata la produttività, minimizzare il *fouling* e contenere i costi nello stesso tempo. Per contenere lo sporco dell'unità filtrante si può provvedere con il mantenimento di condizioni di velocità "accettabile" attraverso la superficie della membrana; allo stesso tempo si può agire sulla soluzione alimentata mediante un pretrattamento. Questo può comportare variazioni di temperatura o di pH; l'aggiunta di agenti complessanti come l'EDTA; chiarificazione chimica, pre-microfiltrazione. La regolazione del pH è fondamentale quando si opera su proteine: il *fouling* è minimo al valore di pH in corrispondenza del quale la proteina è elettricamente neutra. Come precedentemente discusso, cambiare le proprietà delle membrane (Yu et al., 2005; Bae et al., 2006; Ghosh, 2006), cioè utilizzare membrane dense al posto di quelle porose ad esempio, incide notevolmente sul processo. Nell'ambito delle membrane porose, invece, una distribuzione non molto ampia della dimensione dei pori può ridurre il *fouling*. L'uso di membrane idrofile al posto delle idrofobiche riduce l'intensità del problema, dal momento che su queste ultime le proteine tendono ad assorbirsi maggiormente, ostacolando la rimozione. Il *fouling* diminuisce al decrescere della polarizzazione per concentrazione, come si è analizzato precedentemente; incrementando il coefficiente di trasferimento di materia (con alte velocità del flusso) e utilizzando membrane a flussi minori si può ridurre il fenomeno. Perciò, sfruttando varie tipologie di turbolenza lo sporco risulta inferiore. Sono da considerare anche la natura del refluo alimentato e della biomassa (Choi et al., 2005), la concentrazione e la viscosità del MLSS (Cicek et al., 1999; Chang & Kim, 2005), ma anche la temperatura (Jiang et al., 2005) e la quantità di ossigeno disciolto (DO) (Kang et al., 2003; Kim et al., 2006); le caratteristiche del materiale formato (Cabassud et al., 2004), le sostanze polimeriche cellulari (EPS) (Flemming & Wingerder, 2001; Laspidou & Rittmann, 2002) e i prodotti microbici solubili (SMP) (Wisniewski & Grasmick, 1998; Bouhabila et al., 2001; Lee et al., 2001; Bae & Tak, 2005; Li et al., 2005). Si può considerare l'influenza dei diversi parametri e l'effetto combinato di questi sul *fouling* nei MBRs nella figura seguente (Hai & Yamamoto, 2011):

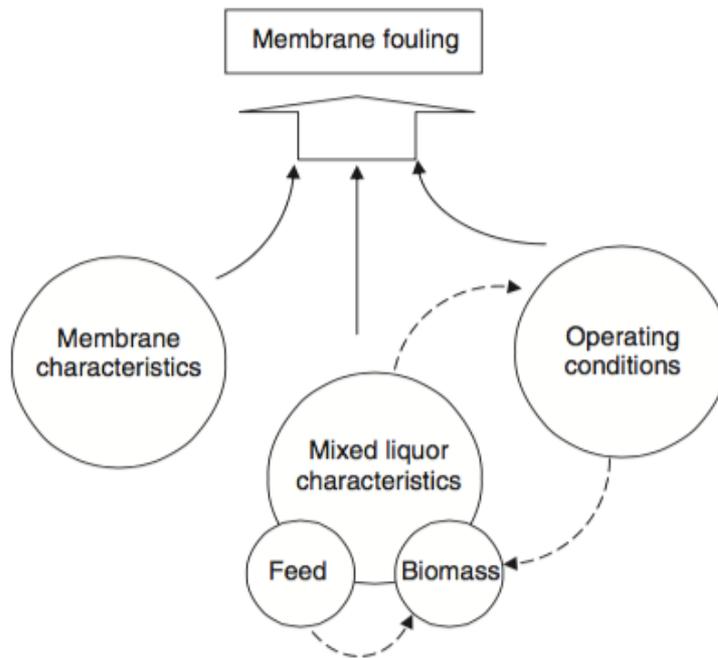


figura 2.11: Parametri e loro effetto combinato sul fouling della membrana

I metodi sopra individuati possono ridurre l'entità del fouling, ma la pulizia della membrana è comunque necessaria (Field et al., 1995; Ognier et al., 2004; Pollice et al., 2005; Bacchin et al., 2006; Guglielmi et al., 2007; Lebegue et al., 2008; Wang et al., 2008). La frequenza dell'operazione dipende anche dall'utilizzo e dalla manutenzione della membrana stessa. Si possono individuare tre metodi, tra i quali la scelta dipende dalla configurazione del modulo, dal tipo di membrana, dalla sua resistenza chimica e dal tipo di agente sporcante:

- pulitura idraulica: include il *back-flushing* o *backwashing* (applicabile solo nei processi di MF e UF), operando con pressioni alternate, depressurizzazione, cambiamento della direzione di flusso con una data frequenza (Bouhabila et al., 2001; Psoch & Schiewer, 2006). Incrementare la velocità del *cross-flow* è il modo più semplice di operare, ma il consumo energetico che ne consegue incide notevolmente sui costi d'esercizio. Le condizioni migliori per attuare il *backwashing* (pressione, frequenza, durata) sono stabilite sperimentalmente nel caso considerato (Jiang et al., 2005; Schoeberl et al., 2005). Il *black-flushing* consiste nell'invertire, dopo un dato

periodo di tempo, la direzione del flusso di permeato al fine di sollevare lo strato di materiale depositato sulla membrana. Ciò può essere fatto arrestando istantaneamente la pompa di alimentazione, inviando aria (Visvanathan et al., 1997; Sun et al., 2004) o filtrato in direzione opposta a quella di permeazione. Una variante del *black-flushing*, detto *back-shock*, prevede un aumento della frequenza con cui il primo è applicato, in modo che la resistenza relativa alla “torta” rimanga bassa e il flusso sufficientemente elevato.

- Pulitura meccanica: può essere applicata unicamente in sistemi tubolari, richiedendo l'utilizzo di sfere spugnose.
- Pulitura chimica: è un metodo fondamentale di pulitura. La valutazione degli agenti chimici e del tempo di trattamento è di fondamentale importanza per non intaccare le proprietà della membrana. I prodotti chimici più utilizzati sono: acidi (forti come l'acido fosforico o deboli come l'acido citrico), basi (NaOH), detergenti (alcalini, non-ionici), enzimi (amilasi, proteasi), agenti complessati (EDTA), disinfettanti (perossido di idrogeno), vapori e gas per sterilizzazione (Le Clech et al., 2006).
- Pulitura elettrica: si applica un campo elettrico attraverso una membrana così da provocare una migrazione delle particelle nella direzione del campo stesso. Questo metodo di rimozione delle particelle può essere applicato anche senza interrompere il processo di filtrazione. Il meccanismo, però, richiede di adoperare membrane costituite da conduttori elettrici ed impone particolari configurazioni dei moduli (Mulder, 1996; Lim & Bai, 2003; Fang & Shi, 2005).

Dopo lunghi periodi di attività dell'impianto la procedura di *backwashing* non consente di ripristinare il flusso in maniera significativa; all'aumentare dei cicli di filtrazione la frazione irreversibile del *fouling* della membrana si amplifica, perciò occorre incrementare la pressione di trans-membrana. Quando si raggiunge il valore massimo della pressione, dettato dalla resistenza meccanica della membrana, si ricorre inevitabilmente al trattamento chimico al fine di restituire un valore adeguato di permeabilità. L'operazione può richiedere diverse ore e intaccare la membrana stessa, per cui l'adozione di questo metodo di pulizia dovrebbe essere adottata solo ai casi in cui è necessaria.

## *Parte II: Il Progetto Res Novae*

### **Capitolo 3: Progettazione di un'installazione di laboratorio con bioreattore a membrana per il trattamento di acque reflue civili e meteoriche**

#### **3.1 Impiego di bioreattori a membrana nel trattamento di acque reflue civili e meteoriche**

La comunità scientifica internazionale è orientata verso soluzioni di riciclo dell'acqua, così come verso il recupero e trattamento di *wastewaters*, per rispondere al crescente fabbisogno di fornitura di acqua in diversi campi (Howell, 2004; Bixio, 2006; Tadkaew et al., 2007). Soprattutto nell'ambito del riutilizzo delle acque di scarico la ricerca è concentrata su nuove, efficaci ed economicamente competitive tecnologie di trattamento (Jefferson et al., 2000; Melin et al., 2006); tra queste i MBRs costituiscono una valida alternativa ai sistemi tradizionali, combinando la filtrazione a membrana e i processi biologici per il trattamento dei reflui, e ottenendo un effluente di elevata qualità (Jimenez & Asano, 2008).

