



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Energetica e Gestionale

Dottorato di Ricerca in

Ingegneria Meccanica

Scuola di Dottorato in

Scienze Ingegneristiche "Pitagora"

CICLO

XXVII

**PROCESSI DI SEPARAZIONE, ESTRAZIONE E BIOCONVERSIONE NELLA
PRODUZIONE DI BIOCOMBUSTIBILI DA MICROALGHE**

Settori Scientifici Disciplinari ING-IND/11; ING-IND/24

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Leonardo Pagnotta

Firma

Supervisor: Chiar.mo Prof. Natale Arcuri

Firma

Chiar.ma Prof.ssa Vincenza Calabrò

Firma

Dottoranda: Dott.ssa Catia Giovanna Lopresto

Firma

Indice

Introduzione	1
---------------------------	----------

PARTE I. PROCESSI ESTRATTIVI

Introduzione	11
---------------------------	-----------

PARTE IA. Estrazione di lipidi da microalghe

Capitolo 1. Caratteristiche e applicazioni delle microalghe	16
--	-----------

1.1 Cenni sulle microalghe.....	16
1.2 Applicazioni delle microalghe nel settore medico-farmaceutico.....	18
1.3 Applicazioni delle microalghe nel settore alimentare.....	18
1.4 Eco-sostenibilità ambientale e micro-alghe.....	19
1.5 Dalle microalghe ai biocombustibili.....	20

Capitolo 2. Rottura cellulare ed estrazione dei lipidi da microalghe. Stato dell'arte	22
--	-----------

2.1 Rottura cellulare.....	23
2.1.1 Metodi di rottura cellulare.....	23
2.1.2 Rottura delle microalghe. Stato dell'arte.....	24
2.2 Sistemi di estrazione dei lipidi dalle microalghe.....	30
2.3 Estrazione con solvente dei lipidi dalle microalghe.....	32
2.3.1 Uso di un solvente organico.....	32
2.3.2 Ricorso ai fluidi supercritici.....	35
2.3.3 Estrazione dei lipidi e transesterificazione in situ.....	36
2.4 Confronto tra i diversi metodi di estrazione e studi correnti.....	34
2.5 Analisi economica preliminare dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe sulla base dei dati presenti in letteratura.....	39

Capitolo 3. Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe	47
--	-----------

3.1 Confronto tra diversi metodi di estrazione di lipidi da <i>Chlorella vulgaris</i> (Lab. di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università di Genova).....	47
3.2 Ottimizzazione dell'estrazione con esano ed etanolo (Lab. Di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).....	54
3.3 Estrazione con "green solvents" di lipidi da <i>Chlorella sorokiniana</i> (Lab. Process Engineering for Sustainable Systems, KU Leuven, Belgio).....	65
3.3.1 Termodinamica dell'estrazione con solvente.....	65
3.3.2 Estrazione con solventi green.....	69
3.3.3 Sperimentazione in laboratorio.....	70

Capitolo 4. Progettazione dell'estrattore pilota	74
4.1 Calcoli preliminari.....	74
4.2 Considerazioni per lo scale-up.....	77

PARTE IB. Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

Capitolo 1. Il limonene e le sue applicazioni	82
1.1 Gli agrumi e il limone di Rocca Imperiale IGP.....	82
1.2 Gli oli essenziali.....	85
1.3 Il limonene: aspetti fisici, chimici e biochimici.....	86
1.4 Applicazioni del limonene.....	90
Capitolo 2. Metodi di estrazione del limonene dalle bucce di agrumi	93
2.1 Localizzazione e variabilità degli oli essenziali.....	93
2.2 Analisi dei metodi di estrazione degli oli essenziali.....	94
2.3 Tecniche tradizionali.....	95
2.3.1 <i>Spremitura a freddo</i>	95
2.3.2 <i>Idrodistillazione</i>	95
2.3.3 <i>Distillazione con vapore</i>	96
2.3.4 <i>Estrazione con solvente organico</i>	97
2.4 Tecniche non convenzionali.....	100
2.4.1 <i>Estrazione con CO₂ supercritica</i>	100
2.4.2 <i>Estrazione assistita da microonde</i>	101
2.4.3 <i>Estrazione con solvente assistita da ultrasuoni</i>	102
Capitolo 3. Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE	104
3.1 Obiettivi del lavoro.....	104
3.2 High Pressure and Temperature Extraction (HPTE).....	106
3.3 Materia prima: bucce di limone di Rocca Imperiale IGP.....	107
3.4 Definizione del piano sperimentale.....	108
3.4.1 <i>HPTE</i>	108
3.4.2 <i>Estrazione Soxhlet</i>	110
3.4.3 <i>Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE)</i>	110
3.5 Analisi dei campioni.....	111
3.6 Risultati e discussione.....	112
3.6.1 <i>HPTE</i>	112
3.6.2 <i>Estrazione Soxhlet</i>	117
3.6.3 <i>Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE)</i>	117
3.6.4 <i>Confronto tra i diversi metodi di estrazione</i>	118
3.7 Analisi statistica.....	120

3.7.1 Modello ANOVA.....	120
3.7.2 Piano fattoriale 3 ³	122
3.7.3 Response Surface Methodology (RSM).....	124
Capitolo 4. Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica.....	127
4.1 Obiettivi del lavoro.....	127
4.2 Limoni di Rocca Imperiale IGP: analisi preliminari.....	128
4.3 Definizione del piano sperimentale.....	130
4.3.1 Effetto della pressione e della temperatura.....	130
4.3.2 Effetto delle dimensioni delle particelle.....	131
4.3.3 Effetto della portata di CO ₂	131
4.4 Analisi dei campioni.....	132
4.5 Risultati e discussione.....	133
4.5.1 Effetto della pressione e della temperatura.....	133
4.5.2 Effetto delle dimensioni delle particelle e del grado di maturazione.....	134
4.5.3 Effetto della portata di CO ₂ e selettività.....	135
4.5.4 Confronto tra estrazione supercritica e idrodistillazione ed effetto dei pre-trattamenti.....	136
4.6 Curve di estrazione con CO ₂ supercritica.....	137
4.7 Modellazione matematica dell'estrazione di limonene con CO ₂ supercritica.....	138
4.7.1 Stato dell'arte della modellazione dell'estrazione supercritica di oli essenziali da matrici vegetali.....	138
4.7.2 Modello di Sovová.....	139
4.7.3 Validazione del modello di Sovová per l'estrazione supercritica da bucce di limone.....	141
Bibliografia (Parte I).....	144

PARTE II. PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Introduzione.....	168
--------------------------	------------