La tecnologia riguardante i bioreattori a membrana si è sviluppata negli scorsi decenni: alla fine degli anni '60 del XX secolo ricerche su scala di laboratorio sono state condotte in condizioni operative caratterizzate da bassi valori di flusso e *lifetime* delle membrane; negli anni '80 e fino a metà degli anni '90 si sono approfonditi diversi aspetti riguardo a tale tecnologia, soprattutto in Giappone, Canada, USA, UK, Francia e Corea del Sud, sviluppando nuovi materiali per la sintesi delle membrane, definendo

diverse configurazioni per i MBRs e valutando in maniera critica il campo operativo. Un più rapido sviluppo tecnologico ha avuto luogo dalla fine degli anni '90 fino ai giorni nostri, contrassegnato dall'approfondimento in materia e dall'installazione di MBRs su scala industriale, anche in Germania, Cina, Singapore, Australia e Medio Oriente. In particolare il mercato europeo a metà degli anni 2000 si presentava così:

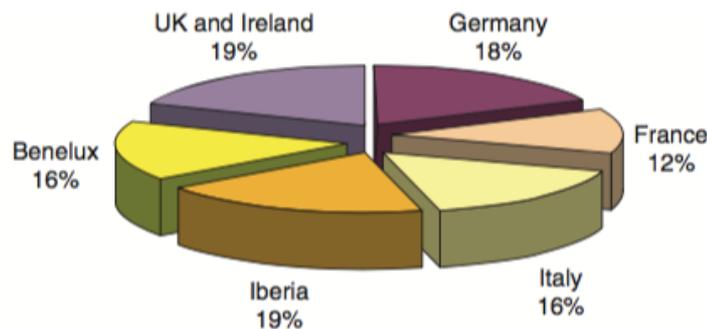


figura 3.1: Mercato europeo dei MBRs (Frost & Sullivan, 2005)

I bioreattori a membrana di prima generazione impiegati nel trattamento delle acque reflue prevedevano un format *side-stream* (membrana esterna); questo sistema può essere applicato per applicazioni su piccola scala e consente di ottenere un miglior controllo sulla capacità di trattamento legata alla filtrazione e al processo biologico separatamente, oltre alla possibilità di progettare indipendentemente il reattore e il serbatoio adibito alla filtrazione; la soluzione a membrana sommersa nel serbatoio in cui ha luogo la bioreazione permette, invece, di trattare più facilmente flussi di reflui su larga scala (Hai & Yamamoto, 2011). Il sistema a membrana sommersa è configurato sia con moduli di membrana piani che a fibre cave o capillari (Brow, 2007). In generale, i MBRs costituiti da moduli a fibre cave rappresentano la soluzione economicamente più vantaggiosa per i processi su scala industriale, raggiungendo buone prestazioni con consumi energetici ridotti in seguito all'ottimizzazione della fase di reazione (Fane et al., 2005; Pearce, 2008); tuttavia questa configurazione necessita di continua manutenzione delle fibre e strumentazione di controllo del processo. Tanti sono i casi e

le applicazioni possibili; la valutazione di ciascuno di questi coinvolge il processo nella sua complessità: la reazione biologica e la separazione mediante filtrazione con membrana.

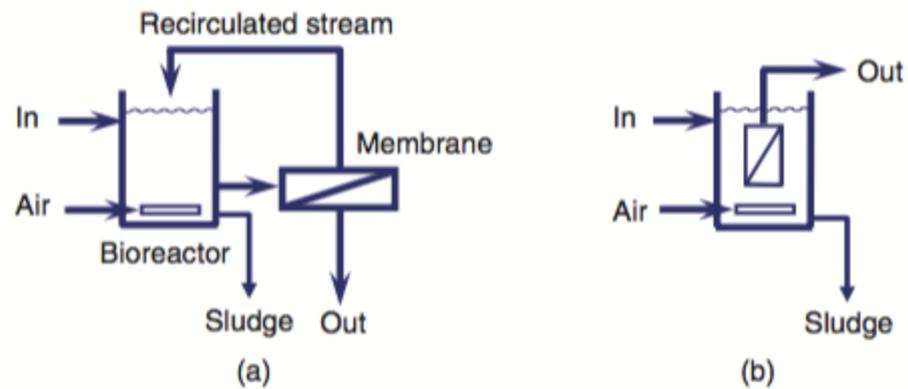


figura 3.2: Configurazioni del bioreattore a membrana: (a) side-stream; (b) sommersa

In questo capitolo si intende progettare un impianto di laboratorio con bioreattore a membrana per il trattamento di acque reflue civili e meteoriche contenenti, oltre agli componenti, anche idrocarburi e metalli pesanti. Questo lavoro rappresenta un contributo ad un progetto più ampio, che si avvale di altre e diversificate collaborazioni; tra queste si considera il lavoro di approfondimento (condotto in sinergia con il presente lavoro) sull'adsorbimento dei metalli pesanti presenti nei reflui civili (Pettinato, 2015). L'impiego dei MBRs nel trattamento delle acque reflue, con particolare attenzione alla presenza di idrocarburi alifatici e aromatici, è stato affrontato in diversi studi: Fatone et al. (2005) hanno mostrato come un processo a cicli alternati consenta di ottenere una buona performance nella rimozione di COD, BOD, N, P, metalli pesanti e microinquinanti organici dalle acque reflue, evidenziando la perfetta capacità di ritenzione esibita dalle membrane di UF verso i metalli pesanti e gli idrocarburi policiclici aromatici (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* PAHs) e la buona qualità dell'effluente dal bioreattore nel rispetto delle normative vigenti.

I PAHs sono gli idrocarburi aromatici con due o più anelli benzenici di origine naturale o antropogenica; sono considerati dei contaminanti a livello ambientale con effetti biologici, tossici e cancerogeni. Sebbene possano essere allontanati da diversi matrici mediante adsorbimento, evaporazione, fotolisi e degradazione chimica, la

biodegradazione rappresenta il processo maggiormente utilizzato. Questa dipende dalle condizioni ambientali, dal numero e dal tipo dei microrganismi e dalla natura e struttura chimica dei composti da degradare. I PAHs sono trasformati mediante bioreazione in metaboliti meno complessi e, attraverso mineralizzazione, in minerali inorganici, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> (processi aerobici) o CH<sub>4</sub> (condizioni anaerobiche); la velocità di degradazione dipende da diversi fattori: pH, temperatura, quantità di ossigeno, popolazione microbica, grado di acclimatazione, accessibilità ai nutrienti, struttura chimica del composto, proprietà del trasporto cellulare. Alcune specie batteriche sono in grado di degradare selettivamente gli idrocarburi aromatici: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp.; così come gli enzimi ossigenasi, deidrogenasi e lignolitici (Haritash & Kaushik, 2009). Le potenzialità di degradazione degli idrocarburi da parte di batteri, lieviti, funghi, alghe ed enzimi sono state investigate negli ultimi decenni (Cerniglia, 1992; Whyte et al., 1998; Alexander, 1999; Gramss et al., 1999; Yakimov et al., 1999; Aislabie et al., 2000; Bej et al., 2000; Aislabie et al., 2001; Baraniecki et al., 2002; Margesin, 2002) e Margesin et al. (2003) hanno approfondito lo studio di diversi ceppi batterici e selezionate tipologie di lievito per valutarne l'azione su catene alifatiche e PAHs. Wiszniowski et al. (2009) hanno valutato le prestazioni di un MBR nel trattamento di acque reflue contaminate da idrocarburi alifatici e aromatici, ottenendo un abbattimento di oltre il 90% del COD e del carbonio organico totale (TOC) e garantendo la completa ossidazione dell'ammoniaca. Simili prestazioni erano state ottenute anche da Scholz & Fuchs (2000) su reflui contenenti sostanze oleose, costituite principalmente da idrocarburi, in un bioreattore a membrana esterna operante in *cross-flow*. Un confronto tra le prestazioni di due tipi di MBRs, uno caratterizzato da filtrazione tangenziale e l'altro ortogonale, per la degradazione di PAHs è mostrato da Mozo et al. (2011): i diversi sistemi filtranti modificano la morfologia dello *sludge*, in particolare nel caso del *cross-flow* lo *shear stress* è elevato e si disperdono importanti quantità di batteri utilizzati insieme con le sostanze disciolte e colloidali. Le colture batteriche di *Exiguobacterium aurantiacum* e *Burkholderia cepacia* sono state impiegate nella biodegradazione di campioni di diesel, costituiti prevalentemente da *n*-alcani, dal momento che sono in grado di utilizzare la frazione C12 - C26 come unica fonte di carbonio ed energia (Mohanty & Mukerji, 2008). La biodegradazione di tre idrocarburi policiclici aromatici (fenantrene, pirene e benzoantracene) è stata investigata