PARTE IIA. Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 1. Il biodiesel: stato dell'arte.....	177
1.1 Cos'è il biodiesel?.....	177
1.1.1 Caratteristiche del biodiesel come combustibile.....	177
1.1.2 Gli oli vegetali di partenza.....	178
1.2 Come si ottiene il biodiesel?.....	182
1.2.1 La miscelazione.....	183
1.2.2 La pirolisi.....	183
1.2.3 Le microemulsioni.....	183

1.2.4	<i>La transesterificazione</i>	184
1.3	Catalisi della reazione di transesterificazione.....	186
1.3.1	<i>Catalisi basica</i>	186
1.3.2	<i>Catalisi acida</i>	186
1.3.3	<i>Catalisi enzimatica</i>	188
1.4	Il biodiesel dagli oli di frittura esausti.....	189
1.5	Il biodiesel dalle microalghe.....	193
1.5.1	<i>Vantaggi e svantaggi del biodiesel dalle microalghe</i>	194
1.5.2	<i>Accettabilità del biodiesel dalle microalghe</i>	196
1.5.3	<i>Analisi economica del biodiesel ottenuto dalle microalghe</i>	197
Capitolo 2. La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi		202
2.1	L'enzima lipasi.....	202
2.2	La transesterificazione di trigliceridi catalizzata da lipasi.....	202
2.2.1	<i>Tipo di lipasi</i>	203
2.2.2	<i>Tipo di alcol</i>	205
2.2.3	<i>Presenza di un solvente nell'ambiente di reazione</i>	208
2.3	Linea di ricerca attiva presso il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie (Università della Calabria).....	209
Capitolo 3. Studio sperimentale della produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata		212
3.1	Scelta del sistema di reazione.....	212
3.1.1	<i>L'olio</i>	212
3.1.2	<i>L'alcol</i>	214
3.1.3	<i>Il biocatalizzatore: lipasi Pseudomonas cepacia immobilizzata</i>	214
3.2	Studio sperimentale della stabilità e dell'attività della <i>Lipo P. cepacia</i>	217
3.2.1	<i>Obiettivi e piano sperimentale</i>	217
3.2.2	<i>Conduzione delle prove</i>	217
3.2.3	<i>Risultati e discussione</i>	219
3.2.3.1	Verifica dell'assenza di rilascio dell'enzima dal supporto.....	219
3.2.3.2	Effetto della preliminare incubazione in olio sull'attività del biocatalizzatore.....	219
3.2.3.3	Verifica dell'inibizione da etanolo.....	220
3.2.3.4	Effetto della velocità di agitazione sull'attività del biocatalizzatore.....	221
3.2.3.5	Effetto del lavaggio del biocatalizzatore con esano.....	222
3.3	Studio sperimentale della transesterificazione enzimatica di un olio vegetale fresco mediante il biocatalizzatore <i>Lipo P. cepacia</i> e <i>Epobond P. cepacia</i>	223
3.3.1	<i>Obiettivi e piano sperimentale</i>	223
3.3.2	<i>Conduzione delle prove</i>	224
3.3.3	<i>Rielaborazione dei dati</i>	226
3.3.4	<i>Risultati e discussione – Prove con Lipo P. cepacia</i>	230
3.3.5	<i>Risultati e discussione – Prove con Epobond P. cepacia</i>	235

3.4 Studio sperimentale della transesterificazione enzimatica di un olio vegetale “esausto” mediante il biocatalizzatore <i>Epobond P. cepacia</i>	239
3.4.1 Obiettivi e piano sperimentale.....	239
3.4.2 Conduzione delle prove.....	240
3.4.3 Risultati e discussione – Prove con <i>Epobond P. cepacia</i>	241
3.4.4 Confronto tra le prestazioni di <i>Lipo P. cepacia</i> ed <i>Epobond P. cepacia</i> nelle reazioni di transesterificazione dell’olio fresco.....	245
Capitolo 4. Elaborazione del modello cinetico.....	249
4.1 Meccanismo di pseudo-primo ordine.....	249
4.2 Meccanismo del secondo ordine reversibile.....	250
4.3 Meccanismo di reazione <i>Ping Pong bi bi</i>	250
4.4 Metodo di King-Altman.....	254
4.4.1 Equazione cinetica senza inibizione da etanolo.....	255
4.4.2 Equazione cinetica con inibizione da etanolo.....	256
4.5 Analisi delle velocità di reazione e decadimento dell’attività biocatalitica.....	258
4.5.1 Effetto della concentrazione del biocatalizzatore nel sistema di reazione...258	
4.5.2 Effetto del riutilizzo del biocatalizzatore <i>Epobond P. cepacia</i> in cicli di reazione consecutivi.....	259
4.6 Riduzione delle variabili del modello.....	262
4.6.1 Riduzione delle variabili per le prove condotte con il biocatalizzatore <i>Lipo P.</i> <i>cepacia</i>	262
4.6.2 Riduzione delle variabili per le prove condotte con il biocatalizzatore <i>Epobond P. cepacia</i>	268
4.7 Calcolo dei parametri cinetici e validazione del modello cinetico.....	272
4.7.1 Modello di pseudo-primo ordine.....	273
4.7.2 Modello del secondo ordine.....	275
4.7.3 Modello <i>Ping Pong bi bi</i>	276
4.7.3.1 Prove di reazione in tre step da 100 minuti ciascuno con <i>Lipo P.</i> <i>cepacia</i> a partire da olio fresco.....	276
4.7.3.2 Prove di reazione in tre step da 180 minuti ciascuno con <i>Epobond P.</i> <i>cepacia</i> a partire da olio esausto.....	279

PARTE IIB. Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 1. Il biogas: stato dell’arte.....	283
1.1 Cos’è il biogas?.....	283
1.2 Come si ottiene il biogas? La digestione anaerobica.....	284
1.2.1 Fasi della digestione anaerobica.....	284
1.2.2 Biochimica della digestione anaerobica.....	286
1.2.3 Cinetiche microbiologiche di reazione.....	288
1.2.4 Prodotti della digestione anaerobica.....	290
1.2.5 Fattori che influenzano la digestione anaerobica.....	292