impiegando i batteri *Staphylococcus warneri* e *Bacillus pumilus*: per ogni PAH si ottengono valori di rimozione superiori all'85%, e superano il 90% per processi di durata maggiore (Moscoso et al., 2012).

La performance del processo di trattamento di *wastewaters* contenenti idrocarburi è stata valutata anche nel lavoro di Sichinga et al. (2015): le acque reflue sono state raccolte in una zona residenziale in cui erano presenti diversi garage e sono caratterizzate dalla presenza di contaminanti alifatici e aromatici, la cui rimozione supera il 90%; ciò dimostra come questo processo di trattamento sia efficace per la purificazione di tali acque. Oltre ai diversi parametri come il COD, DO, la torbidità e la misura dei metalli pesanti, si è investigata la cinetica di degradazione degli idrocarburi. Sono stati individuati 16 idrocarburi aromatici policiclici presenti in acque reflue civili (Khadhar et al., 2010; Fatone et al., 2011), oltre ad altri composti volatili organici, e da inviare a processi di depurazione in MBR. Fatone et al. hanno, inoltre, confrontato le prestazioni del processo con bioreattore a membrana con quello convenzionale a fanghi attivi.

L'impiego di MBRs per il trattamento di acque reflue contenenti idrocarburi, oli, grassi e frazioni petrolifere - benzina, diesel e cherosene - è stato valutato al variare di alcune condizioni operative come la temperatura di esercizio, la TMP, la velocità di flusso e il pH; si è considerato l'effetto combinato di questi parametri, individuando delle condizioni operative ottimali per la rimozione del COD e BOD, contenendo il *fouling* (Salahi et al., 2012). La depurazione di acque reflue contaminate da idrocarburi come il gasolio (MTBE, TBA, TBF, benzene, toluene, etil benzene e isomeri dello xilene) e gli additivi (tert-amil-metil-etere, diisopropil etere, tert-amil-alcol, metanolo e acetone) in esso presenti è stata affrontata in un sistema con bioreattore a membrana, valutando anche l'efficienza del processo sulla rimozione di ogni inquinante, valori che si aggirano attorno al 99% (Zein et al., 2006).

### 3.2 Installazione di laboratorio con bioreattore a membrana

La collaborazione a *Res Novae* prevede la progettazione, su scala di laboratorio, di un impianto con bioreattore a membrana per il trattamento di acque reflue civili e meteoriche contenenti idrocarburi e metalli pesanti. Come emerso dagli studi e dalle considerazioni mostrate finora, un processo MBR è caratterizzato dalla complessità dei fenomeni che hanno luogo, la reazione di ossidazione biologica e la separazione mediante membrana da UF, a cui si sommano le criticità e la stagionalità riguardo al refluo da trattare. Tenendo in conto gli aspetti principali fin qui presentati, si procede con il *design* dell'impianto di laboratorio, mostrato in figura 3.3:

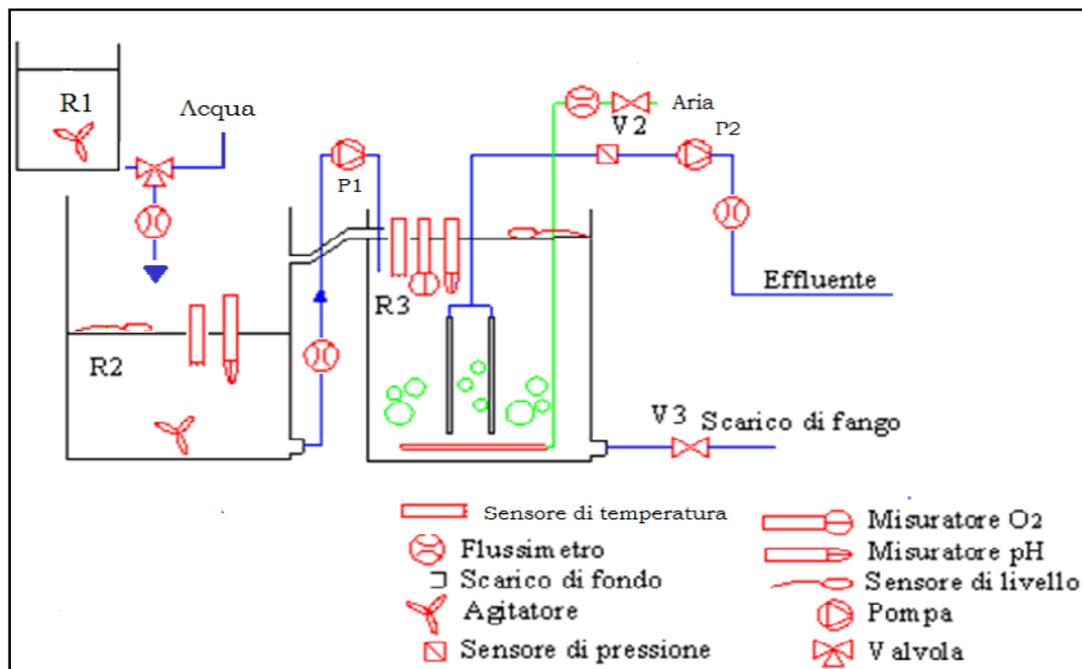


figura 3.3: Schema dell'installazione di laboratorio con bioreattore a membrana sommersa

Con R1 si indica il serbatoio del refluo fresco, simulante o reale, per il quale si predispone la connessione, mediante elettrovalvola, con acqua di rete per diluire la corrente di influente in R2; questo è il tank che funge da vasca per equalizzazione (se aperta) oppure da serbatoio per la pre-denitrificazione (chiuso, in condizioni anaerobiche). La scelta di operare una pre-denitrificazione, piuttosto che una post-denitrificazione, deriva dalla maggiore rimozione dei nitrati che ne scaturisce: il refluo, che non ha ancora attraversato la vasca di ossidazione ha un carico organico elevato ed

è perciò una fonte ricca di nutrimento per i microrganismi facoltativi, come discusso nel capitolo 2. La pompa peristaltica P1 consente di introdurre in R3 l'effluente da R2; R3 è il bioreattore a membrana sommersa. Inizialmente si era considerata anche l'alternativa *side-stream*, ma la soluzione qui adottata consente di attenuare l'effetto del *fouling* grazie al *cross-flow* che le bolle d'aria, insufflate nel diffusore posto all'interno dello stesso tank, esercitano sulla superficie filtrante.

Una pompa da vuoto consente di recuperare il permeato/effluente che sarà raccolto in un apposito serbatoio. Si dispone di scaricare periodicamente i fanghi accumulati in R3. Per la membrana sommersa, posta in R3, si è optato per un modulo a fibre cave in PVDF per UF. In generale, le membrane da UF rispetto a quelle da MF hanno un diametro nominale del poro più piccolo per la rimozione dei batteri, dei pirogeni, virus, colloidali, proteine e macromolecole. Oltre che dal diametro, la capacità di separazione delle differenti specie dipende anche dalla misura e dalla forma del poro della membrana, dalle proprietà chimiche del solvente e dei soluti, dalla struttura esterna del piano di contatto. Il PVDF (polivinilidene fluoruro), insieme con il PES (polieterosulfone), è uno dei materiali polimerici più comuni nell'UF già dalla fine degli anni '90 per la sua straordinaria capacità antiossidante. La stabilità chimica e l'idrofilicità rappresentano, infatti, le due più importanti proprietà dei materiali caratterizzanti le membrane di ultrafiltrazione e microfiltrazione: la stabilità chimica determina la vita effettiva di lavoro sotto le condizioni acido-base, ossidanti e microorganiche, e determina anche il metodo di pulizia. L'idrofilicità determina il grado di assorbimento della membrana e corrispondentemente determina il flusso attraverso la membrana<sup>[9]</sup>.