1.2.5.1	Temperatura.....	292
1.2.5.2	pH.....	293
1.2.5.3	Substrato.....	294
1.2.5.4	Agitazione.....	295
1.3	Da cosa si ottiene il biogas? Le biomasse di partenza.....	296
1.4	Impianti di produzione di biogas.....	297
1.4.1	<i>Parametri di gestione del processo</i>	298
1.4.2	<i>Tipi di impianti di produzione del biogas</i>	300
1.4.2.1	Impianto tipo plug-flow.....	300
1.4.2.2	Impianto tipo CSTR.....	300
1.4.2.3	Impianto costituito da più bioreattori.....	301
1.5	Diffusione degli impianti di biogas in Europa.....	302
Capitolo 2.	Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante le reti neurali.....	305
2.1	Biogas dalle microalghe.....	305
2.2	Descrizione dei digestori presenti nel Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie (UNICAL) e realizzazione di nuovi digestori in scala da lab.	309
2.3	Sperimentazione in laboratorio con una microalga povera di lipidi (<i>Spirulina maxima</i>).....	315
2.3.1	<i>Substrato della digestione anaerobica</i>	315
2.3.2	<i>Inoculo batterico</i>	316
2.3.3	<i>Condizioni operative</i>	317
2.3.4	<i>Piano sperimentale</i>	317
2.3.5	<i>Risultati e discussione</i>	318
2.3.5.1	Prove qualitative.....	318
2.3.5.2	Prove quantitative (I ciclo).....	320
2.3.5.3	Prove quantitative (II ciclo).....	323
2.4	Ottimizzazione delle condizioni mediante le reti neurali.....	326
Capitolo 3.	Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta.....	336
3.1	Stato dell'arte.....	336
3.2	Programmazione sperimentale.....	338
3.3	Sperimentazione in laboratorio.....	339
Capitolo 4.	Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota.....	344
4.1	Progettazione di un digestore in scala intermedia.....	344
4.2	Progettazione del digestore anaerobico prototipale per l'impianto di Marina di Gioiosa Jonica.....	348
Bibliografia (Parte II)		351

Appendice

INTRODUZIONE

INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca industriale PON01_02061, relativo al Programma Operativo Nazionale "Ricerca e Competitività 2007-2013", dal titolo "*Progetto di un sistema energetico avanzato completo, basato sulla coltura massiva di micro-alghe in foto-bioreattori trasparenti per la produzione, in condizioni di competitività ed eco-sostenibilità, di energia da fonte rinnovabile e di altri prodotti*". Tale progetto, di natura multidisciplinare, ha previsto lo sviluppo di un impianto dimostrativo su scala prototipale a Marina di Gioiosa Jonica (RC), basato sulla coltivazione massiva di microalghe per la produzione di bio-fuels, nonché di eventuali prodotti ad alto valore aggiunto unitario. L'iniziativa intende colmare un vuoto ancora significativo sia negli studi scientifici che nelle applicazioni industriali riguardanti l'utilizzo delle biomasse algali per finalità energetiche e per altri fini economici e produttivi. Questa tematica, infatti, da alcuni decenni è stata oggetto di numerosi studi e sperimentazioni, ma il carattere prettamente scientifico e di laboratorio cui tali studi sono stati improntati non ha permesso di sciogliere tutti i nodi. Il progetto aspira dunque a superare, almeno in parte, le questioni irrisolte mediante un approccio che si differenzia dai precedenti tentativi compiuti in questo campo, in quanto le attività di ricerca e sviluppo non sono dimensionate su una scala di laboratorio ma nell'ottica di un più rapido sfruttamento economico e imprenditoriale dei risultati. L'impostazione adottata per formulare, controllare e valutare nel corso del tempo obiettivi, performance e risultati dell'iniziativa ha confermato che il progetto ha aspirato a ideare, sviluppare, ingegnerizzare, realizzare e condurre in esercizio su scala proto-industriale un fotobioreattore in grado di produrre, con vari tipi di alghe, quantità importanti di biomassa algale per scopi principalmente ma non esclusivamente energetici. Tale bioreattore presenta potenzialità di utilizzo soprattutto da parte del settore agricolo e agroindustriale, ad esempio per sostituire coltivazioni in via di dismissione quali barbabietole da zucchero, tabacco ecc., senza contare l'impiego in prossimità o in combinazione con produzioni zootecniche e, non da ultimo, l'utilizzo in via autonoma in ambito propriamente industriale.

Le varie fasi del processo possono essere schematizzate in Figura I.1.

INTRODUZIONE

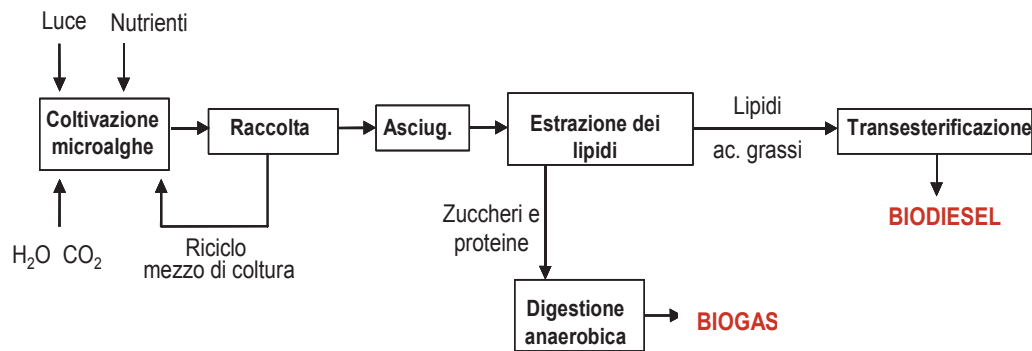


Figura I.1

Anche se le diverse operazioni possono apparire consequenziali e da realizzare in serie, in realtà il processo è molto più complesso e interconnesso.

Nello specifico, il progetto si è articolato in dieci obiettivi realizzativi, a loro volta scomposti in una serie di attività affidate ai diversi partner del progetto. Sebbene tali attività siano molto diverse tra loro e richiedano competenze specifiche in vari settori scientifici (tecnologico-ingegneristico, agronomico, biologico, chimico, socio-economico, organizzativo-gestionale, tecnico-informatico), il progetto non ha potuto prescindere da un approccio sistemico e coordinato all'ideazione, realizzazione e conduzione dei singoli sottosistemi dell'impianto. Nello specifico, i diversi obiettivi realizzativi (abbreviati come OR) sono di seguito brevemente descritti. L'OR1 ha previsto la progettazione, realizzazione e conduzione del reattore fotosintetico in cui coltivare le microalghe, in stretta connessione con l'OR2 riguardante lo studio delle materie plastiche più idonee per la realizzazione del fotobioreattore stesso. Seppur con varianti inerenti configurazioni e design di processo, le tecniche di coltivazione possibili per le microalghe sono sostanzialmente due. In particolare, dal punto di vista reattoristico bisogna decidere se le microalghe devono crescere in vasche aperte (*open ponds*) o in fotobioreattori. La scelta del sistema di coltura dipende da una serie di fattori, tra cui il volume della coltura, la temperatura, il consumo energetico, le esigenze di manutenzione, la qualità del prodotto finale desiderato. La configurazione scelta per questo progetto ha previsto una serie di sei circuiti formati da fotobioreattori tubolari disposti orizzontalmente in un ambiente aperto per sfruttare al massimo l'irraggiamento solare. Il diametro e la lunghezza dei tubi e la distanza tra essi sono stati opportunamente progettati tenendo conto di variabili quali l'intensità luminosa e il livello di ossigeno disciolto. Anche lo studio del materiale in cui realizzare i fotobioreattori ha rappresentato un elemento chiave