Il modulo di membrana è stato progettato *ad hoc* per le finalità di questo impianto (figura 3.4) ed è costituito da 8 fibre in PVDF rinforzato, le cui caratteristiche sono riportate nella tabella 3.1.



figura 3.4: *Modulo a fibre cave*

<b>Modulo a membrana</b>	
materiale	polivinildenfluoruro rinforzato
numero fibre	8
diametro esterno delle fibre	1,1 mm
lunghezza fibre	10,3 cm
MWCO	50 kDa
area filtrante	$2,85 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$
diametro interno raccordo	2,67 cm
diametro esterno raccordo	3,16 cm

tabella 3.1: *Caratteristiche del modulo a membrana*

Il modulo a membrana è stato costruito sistemando le fibre cave in PVDF rinforzato in un raccordo filettato in plastica e bloccate con un fissante epossidico. Per quanto riguarda le fibre, anche l'estremità inferiore di ciascuna di esse è stata occlusa con una colla epossidica, permettendo così l'ingresso del fluido unicamente attraverso la

superficie filtrante; il permeato è poi convogliato attraverso il connettore in plastica nel tubo che termina nel serbatoio di raccolta (figura 3.5). L'attivazione della membrana consiste nella rimozione del glicerolo protettivo, ponendola nell'impianto con sola acqua distillata in condizioni di *airflushing* con flusso nel verso opposto rispetto a quello che caratterizzerà il processo.

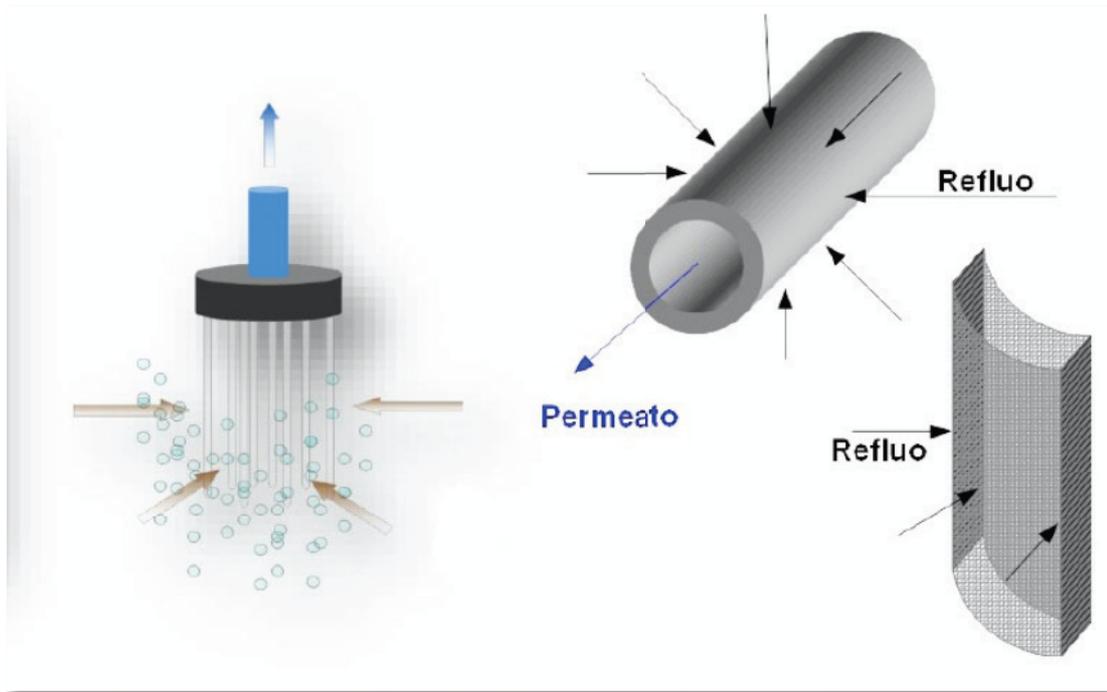


figura 3.5: Schema del flusso di refluo e permeato attraverso le fibre cave del modulo

Nell'installazione di figura 3.3 sono state predisposte apparecchiature e strumentazioni ausiliari: sistemi di agitazione in R1 e R2 (in R3 l'aria insufflata mantiene la miscela agitata); misuratori di livello, pH e temperatura in R2 e R3; misuratore di O<sub>2</sub> disciolto in R3; sensore di pressione sulla linea del permeato, elettrovalvole, flussimetri (ad ultrasuoni, con ampio range nella valore delle portate, 0,1 -20 L/min) e pompe in diversi punti dell'impianto. Per garantire e monitorare l'efficienza del processo gli strumenti di misura sono collegati ad un sistema di acquisizione e controllo, come mostrato nella figura 3.6:

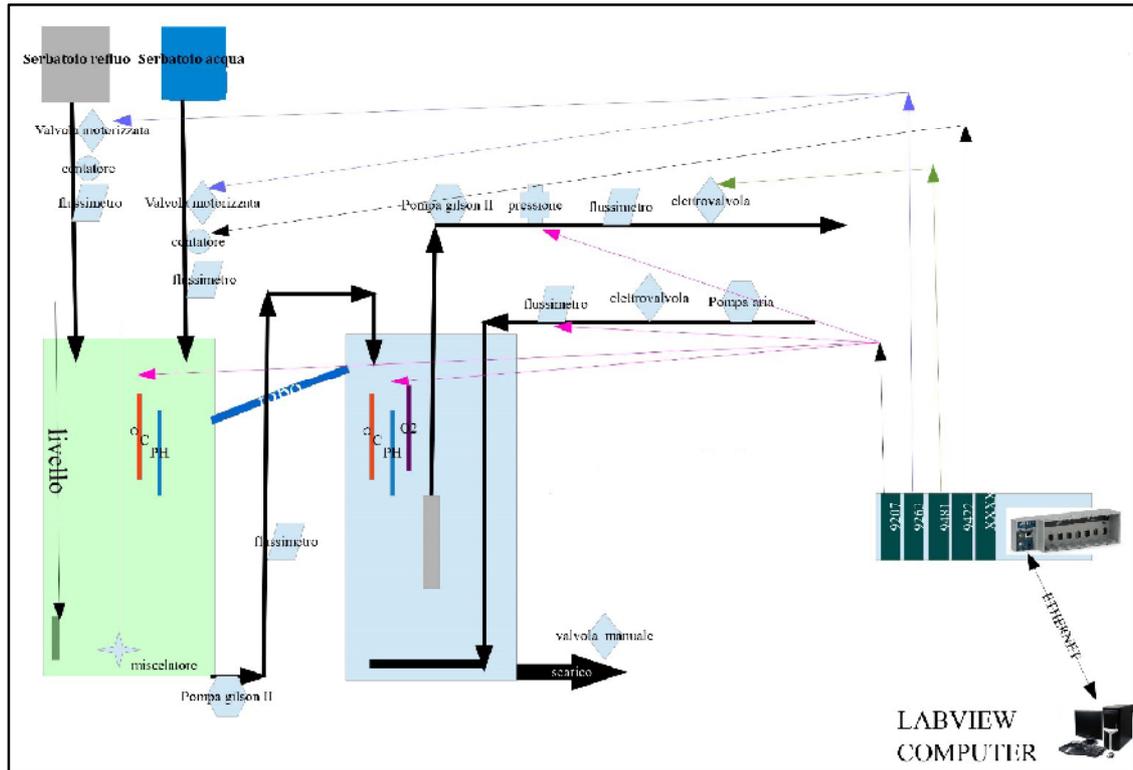


figura 3.6: Layout dell'installazione di laboratorio adibita alla depurazione delle acque reflue con sistema di controllo

Attraverso il software è possibile non solo acquisire e monitorare i dati, ma anche fissare alcuni parametri di funzionamento nel corso del processo. Nell'installazione delle figure 3.3 e 3.6 si potrà considerare anche la possibilità di riciclare parte della miscela di R3 in R2; tale soluzione sarà valutata nella messa in opera del processo.

Come sopra affermato, l'impianto di laboratorio descritto è progettato per la depurazione di acque reflue civili e meteoriche contenenti anche idrocarburi e metalli pesanti; soprattutto nel caso dei reflui reali si valuta la possibilità di diluirli con acqua di rete. Si intende lavorare prima con un refluo sintetico e successivamente con quello reale. La pioggia, e quindi le acque meteoriche raccolte, ha una composizione diversa dall'acqua distillata: le acque piovane possono contenere sostanze chimiche derivanti da eruzioni vulcaniche, emissioni di gas, sublimazioni dalla crosta terrestre, polveri, e può presentare, perciò, svariate sostanze e ioni, tra cui calcio, magnesio, potassio, sodio, bicarbonato, cloro, solfati, composto azotati, fosfati, cadmio, rame, ferro, piombo,

nickel e zinco<sup>[10]</sup>. Pur tenendo conto di questo aspetto, il refluo sintetico, che simula un campione di acque di scarico civili e meteoriche, sarà preparato con dei componenti di base (in acqua distillata), ai quali si aggiungeranno alcune quantità di frazioni idrocarburiche (da 0,05 a 0,2 %v/v) e/o alcuni metalli pesanti.

La complessità del refluo reale e le prestazioni del processo di trattamento saranno considerati solo successivamente.

#### Componenti base del refluo sintetico:

- $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$
- $\text{NH}_4\text{Cl}$
- $\text{H}_2\text{KPO}_4$
- $\text{CaCl}_2$
- $\text{HMgPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- amido di mais
- peptone
- D-glucosio

#### Idrocarburi:

- miscela di alcani a catena lineare  $>\text{C}_5$
- benzina, diesel, gasolio

#### Metalli pesanti:

- $\text{ZnCl}_2$ , come fonte di ioni  $\text{Zn}^{2+}$
- $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , come fonte di  $\text{Al}^{3+}$
- $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , come fonte di ioni  $\text{Fe}^{2+}$

La composizione del refluo così preparato e i diversi componenti dovranno presentare valori di COD nel range 250 - 800 mg/L, come da valori tipici di acque di scarico urbane. Per la reazione di ossidazione biologica come microrganismi si impiegano dei lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*), in particolare negli studi preliminari si è utilizzato del comune lievito di birra. Questi microrganismi sono anaerobi facoltativi, potendo

essere impiegati sia in processi aerobici che anaerobici; sono tolleranti rispetto agli idrocarburi, soprattutto nei confronti degli alcani (Chavan & Mukherji, 2008).

Come anticipato precedentemente, la parte II di questo lavoro, incentrato sulla progettazione dell'installazione di laboratorio, si avvale di alcuni significativi contributi riportati nel dettaglio in un lavoro di Tesi Magistrale (Pettinato, 2015), nel quale si esaminano le prestazioni del modulo di membrana, così costruito, in un MBR a membrana sommersa con la composizione del refluo appena indicata, approfondendo lo studio della rimozione dei metalli pesanti (Zn, Al e Fe) mediante adsorbimento su gusci d'uova di gallina, essiccati e macinati in diversa granulometria. Inoltre, si è effettuata nelle diverse condizioni proposte un'analisi del *fouling* causato dal materiale adsorbente: la concentrazione di sorbente pari all'1% in peso, per tutte le granulometrie indagate, costituisce un buon compromesso tra la necessità di minimizzare l'effetto negativo sulla membrana e la necessità di garantire una superficie sufficiente perché si verifichi l'assorbimento. Per quanto riguarda la dimensione delle particelle i dati sperimentali hanno mostrato un eccessivo sporcoamento se si utilizzano particelle con diametro compreso tra 0 e 400  $\mu\text{m}$ , invece che con valori superiori a questo e fino a 1000  $\mu\text{m}$ . Quindi, per valori di diametro compresi tra 500 e 1000  $\mu\text{m}$  si è evidenziato come all'aumentare del diametro di setacciatura corrisponde una netta diminuzione della superficie adsorbente, ma non si osservano invece particolari differenze nell'impatto sul *fouling*. Dalle diverse prove sperimentali nel lavoro di tesi sopra citato si evince che, in relazione al refluo sintetico con composizione e tipi di metalli individuati, il sorbente con dimensioni pari a 500 - 710  $\mu\text{m}$  e in concentrazione pari all'1% in peso, mostra una maggiore selettività nei confronti dell'alluminio, piuttosto che del ferro e dello zinco.

Inoltre, altre prove preliminari su campioni di refluo sintetico senza metalli pesanti sono state condotte su scala di laboratorio per dimensionare le varie apparecchiature, sistemare e calibrare la strumentazione accessoria, verificare in prima analisi la fattibilità del processo, ottenendosi l'installazione di figura 3.7:



figura 3.7: *Installazione di laboratorio con MBR per il trattamento di acque reflue civili e meteoriche*

Procedendo da destra verso sinistra si predispone un serbatoio per il refluo, dal quale per gravità si alimenta il tank per la pre-denitrificazione (che si provvede a chiudere), posto su una piastra riscaldante e agitante, per mantenere la temperatura della miscela costante; la capacità di questo serbatoio - che corrisponde a R2 dell'installazione di figura 3.3 - è di 2 litri, mentre per R1 è 1 litro. Si è, inoltre, verificata la possibilità di agitare la soluzione con un magnetino; tale soluzione si rende necessaria per ottenere una corrente di influente al bioreattore con caratteristiche omogenee; una velocità di agitazione maggiore di 2000 rpm consente alle sostanze oleose e agli idrocarburi di distribuirsi uniformemente nella fase acquosa. Una pompa peristaltica Masterflex con capacità di portate comprese tra 0,001 e 3400 ml/min, dotata di testa Easy Load 2 e tubi L/S 14 (sostituibili all'occorrenza da tubi L/S 25) consente di movimentare il fluido da R2 a R3, in cui è alloggiato il modulo di membrana. Una beuta codata con annessa pompa da vuoto, provvista di sistema per trattenere vapori e gas inquinanti, garantisce il

vuoto per recuperare la corrente di permeato, raccolto e pesato in un'altra beuta. In figura 3.7 non è visibile la pompa connessa al diffusore per l'insufflaggio dell'aria nel bioreattore; questa garantisce una condizione di flusso costante pari a 6 NI/min. Il bioreattore è costituito da un sistema incamiciato, per poter eventualmente garantire condizioni di temperatura costanti. In particolare, la condizione di temperatura ottimale per i microrganismi considerati è di 25 - 30°C, mentre per il pH si considera il range 3,5 - 4,5. Come precedentemente indicato, termocoppie e altri strumenti di misura sono collocati in diversi punti dell'impianto, per valutarne il funzionamento. Per le prestazioni del processo si predispongono prelievi periodici sul refluo da trattare e sul permeato raccolto, in modo da caratterizzarli, oltre che per la torbidità e il colore, in termini di:

- COD
- azoto totale
- nitriti
- nitrati
- azoto ammoniacale
- idrocarburi totali (TPH)

attraverso dei kit di misura Nanocolor, basati su delle procedure standardizzate.

Per l'analisi quantitativa e qualitativa delle frazioni idrocarburiche presenti nel refluo e residue nel permeato si fa riferimento al metodo rigoroso (americano) EPA 525.2; tale procedura consente la misurazione dei composti organici, con particolare riferimento agli idrocarburi alifatici  $C > 5$  e aromatici, in acqua attraverso due *steps*: estrazione dei TPH in fase solida (*Solid Phase Extraction* SPE) e successiva analisi in gas cromatografo GC-MS. Nell'impianto considerato, precedentemente all'estrazione, si intende concentrare in evaporatore rotante il campione di refluo o permeato, dal momento che le *wastewaters* simulanti considerate sono piuttosto diluite, e successivamente per l'estrazione SPE si dispone di un sistema MANIFOLD (figura 3.8) e di cartucce in grado di trattenere selettivamente gli idrocarburi. La loro eluizione è effettuata con solventi organici come il n-pentano oppure il cicloesano, l'isoottano, l'eptano, l'ottano, il decano, se questi non sono presenti nel refluo esaminato. L'impiego di tale metodo è comprovato dalle applicazioni in altri lavori (Filipkowska et al., 2005; Rodil et al., 2007; Bianchin et al., 2012; Song et al., 2012; Menezes et al., 2013).