INTRODUZIONE

della progettazione. In particolare, la scelta è ricaduta su un materiale plastico (possibilmente riciclato) trasparente e flessibile e sono state selezionate, tra quelle commercialmente disponibili, le materie plastiche più idonee e adeguate sulla base di una combinazione multicriteriale, considerando le proprietà meccaniche e l'eventuale tendenza alla fotodegradazione, le proprietà chimiche e fisiche, le proprietà di bio-compatibilità con il mezzo di coltura e le specie algali, la relativa disponibilità sul mercato, la compatibilità di costo con la produzione di tubi idonei alla realizzazione dei fotobioreattori. Tale progettazione e realizzazione del fotobioreattore è stata imprescindibile dalla selezione di idonee specie algali (OR5) e del relativo mezzo di coltura (OR9), attività che è stato necessario svolgere parallelamente e in stretta cooperazione con tutte le altre: non basta scegliere la specie "migliore", ma occorre selezionare quella più "coltivabile", che garantisca una velocità di crescita accettabile, che abbia dimensioni non troppo piccole (per avere una separazione efficiente dal punto di vista tecnico ed economico) ma neanche troppo grandi (che renderebbero difficile la movimentazione e il mantenimento in sospensione durante la crescita), che risulti compatibile con i materiali del fotobioreattore e che abbia un buon contenuto di lipidi in modo da giustificare l'estrazione e il successivo utilizzo per ottenere biocombustibili o altri prodotti ad alto valore aggiunto. Quindi, vi è una forte interdipendenza tra crescita algale, fornitura dei nutrienti e raccolta delle microalghe stesse, per cui la progettazione, realizzazione ed esercizio di un opportuno sistema di separazione delle microalghe dal terreno di coltura (OR3) non sono potuti procedere in modo indipendente. In modo analogo, la scelta della specie algale è stata strettamente connessa con l'impostazione e impiego di un idoneo sistema di agitazione/miscelazione (OR4) durante la fase di crescita delle microalghe, per evitare che esse sedimentassero nei tubi e garantire che la coltura fosse in continuo movimento. Infine, dal ceppo microalgale e dai nutrienti forniti durante la crescita dipende la composizione biochimica delle microalghe. Di conseguenza, le attività degli OR5 e OR9 hanno dovuto tener conto del rapporto tra specie coltivata e contenuto di lipidi, parallelamente alle attività dell'OR6 (estrazione dei lipidi) e dell'OR7 (*Progettazione e realizzazione di idonee macchine per l'estrazione dei lipidi e la digestione anaerobica*). Infine, sono stati realizzati studi per impostare un idoneo sistema di raccolta e immissione dell'anidride carbonica (OR8) ed è stata effettuata un'analisi di contesto, per valutare la possibile concorrenza con colture tradizionali e tipiche e la diffusione del sistema nelle aree costiere del sud del Mediterraneo (OR10).

INTRODUZIONE

È evidente, quindi, che la complessità dell'impianto e la novità dello stesso nella sua globalità richiedano una forte sinergia delle competenze scientifiche, progettuali, ingegneristiche e realizzative, a partire dalla condivisione delle conoscenze dello stato dell'arte e delle maggiori criticità, anche allo scopo di selezionare le soluzioni realizzative più appropriate al progetto. Bisogna sottolineare che la complessità del progetto nella sua interezza se da un lato ha richiesto un grande sforzo di interfacciamento e coordinamento, dall'altro ha permesso un'interessante collaborazione con soggetti molto diversi per background culturale, competenze e visione della ricerca orientata a uno sviluppo industriale, portando a un punto di incontro tra l'approccio scientifico più rigoroso di università e centri di ricerca (Università della Calabria, CNR-ISAFOM, ISRIM, CUEIM) e le esigenze pratiche di imprese calabresi attive sul territorio (Grafiche Femia, Dedalus, Olearia Villa Ada).

A scopo semplificativo, gli obiettivi realizzativi sopra brevemente descritti sono riportati in Figura I.2, dove sono evidenziate le interconnessioni sopra accennate.

In questo variegato panorama, l'UNICAL si è concentrata sulle seguenti attività:

- ✓ OR3: AA.RR. 3.1 e 3.2 – progettazione, realizzazione ed esercizio del sistema di separazione;
- ✓ OR4: AA.RR. 4.1 e 4.2 – progettazione e realizzazione del sistema di agitazione/miscelazione;
- ✓ OR6: A.R. 6.1 – estrazione dei lipidi;
- ✓ OR7: AA. RR. 7.1 e 7.2 – progettazione e realizzazione di macchine per l'estrazione degli oli e per la digestione anaerobica.

Nello specifico, durante il mio percorso di dottorato, ho affrontato tutte le attività appena citate. Relativamente alle attività degli obiettivi realizzativi OR3 e OR4, ho contribuito alla ricerca e alla progettazione portate avanti dal gruppo di Ingegneria Meccanica, in particolare dall'Ing. Roberto Bruno e dal Sig. Giorgio Cuconati sotto la supervisione del Prof. Natale Arcuri.

Sotto la supervisione della Prof.ssa Calabrò ho, invece, affrontato le altre tre attività, che mirano innanzitutto all'individuazione di un opportuno metodo di estrazione dei lipidi dalle microalghe. Tale aspetto è stato approfondito, oltre che presso il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie (UNICAL), anche presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale dell'Università degli Studi di Genova (gennaio-febbraio 2013) e presso

INTRODUZIONE

il *Chemical Engineering Department* sezione *Process Engineering for Sustainable Systems* della *Katholieke Universiteit* di Leuven in Belgio (aprile-luglio 2014). A questa fase sperimentale ha fatto seguito una fase più strettamente progettuale che ha portato all'ideazione e al disegno dell'estrattore da realizzare presso l'impianto di Marina di Gioiosa Jonica. I lipidi estratti sono poi destinati alla transesterificazione per ottenere biodiesel oppure alla separazione dei singoli componenti al fine di ottenere prodotti ad alto valore aggiunto (ad esempio $\omega 3$). La biomassa microalgale esausta dopo l'estrazione dei lipidi è stata, infine, valorizzata mediante un processo di digestione anaerobica finalizzato alla produzione di biogas.

Per maggiore chiarezza le diverse attività sono schematizzate in Figura I.3.

INTRODUZIONE

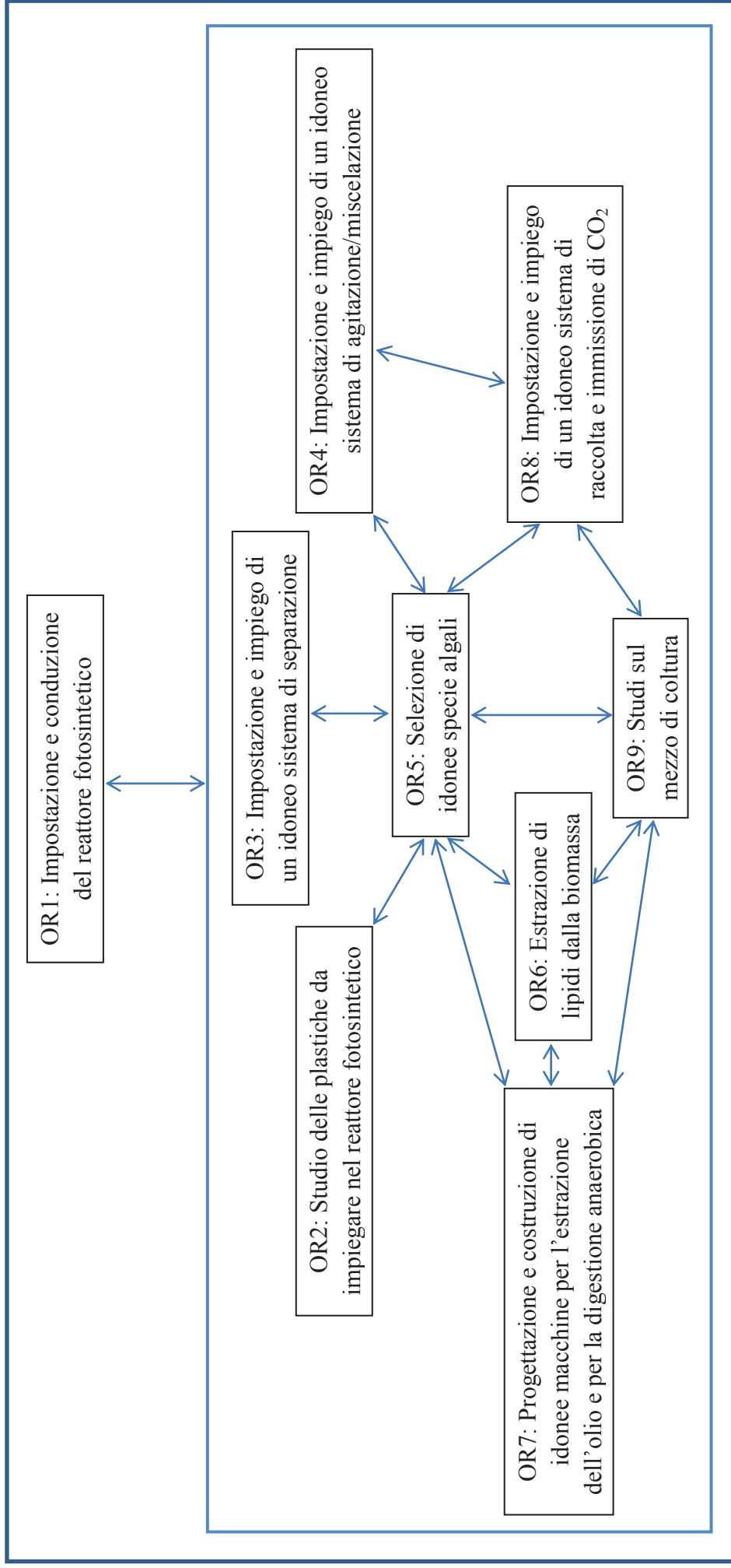


Figura I.2

INTRODUZIONE

**MICROALGHE
PON01_02061**

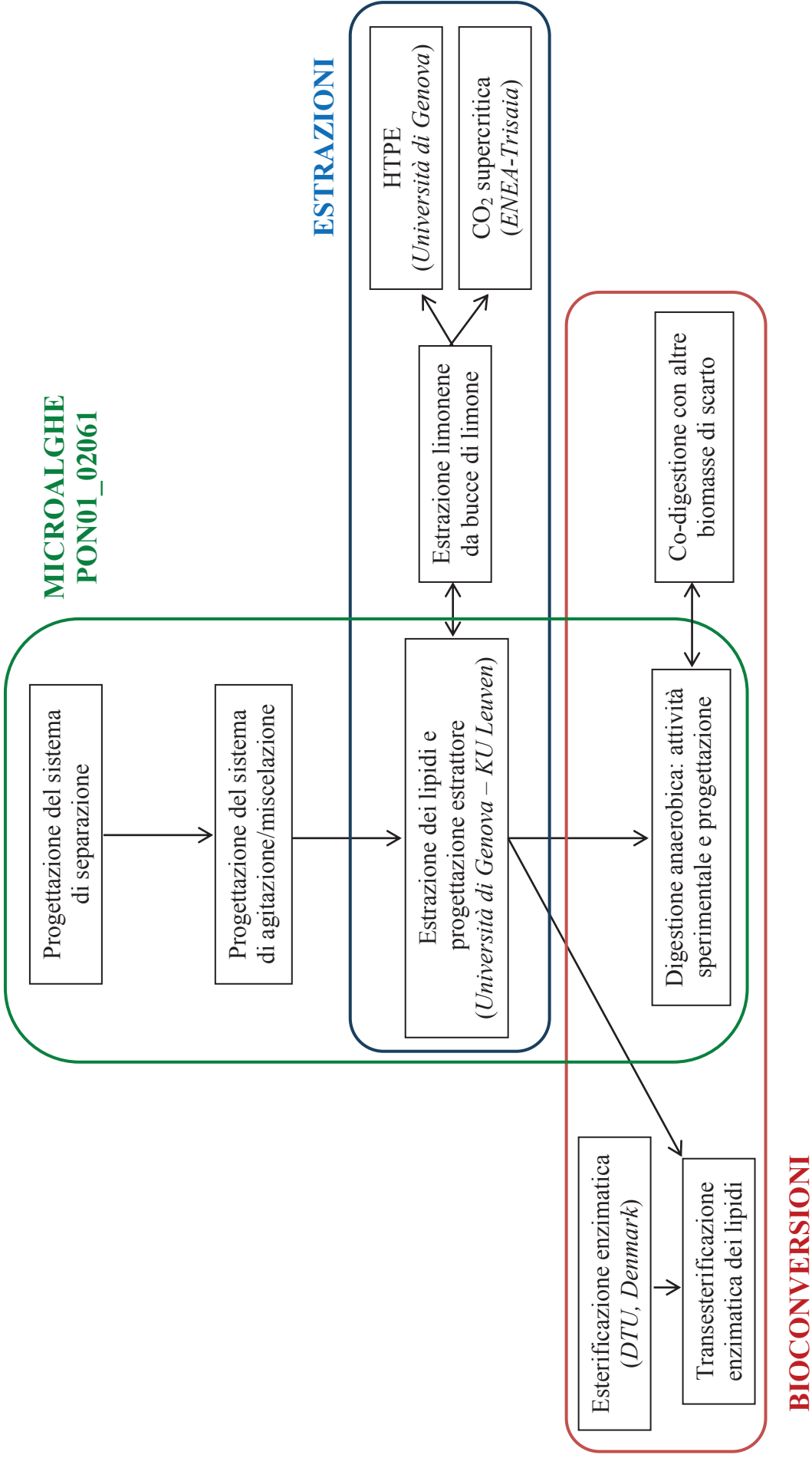


Figura I.3

INTRODUZIONE

Dunque, si possono individuare essenzialmente due filoni di ricerca relativi alle attività 6.1 e 7.1: quello dell'estrazione e quello delle bioconversioni. Ciascuno di questi aspetti è stato approfondito in un percorso di ricerca coerente con le finalità del progetto PON sopra descritto, ma nello stesso tempo non limitato ad esso.

Relativamente al processo di estrazione, l'ottenimento dei lipidi dalle microalghe è stato studiato parallelamente all'estrazione di altri prodotti ad alto valore aggiunto da matrici vegetali. In particolare, in un'ottica di valorizzazione di scarti agro-industriali si è deciso di studiare l'estrazione di limonene da bucce di limone mediante due metodi non convenzionali:

1. estrazione con solvente ad alta pressione e temperatura (HPTE) presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale dell'Università degli Studi di Genova;
2. estrazione mediante CO₂ supercritica in collaborazione con il Centro di Ricerche ENEA Trisaia (Rotondella, Potenza).

Per quanto riguarda, invece, il filone delle bioconversioni è stato affrontato lo studio sia della transesterificazione per produrre biodiesel sia della digestione anaerobica per ottenere biogas. Nel primo caso, si è valutata la fattibilità di una reazione condotta per via enzimatica, in modo innovativo rispetto alla tradizionale catalisi basica o acida. A tal fine, è stato scelto un enzima lipasi immobilizzato e ne è stata studiata l'azione, prima su una reazione di esterificazione semplice e poi sulla reazione di transesterificazione più complessa. Lo studio della reazione di esterificazione è stato il proseguimento di una ricerca iniziata presso la *Danmarks Tekniske Universitet* (DTU, Lyngby, Danimarca) durante la laurea specialistica, con l'obiettivo di individuare il modello cinetico della reazione enzimatica e la presenza di eventuali effetti inibitori della miscela reagente sull'attività della lipasi. Si è passati, quindi, allo studio della reazione di transesterificazione a partire da oli vegetali, valutando i punti critici del processo, la stabilità della lipasi e la cinetica di reazione. Per una questione prettamente pratica di disponibilità commerciale e facile reperibilità, tale studio è stato condotto su oli vegetali di frittura, sia freschi che esausti, ma le conclusioni e soprattutto l'approccio metodologico possono essere estesi anche agli oli di origine microalgale, compatibilmente con la loro composizione.

L'altro aspetto delle bioconversioni trattato è relativo alla produzione di biogas da biomasse di scarto. Ai fini del progetto PON è stato studiato il processo di digestione anaerobica di microalghe in scala di laboratorio e si è arrivati al disegno di massima del digestore prototipo, perfezionato insieme agli altri partner del progetto. Tutto ciò è stato affiancato da studi di