In questo modo si potranno valutare le prestazioni dell'impianto così realizzato con

riferimento all'abbattimento del COD, ma anche alla rimozione degli idrocarburi in diversi rapporti F/M (*feed/microorganisms*) e allo studio del fenomeno del *fouling* nelle condizioni implementate.



figura 3.8: Sistema MANIFOLD per la rimozione di composti organici in acqua

Nell'ambito del progetto *Res Novae*, dai risultati emersi nel *design* dell'impianto di laboratorio qui mostrato, si è giunti alla realizzazione di un sistema costituito da diverse unità; la sua natura modulare lo rende adattabile ad altre situazioni e scopi. Ad esempio, come valutato nel già citato lavoro di tesi relativo all'adsorbimento dei metalli pesanti sul materiale *low cost*, rappresentato dai gusci d'uova di gallina, l'installazione di figura 3.3 si può avvalere di un ulteriore *step* di pretrattamento, come indicato in figura 3.9:

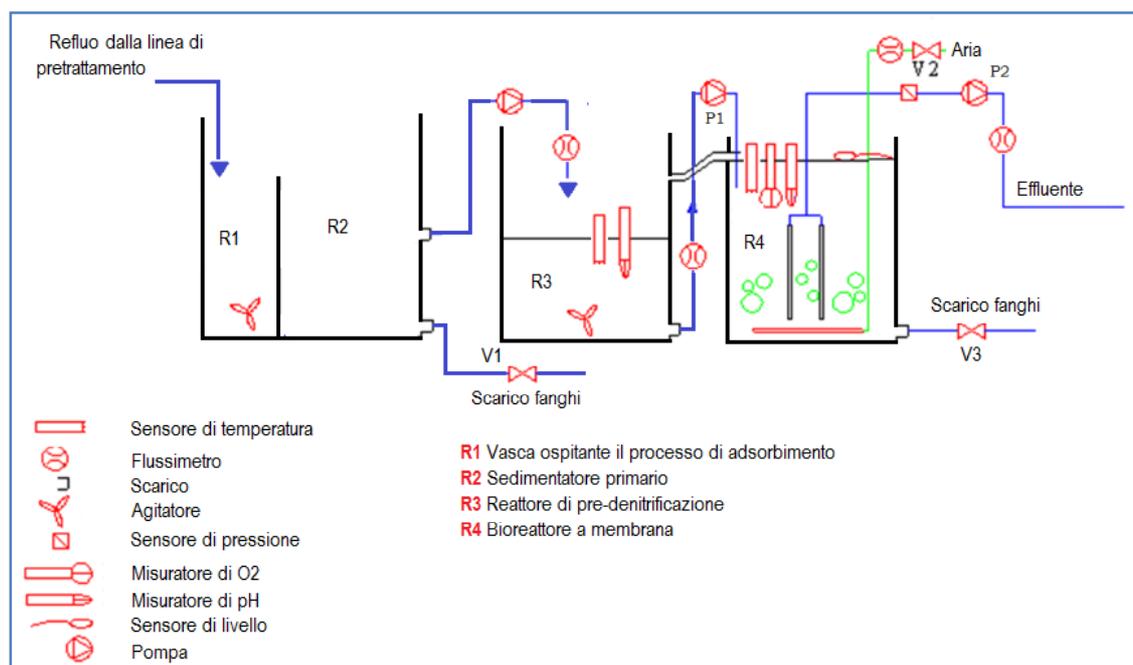


figura 3.9: Schema dell'impianto di laboratorio integrato con l'unità di adsorbimento dei

*metalli pesanti*

L'impianto di laboratorio integrato presenta un'altra unità a monte del processo già considerato: qui con R1 si indica la vasca in cui ha luogo il processo di adorbimento dei componenti metallici (presenti nel refluo proveniente dalla linea di pretrattamento) sui gusci d'uova; R2 è il sedimentatore primario nel quale sono trattenuti i gusci d'uovo e i solidi sospesi; da questa unità si prevede di scaricare periodicamente i fanghi. L'effluente da R2 è inviato alla vasca R3 e, da questo punto in poi, processato come descritto in figura 3.3. In questo sistema si predispose anche l'implementazione di cicli di pulizia delle membrane mediante un sistema temporizzato, alternando *airflushing* e rilassamento della membrana. Per la pulizia chimica, invece, si considererà un altro sistema, in cui il modulo a membrana sarà trattato con una soluzione di acqua distillata e Ultraclean acido (3% v/v) in *blackflushing* per un'ora; a questo trattamento acido ne seguirà uno con sola acqua distillata per ripristinare le condizioni di pH.

Lo studio svolto e le informazioni raccolte finora hanno consentito la progettazione e la realizzazione di un'installazione di laboratorio; tuttavia in seguito all'avvio e al funzionamento a regime di tutto il sistema se ne potranno valutare ed eventualmente migliorare le prestazioni, intervenendo sui punti critici.

## Bibliografia e sitografia

### Parte II

1. Aislabie et al. (2000), *Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott base, Antarctica*. Polar Biol. 23, 183-188.
2. Aislabie et al. (2001), *Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils*, Polar Biol., 24, 308-313.
3. Alexander (1999), *Biodegradation and bioremediation*, 2nd edn, Academic, London.
4. Bacchin et al. (2006), *Critical and sustainable fluxes: theory, experiments and applications*, Journal of Membrane Science, 281, 42-69.
5. Bae et al. (2006), *Preparation and characterization of fouling-resistant TiO<sub>2</sub> self-assembled nano composite membranes*, Journal of Membrane Science, 275 (1-2), 1-5.
6. Bae & Tak (2005), *Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor*, Journal of Membrane Science, 264 (1-2), 151-160.
7. Ball et al. (1998), *An assessment of availability of pollutant constituents on road surface*, The Science of the Total Environment, 209, 243-254.
8. Bannerman (1999), *Forests at the wild land urban interface: conservation and management*, [www.epa.gov](http://www.epa.gov).
9. Baranjecki et al. (2002), *Characterization of Sphingomonas sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil.*, Microb. Ecol., 43, 44-54.
10. Bej et al. (2000), *Cold-tolerant alkane-degrading Rhodococcus species from Antarctica*, Polar Biol., 23, 100-105.
11. Bianchin et al. (2012), *Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas-chromatography-mass spectrometry procedure*, Journal of Chromatography A, 1233, 22-29.
12. Bixio et al. (2006), *Wastewater Quality Monitoring and Treatment*, John Wiley & Sons.

13. Bouhabila et al. (2001), *Fouling characterisation in membrane bioreactors*, Separation and Purification Technology, 22-23, 123-132.
14. Brow (2007), *MBR WwTW: Cost and challenges of compliance with stringent standards*, Proceedings of the 4th International Water Association Conference on Membranes for Water and Wastewater Treatment, IWA Publishing.
15. Cabassud et al. (2004), *Characterization of sludge structure and activity in submerged membrane bioreactor*, Water Science and Technology, 52 (10-11), 401-408.
16. Cariotti (2004), *Le membrane semipermeabili artificiali: acqua ed energia dai processi osmotici*, Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, va.a. 2003/2004.
17. Cerniglia (1992), *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon*, Biodegradation, 3, 351-368.
18. Chang et al. (2002), *Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment*, J. Environ. Eng. 128 (11), 1018-1029.
19. Chang & Kim (2005), *Wastewater treatment using membrane filtration-effect of biosolids concentration on cake resistance*, Process Biochemistry, 40 (3-4), 1307-1314.
20. Chavan & Mukherji (2008), *Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: effect of N/P ratio*, Journal of Hazardous Materials, 154, 63-72.
21. Choi et al. (2005), *Novel hybrid immobilization of microorganisms and its application to biological denitrification*, Enzyme and Microbial Technology, 37 (6), 567-573.
22. Cicek et al. (1999), *Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated-sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular-waste compounds*, Water Environment Research, 71 (1), 64-70.
23. Di Franco et al. (2005), *Nuove tecnologie a membrana nei processi di disinquinazione della carta da macero*, ENEA.
24. Fane et al. (2005), *Low pressure membrane processes - doing more with less energy*, Desalination 185, 1585-1591.
25. Fang & Shi (2005), *Pore fouling of microfiltration membranes by activated sludge*, Journal of Membrane Science, 264, 161-166.
26. Fatone et al. (2005), *Removal of nutrients and micropollutants treating low loaded wastewaters in a membrane bioreactor operating the automatic alternate-cycles process*, Desalination, 183, 395-405.