INTRODUZIONE

digestione e co-digestione anaerobica con altre biomasse di scarto, quali letame, carta e “pastazzo” di agrumi.

Alla luce di quanto visto, questo lavoro di tesi sarà articolato in due parti, ciascuna organizzata in capitoli e paragrafi.

La **Parte I** è relativa allo studio delle tecniche di estrazione di diversi prodotti obiettivo da matrici vegetali. In particolare, saranno descritti tutti gli step operativi che hanno portato alla progettazione dell’estrattore prototipale a partire dagli studi condotti in laboratorio sull’ estrazione di lipidi da microalghe. A tale studio, è stato affiancato quello dell’ estrazione di un altro prodotto ad alto valore aggiunto, il limonene, da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP, mediante due metodiche: l’ estrazione con solvente ad alta pressione e temperatura mediante un approccio statistico e l’ estrazione con CO₂ supercritica con relativa modellazione matematica del processo.

La **Parte II** affronta lo studio delle bioconversioni, non strettamente richiesto dal progetto PON, ma utile per completare il quadro del processo globale e per valutare le potenzialità degli estratti e dei sottoprodotti. Nello specifico, saranno descritti gli studi sulla transesterificazione dei lipidi per ottenere biodiesel e sulla digestione anaerobica di biomasse di scarto (comprese microalghe di scarto dopo il processo di estrazione) per produrre biogas.

Dal momento che l’intero percorso di dottorato è stato inquadrato nel progetto PON01_02061, per completezza si riporta nell’**Allegato** la descrizione dell’intero processo, dalla coltivazione delle microalghe all’ estrazione dei lipidi, in un percorso coerente che va dalla ricerca bibliografica alla sperimentazione in laboratorio, fino ad arrivare alla progettazione e realizzazione su scala prototipale della configurazione attualmente prevista nell’impianto di Marina di Gioiosa Jonica.

PARTE I

Processi estrattivi

Introduzione

Tutti gli organismi vegetali, anche se tra loro diversi per forma, organizzazione e adattabilità all'ambiente, utilizzano un numero piuttosto limitato di sostanze per i differenti processi biochimici legati al proprio metabolismo.

In generale, si possono distinguere due tipi di vie metaboliche: primaria e secondaria.

Il metabolismo primario, o di base, comprende tutte le vie necessarie per la sopravvivenza delle cellule. A partire dalla fotosintesi clorofilliana, tutti i processi di biosintesi di composti e della loro successiva degradazione, legati alla vita cellulare, costituiscono il metabolismo primario. I prodotti del metabolismo secondario, invece, sono sostanze presenti solo in alcuni tipi di cellule specializzate e differenziate, biosintetizzate a partire dai prodotti intermedi del metabolismo primario in funzione di fattori ecologici e genetici.

Le sostanze di interesse (principi attivi) contenute nelle matrici vegetali possono essere metaboliti sia primari (proteine, lipidi, polisaccaridi) sia intermedi (acidi organici) sia secondari (terpeni, fenilpropanoidi, flavonoidi, alcaloidi, glicosidi, ecc.).

Dunque, le matrici vegetali contengono numerose sostanze chimiche, estraibili in modo differenziato in base al metodo utilizzato (*Azmir et al., 2013*). L'estrazione è, quindi, l'operazione unitaria che rende disponibili composti a più o meno alto valore aggiunto per le successive operazioni di isolamento, purificazione e trasformazione (*Sasidharan et al., 2011*).

Fin dall'antichità l'uomo ha sviluppato e perfezionato molteplici metodi per trasformare le matrici vegetali in funzione dei differenti impieghi in campo farmaceutico, cosmetico ed alimentare. La scelta della tecnica di estrazione ottimale è influenzata da numerosi fattori come la specificità della pianta, le differenti parti che si intendono utilizzare (es. radici, corteccia, foglie, frutti, ecc.) e il particolare specifico utilizzo dell'estratto. In generale è possibile affermare che dalla stessa matrice vegetale, sottoposta a differenti processi di estrazione, si ottengono estratti che possono differire anche notevolmente per aspetto, composizione chimica e attività biologica.

Tali estratti sono spesso l'obiettivo primario di un dato processo. Ad esempio, la coltivazione delle microalghe è portata avanti con ceppi specifici e nelle condizioni ottimali che garantiscano la massima produzione di un determinato composto obiettivo, la cui individuazione determina la configurazione stessa dell'intero processo di produzione. Nel caso del progetto PON01_02061, la coltivazione su larga scala di microalghe è mirata all'ottenimento di biocombustibili, per cui l'estrazione è finalizzata innanzitutto all'isolamento dei lipidi da convertire in biodiesel. I lipidi presenti nelle cellule microalgali possono essere divisi in due grandi classi: i lipidi polari (glicolipidi, fosfolipidi, sulfolipidi) e i lipidi neutri (monogliceridi, digliceridi, trigliceridi, steroli, carotenoidi). La composizione relativa dei lipidi delle microalghe dipende dalla specie presa in considerazione, dalle condizioni ambientali, di temperatura, di intensità luminosa e dalla disponibilità di nutrienti (Roessler, 1990; Hu et al., 2008; Liu et al., 2008). È stato dimostrato che le microalghe accumulano più trigliceridi in assenza o bassa concentrazione di azoto (Tornabene et al., 1983; Roessler, 1990; Tang et al., 2011) mentre le diatomee aumentano la biosintesi dei trigliceridi in limitazione di silicio (Shifrin et al., 1981; Roessler, 1990). Le microalghe verdi oleaginose mostrano un contenuto medio di lipidi di circa 25.5% in peso secco della biomassa totale (Rodolfi et al., 2009). La quantità di lipidi aumenta considerevolmente (raddoppia o triplica) quando le cellule sono cresciute in condizioni di stress, raggiungendo il 45.7% in peso secco. Rodolfi et al. (2009) hanno già riportato uno screening di 30 ceppi differenti di microalghe marine e di acqua dolce in base alla produzione lipidica e di biomassa, scegliendo come specie migliore per la produzione di biocarburante uno ceppo di *Nannochloropsis sp.* Griffiths e Harrison (2009) hanno paragonato i dati di letteratura disponibili su 55 microalghe appartenenti a generi differenti in base alla produttività lipidica e di biomassa. Nonostante le numerose difficoltà nel comparare i dati ottenuti in diverse condizioni di crescita, questi autori sottolineano le scarse informazioni presenti in letteratura sulle caratteristiche genetiche da prendere in considerazione per la selezione della microalga più adatta alla produzione di biocarburanti. La sostenibilità economica del processo di produzione di biofuels da microalghe, in termini di riduzione dei costi operativi e di manutenzione, oltre che di massimizzazione della produzione di lipidi, sarà il fattore chiave per la commercializzazione dei combustibili a partire da microalghe. Esistono sfide a diversi livelli del processo di produzione, cioè coltivazione, raccolta, estrazione e conversione. Un grande lavoro di ricerca

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Introduzione

è stato condotto, ad esempio, per ottimizzare il processo di coltivazione, identificando i ceppi ricchi di olio e le condizioni ambientali più favorevoli. Inoltre, il metodo di raccolta e la quantità di acqua contenuta nella biomassa, svolgono un ruolo fondamentale per la scelta della tecnica di estrazione dei lipidi. Quindi, ci sono poche procedure ben documentate per l'estrazione di oli dalle microalghe e la carenza di informazioni rilevanti sulla fase di estrazione di lipidi e oli a più larga scala è la limitazione dello sviluppo di biocarburanti da biomassa algale. Nel nostro progetto, la scelta del sistema di estrazione è stata naturalmente legata al ceppo di microalghe selezionato per l'impianto prototipale di Marina di Gioiosa Jonica. Nella Parte IA, dunque, è stato studiato il processo di rottura cellulare ed estrazione dei lipidi dalle microalghe, descrivendo nel modo più esauriente possibile il relativo stato dell'arte, per poi passare alla sperimentazione in laboratorio e alla progettazione del sistema di estrazione per l'impianto di Marina di Gioiosa Jonica.

Altrettanto interessante è la valorizzazione della biomassa di scarto e, quindi, la trasformazione di un rifiuto da smaltire (dunque, un costo) in un prodotto con un determinato valore economico (in ogni caso un ricavo). Tale biomassa può essere usata tal quale, ad esempio come fertilizzante o mangimi per animali, può essere trasformata in biocarburanti o energia elettrica mediante processi biochimici e termochimici (Parte II) oppure può essere ulteriormente sottoposta ad estrazione di composti e principi bioattivi con un valore aggiunto di molto superiore rispetto alle applicazioni prima accennate. Ad esempio, è questo il caso delle bucce degli agrumi, sotto-prodotto delle operazioni di spremitura e ottenimento del succo. Tra le sostanze con attività biologica estraibili dalle piante, gli oli essenziali sono quelle che rivestono un ruolo economico e strategico molto importante, soprattutto nei settori farmaceutico e cosmetico. Dato che gli oli essenziali sono elaborati in quantità estremamente variabile e sono generalmente costituiti da numerose sostanze, talvolta di caratteristiche chimiche e fisiche differenti, la loro estrazione deve essere effettuata con metodi appropriati. È necessario evitare qualunque processo che possa modificare le caratteristiche chimiche dei costituenti l'olio. I prodotti naturali, in ogni caso, contengono un gran numero di composti chimici e lo stesso materiale, se viene trattato con diversi solventi, fornisce di regola prodotti differenti. La temperatura a cui viene condotto il processo, l'uso di solventi, la presenza di ossigeno e la durata del trattamento, generalmente inducono modificazioni più o meno profonde nei prodotti ottenuti rispetto ai materiali di partenza. Anche il grado di

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Introduzione

comminuzione del materiale ha una considerevole influenza sul processo di estrazione. Tutti questi aspetti sono stati affrontati nel corso del periodo di dottorato e descritti nella Parte IB, che ha come oggetto l'estrazione da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP di d-limonene, un metabolita secondario presente in grandi quantità negli oli essenziali estratti dalle bucce degli agrumi.