27. Fatone et al. (2011), *Fate of aromatic hydrocarbon in Italian municipal wastewater systems: an overview of wastewater treatment using conventional activated-sludge processes (CASPs) and membrane bioreactors (MBRs)*, Water Research, 45, 93-104.
28. Field et al. (1995), *Critical flux concept for microfiltration fouling*, Journal of Membrane Science, 100, 259-272.
29. Filipkowska et al. (2005), *Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment*, Analytica Chimica Acta, 547, 243-254.
30. Flemming & Wingerder (2001), *Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid Pseudomonas aeruginosa*, Water Science and Technology, 43 (6), 49-57.
31. Frost & Sullivan (2005), *European report: introduction and executive summary*, Report August 2005.
32. Ghosh (2006), *Enhancement of membrane permeability by gas-sparging in submerged hollow fibre ultrafiltration of macromolecular solutions: role of module design*, Journal of Membrane Science, 274 (1-2), 73-82.
33. Ghyoot & Verstraete (2000), *Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor*, Water Research, 34 (1), 205-215.
34. Gramss et al. (1999), *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils*, Biodegradation, 10, 51-62.
35. Guglielmi et al. (2007), *Subcritical fouling in a membrane bioreactor for municipal wastewater treatment: Experimental investigation and mathematical modelling*, Water Research, 41, 3903-3914.
36. Hai & Yamamoto (2011), *Membrane Biological Reactors*, Water Science, Elsevier, 571-613.
37. Haritash & Kaushik (2009), *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, Journal of Hazardous Materials, 169, 1-15.
38. Howell et al. (2004), *Evapotranspiration of full, deficit-irrigated and dryland cotton on the Northern Texas High Plains*, J. Irrig. Drain. Eng. 130 (4), 277-285.
39. IUPAC (1985), *Reporting physisorption data*, Pure Appl. Chem., 57, 603.
40. Jefferson et al. (2000), *Technologies for domestic wastewater recycling*, Urban Water, vol. 1 (4), 285-292.

41. Jiang et al. (2005), *Optimising the operation of a MBR pilot plant by quantitative analysis of the membrane fouling mechanism*, Water Science & Technology, 51 (6-7), 19-25.
42. Jimenez & Asano (2008), *Water reuse: an international survey of current practice, issues and needs*, IWA Publishing, London.
43. Judd (2004), *A review of fouling of membrane bioreactors in sewage treatment*, Water Sci. Techno. 49 (2), 229-235.
44. Judd (2006), *The MBR book*, Elsevier.
45. Judd & Jefferson (2003), *Membranes for industrial wastewater recovery and re-use*, Elsevier, Oxford.
46. Kang et al. (2003), *Removal of residual organic matter from secondary effluent by iron oxides adsorption*, Desalination, 154 (2), 139-146.
47. Khadhar et al. (2010), *Distribution of 16 EPA-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sludges collected from nine Tunisian wastewater treatment plants*, Journal of Hazardous Materials, 183, 98-102.
48. Kim et al. (2006), *Prediction of permeate flux decline in crossflow membrane filtration of colloidal suspension: a radial basis function neural network approach*, Desalination, 192 (1-3), 415-428.
49. Laspidou & Rittmann (2002), *A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass*, Water Research, 36 (11), 2711-2720.
50. Le Clech et al. (2006), *Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment*, Journal of Membrane Science, 284, 17-53.
51. Lebegue et al. (2008), *Membrane bioreactor: Distribution of critical flux throughout an immersed HF bundle*, Desalination, 231, 245-252.
52. Lee et al. (2001), *Cleaning strategies for flux recovery of an ultrafiltration membrane fouled by natural organic matter*, Water Research, 35 (14), 3301-3308.
53. Lee & Welander (1994), *Reducing sludge production in aerobic wastewater treatment through manipulation of the ecosystem*, Water Research, 30, 1781-1790.
54. Li et al. (2005), *Membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR): sludge cake formation and fouling characteristics*, Biotechnology and Bioengineering.
55. Li et al. (2008), *Advanced Membrane Technology and Application*, WILEY.
56. Liao et al. (2004), *A review of biofouling and its control in membrane separation bioreactors*, Water Environment research, 76 (12), 425-436.

57. Lim & Bai (2003), *Membrane fouling and cleaning in microfiltration of activated sludge wastewater*, Journal of Membrane Science, 216, 279-290.
58. Lyko et al. (2007), *Long-term monitoring of a full-scale municipal membrane bioreactor characterization of foulants and operational performance*, Journal of Membrane Science, 317 (1-2), 78-87.
59. Manz et al., (1994), *In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants*, Wat. Res., 28, 1715-1723.
60. Marani (2007), *Depurazione delle acque reflue urbane ed industriali: tecnologie e normativa tecnica*, [www.industrieambiente.it](http://www.industrieambiente.it).
61. Margesin et al. (2002), *Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryconite*, Arct Antarct Alp Res, 34, 88-93.
62. Margesin et al. (2003), *Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts*, Extremophiles, 7, 451-458.
63. Melin et al. (2006), *Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse*, Desalination 187, 271-282.
64. Menezes et al. (2013), *A sensitive GC/MS method using cold fiber SPME to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in spring water*, Microchemical Journal, 110, 209-214.
65. Meng et al. (2009), *Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material*, Water Research 43, 1489-1512.
66. Metha (2005), *Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes*, Journal of membrane science, vol. 249, 245-249.
67. Mohanty & Mukerji (2008), *Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures Exiguobacterium aurantiacum and Burkholderia cepacia*, International Biodeterioration & Biodegradation, 61, 240-250.
68. Moscoso et al. (2012), *Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale*, Bioresource Technology, 119, 270-276.
69. Mozo et al. (2011), *Fate of hazardous aromatic substances in membrane bioreactors*, Water Research, 45, 4551-4561.
70. Mulder (1996), *Basic principles of membrane technology*, 2nd ed., Kluwer Academic Publishers.
71. Muller et al. (1995), *Aerobic domestic wastewater treatment in a pilot-plant with complete sludge retention by cross-flow filtration*, Water Res. 29, 1179-1189.

72. Nikolova & Islam (1998), *Contribution of adsorbed layer resistance to the flux-decline in an ultrafiltration process*, Journal of Membrane Science. vol. 146 (1), 105-111.
73. Ognier et al. (2004), *Membrane bioreactor fouling in subcritical filtration conditions: a local critical flux concept*, Journal of Membrane Science, 229, 171-177.
74. Pang et al. (2005), *Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane*, Envir. Sci & Techol. 39 (19), 7541-7550.
75. Papiri & Todeschini (2004), *Qualità e controllo delle acque di dilavamento di infrastrutture viarie. Acque di Prima Pioggia: Insediamenti Produttivi e Infrastrutture*. Università degli studi di Pavia.
76. Pearce (2008), *Introduction to membranes - MBRs: manufactures' comparison*, Part 1, Filtration and Separation, 45, 28-31.
77. Perry & Green (2008), *Membrane separation processes*, Perry's chemical engineers' handbook, 8<sup>th</sup> edition, Mc Graw Hill.
78. Pettinato (2015), *Studio sperimentale dell'assorbimento su gusci d'uovo dei metalli contenuti nelle acque reflue civili e trattamento delle stesse mediante un reattore biologico a membrana*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica, a.a. 2014/15.
79. Pizzichini et al. (2009), *Le tecnologie separative mediante membrane*, ENEA, report RSE 2009/19.
80. Pollice et al. (2005), *Sub-critical flux fouling in membrane bioreactors - a review of recent literature*, Desalination, 174, 221-230.
81. Psoch & Schiewer (2006), *Resistance analysis for enhanced wastewater membrane filtration*, Journal of Membrane Science, 280, 284-297.
82. Ramesh et al. (2007), *Membrane biofouling by extracellular polymeric substances or soluble microbial products from membrane bioreactor sludge*, Applied Microbiology and Biotechnology, 74 (3), 699-707.
83. Ricco (2012), *Meccanismi di formazione del fouling nei bioreattori a membrana*, Tesi di Dottorato in Ingegneria Sanitaria-Ambientale, a.a. 2011/2012.
84. Rodil et al. (2007), *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection*, Journal of Chromatography A, 1163, 288-297.
85. Salahi et al. (2012), *Oily wastewater treatment using a hybrid UF/RO system*, Desalination Water Treatment, 28 (1), 75-82.

86. Saturno et al. (2008), *I bioreattori a membrana nella depurazione delle acque: l'innovazione per la tutela dell'ambiente*, Biologi Italiani, vol. 7/2008, pag. 31-39.
87. Schoeberl et al. (2005), *Optimization of operational parameters for a submerged membrane bioreactor treating dye house wastewater*, Separation and Purification Technology, 44, 61-68.
88. Scholz & Fuchs (2000), Treatment of oil contaminated wastewater in a membrane bioreactor, Wat. Res, 34 (14), 3621-3629.
89. Sengupta & Pittman (2008), *Application of membrane contactors as mass transfer device*, Handbook of membrane separation, chemical, pharmaceutical, food and biotechnological applications, ed. by Anil Kumar Pabby, Syed S. H. Rizvi & Ana Maria Sastre - CRC PRESS.
90. Sichinga et al. (2015), *Efficiency and kinetics in treatment of wastewater from garages and residential oil spills using membrane bioreactor technology*, Int. J. Environ. Sci. Techno., 13, 135-146.
91. Sofia et al. (2004), *In situ characterization of microbial community in an A/O submerged membrane bioreactor with nitrogen removal*, Water Science and Technology, 50 (8), 41-48.
92. Song et al. (2012), *Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry*, Talanta, 99, 75-82.
93. Sun et al. (2004), *A dual functional filtration/aeration membrane bioreactor for domestic wastewater treatment*, Proceedings of the IWA - Water Environment - Membrane Technology (WEMT), Conference, Seoul (Korea), 7-10 June, IWA Publishing.
94. Tadkaew et al. (2007), *Membrane bioreactor technology for decentralized wastewater treatment and reuse*, International Journal of Water, 3 (4), 368-380.
95. Visvanathan et al. (1997), *Application of air backflushing technique in membrane bioreactor*, Water Science and Technology, 30, 1-48.
96. Vrijenhoek et al. (2001), *Influence of membrane surface properties on initial rate of colloidal fouling of reverse osmosis and nanofiltration membranes*, Journal of membrane science, vol. 188, 115-128.
97. Wang et al. (2008), *Membrane fouling in a submerged membrane bioreactor (MBR) under sub-critical flux operation: Membrane foulant and gel layer characterization*, Journal of Membrane Science, 325, 238-244.

98. Whyte et al. (1998), *Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic Rhodococcus sp.*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2578-2584.
99. Wiesner et al. (1992), *Mass transport considerations for pressure-driven membrane processes (PDF)*, Journal-American Water Works Association, 1, 88-95.
100. Wisniewski & Grasmick (1998), *Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 138 (2-3), 403-411.
101. Wiszniewski et al. (2009), *Membrane biological reactor (MBR) for treatment of wastewater contaminated by petroleum organic compounds*, research gate.net.
102. Witzig et al. (2002), *Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater*, Water Research, 36 (2), 413-420.
103. Yakimov et al. (1999), *Characterization of Antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers*, Microbiologica, 22, 249-256.
104. Yu et al. (2005), *Surface modification of polypropylene microporous membrane to improve their antifouling property in MBR: NH<sub>3</sub> plasma treatment*, Separation and Purification Technology, 45 (1), 8-15.
105. Zein et al. (2006), *Bioremediation of groundwater contaminated with gasoline hydrocarbons and oxygenates using a membrane-based reactor*, Environ. Sci. Technol. 40 (6), 1997-2003.
106. Zhang et al. (2006), *Factors affecting the membrane performance in submerged membrane bioreactors*, Journal of Membrane Science, 284 (1-2), 54-66.
- 107.[1] [www.analisiacqua.org/acque\\_scarico](http://www.analisiacqua.org/acque_scarico).
- 108.[2] [www.camera.it/parlam.leggi/deleghe/06152](http://www.camera.it/parlam.leggi/deleghe/06152).
- 109.[3] [www.treccani.it](http://www.treccani.it).
- 110.[4] [www.arpa.emr.it](http://www.arpa.emr.it).
- 111.[5] [www.industrieambiente.it](http://www.industrieambiente.it).
- 112.[6] [www.uniroma1.it](http://www.uniroma1.it).
- 113.[7] [www.elearning.unipd.it](http://www.elearning.unipd.it).
- 114.[8] [www.stacque.com/trattamento-acque-meteoriche-normativa.it](http://www.stacque.com/trattamento-acque-meteoriche-normativa.it).
- 115.[9] [www.hytelintl.com](http://www.hytelintl.com).
- 116.[10] [www.geolab-onlus.org](http://www.geolab-onlus.org).

## RINGRAZIAMENTI

Lo svolgimento e la produzione di questo lavoro di tesi è stato reso possibile dalla partecipazione e collaborazione nell'ambito di due progetti: *RecOIL* e *Res Novae*. Il primo, relativo alla promozione e al recupero dell'olio da cucina esausto per la produzione sostenibile di biodiesel, ha consentito la ricerca sperimentale riguardo alla transesterificazione basica ed enzimatica di oli freschi ed esausti in prima analisi e alla produzione di biocombustibile, successivamente. La collaborazione all'attività del progetto *Res Novae* ha prodotto la seconda parte di questo elaborato, con la finalità di progettare un impianto con bioreattore a membrana per il trattamento di acque reflue civili e meteoriche e unità integrata, adibita all'adsorbimento dei metalli pesanti, che si inserisce perciò nel progetto PON04a2\_E.

Questa tesi racchiude gli anni di studio, ricerca e lavoro al fianco della Professoressa Calabrò, che ringrazio per la stima, la fiducia e l'incontenibile entusiasmo che La contraddistinguono. Sicuramente il percorso di dottorato, intenso ed interessante in ogni sua attività, mi ha aiutato nella crescita personale e professionale, nella ricerca di autonomia con consapevolezza delle responsabilità nei diversi ambiti.

Ringrazio i Professori Curcio e Arcuri per avermi coinvolto in entrambi i progetti; Giorgio e Aldo per la parte tecnica: le mie "frequenti" domande in materia mi hanno permesso di approfondire alcuni aspetti.

Ricordo e ringrazio con affetto le mie colleghe: Catia, esempio di dedizione e precisione; Alessandra con la sua generosità e "versatilità" in ogni iniziativa; Maria Francesca, pragmatica e sorridente; Maria, a cui mi sono rivolta tante volte per consigli e delucidazioni, ricevendo sempre risposte esaustive!

Ringrazio Mara e Sudip, in ogni occasione dispensatori di consigli!

Il percorso del dottorato non sarebbe stato lo stesso senza la presenza e il sostegno della mia famiglia: la mia amata bimba, che in questi due intensissimi anni, ha ridefinito le mie priorità; mio marito per il supporto quotidiano e per la stima (esagerata) che mi manifesta; i miei genitori che ci hanno sempre creduto e mi sono stati vicini, so che questa ulteriore tappa li renderà orgogliosi; mio fratello e mia sorella (e la piccola Andreina) che, con caratteri diversi, mi hanno sostenuto negli anni (tanti) di studio; la mia amica-collega Francesca, con la quale condivido vita personale e professionale.

*At last but not least* riconosco a me stessa l'impegno, la tenacia e la passione che ho riversato in questa esperienza!