Parte IA

ESTRAZIONE DI LIPIDI DA MICROALGHE

Capitolo 1

Caratteristiche e applicazioni delle microalghe

1.1 Cenni sulle microalghe

Negli ultimi decenni sono diventati sempre più numerosi gli studi aventi l'obiettivo di mettere in atto strategie innovative per sviluppare processi e tecnologie di produzione di bioprodotto, con un'attenzione crescente nei confronti delle alghe. In Italia, gli studi sulle colture algali massive sono iniziati nel 1956 presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università degli Studi di Firenze diretto dal Prof. Gino Florenzano e sono stati formalizzati nel 1963 con l'istituzione del Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del CNR, di recente confluito nell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE). L'obiettivo era quello di ottenere grandi quantità di proteine da fonti inesauribili (acqua, sali minerali, luce solare) e a basso costo mediante la fotosintesi clorofilliana algale (*Becker, 2007*), ma le speranze di sconfiggere la sottoalimentazione in molte parti del mondo con le microalghe sono state presto deluse e lo sviluppo della biotecnologia delle microalghe è rallentato per tutta la seconda metà del XX secolo (*Tredici, 2006*). L'interesse si è recentemente intensificato grazie alle nuove sfide energetiche e ambientali: l'emergere di tecniche di conversione dell'energia adeguate all'impiego efficiente di biomasse, l'attenzione verso nuove fonti di energia alternative a quelle fossili e la versatilità delle alghe hanno rinnovato gli sforzi della ricerca per quanto riguarda l'impiego di tale risorsa. Negli ultimi anni si è, quindi, assistito a una rinascita di interesse per le microalghe, specialmente in relazione al loro enorme potenziale nel campo delle energie rinnovabili, anche se altre applicazioni quali la depurazione delle acque reflue e la produzione di integratori alimentari, mangimi, chemicals e farmaci sono altrettanto promettenti.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 1 – Caratteristiche e applicazioni delle microalghe

Gli organismi algali sono distinti in macroalghe e microalghe. Le macroalghe o alghe marine sono piante multicellulari che crescono fino a lunghezze di 60 metri in acqua salata o dolce e sono classificate in tre gruppi: alghe brune (*Phaeophyceae*), alghe rosse (*Rhodophyceae*) e alghe verdi (*Chlorophyceae*). Le microalghe sono organismi unicellulari fotosintetici che possono essere filamentosi o presentarsi come fitoplancton, in grado di crescere in acqua sia salata che dolce e classificabili in quattro gruppi principali: diatomee (*Bacillariophyceae*), alghe verdi (*Chlorophyceae*), alghe blu-verdi (*Cyanophyceae*) e alghe dorate (*Chrysophyceae*) (Demirbas & Demirbas, 2011). Le microalghe appartengono a un vasto gruppo di organismi autotrofi che crescono attraverso la fotosintesi e la cui struttura unicellulare permette di convertire facilmente l'energia solare in energia chimica (Harun et al., 2010), che viene immagazzinata sotto forma di oli, carboidrati e proteine (Demirbas MF, 2011), secondo la seguente reazione (Ho et al., 2011), evidenziata anche in Figura 1.1.

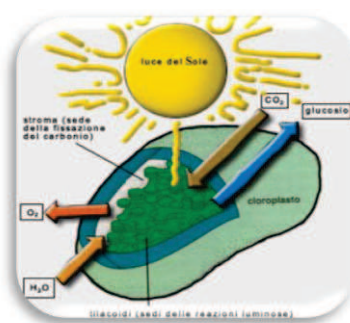


Fig. 1.1 – Processo di fotosintesi clorofilliana in un cloroplasto.

Quindi, le microalghe sono microrganismi fotoautotrofi che convertono la luce solare, l'acqua e l'anidride carbonica in zuccheri per il proprio metabolismo energetico e biosintetico e in ossigeno, quest'ultimo in parte usato con la respirazione e in parte rilasciato nel mezzo esterno. Ciò porta allo sviluppo di biomassa algale (Chisti, 2008) e all'immagazzinamento di lipidi che possono essere estratti e trasformati in biocombustibili (Harun et al., 2010). Nelle condizioni opportune, esse possono raddoppiare la loro biomassa in meno di 24 ore e hanno un enorme contenuto lipidico, frequentemente superiore al 50% (Demirbas MF, 2011).

Il settore dell'algalcoltura è in grande fermento e mostra notevoli potenzialità di sviluppo. Le alghe, infatti, sono oggi molto utilizzate in diversi settori applicativi: dall'alimentare alla

nutraceutica, dall'industria tessile, della carta e del cuoio alla chimica e biochimica, dalla medicina e farmacologia alla produzione di biocombustibili (*Varfolomeev & Wasserman, 2011*).

1.2 Applicazioni delle microalghe nel settore medico-farmaceutico

Le microalghe possono essere impiegate nell'industria farmaceutica per la produzione di prodotti bioattivi ad alto valore aggiunto (antiossidanti, antibiotici e tossine) (*Harun et al., 2010*). Gli studi si sono principalmente orientati sui cianobatteri, chiamati anche alghe azzurre, le cui molecole sono oggi quelle di maggior interesse scientifico per ottenere potenziali candidati farmaci come anti-tumorali, anti-infiammatori, anti-virali e anti-HIV (*Singh et al., 2005*). Dalle microalghe possono essere estratti anche pigmenti come clorofilla e carotenoidi (*Schoefs, 2002; Bai et al., 2011*). Essendo organismi fotosintetici, le microalghe contengono, infatti, la clorofilla che può essere usata in applicazioni farmaceutiche negli unguenti, per il trattamento dell'ulcera, per trattamenti al fegato, per la riparazione delle cellule, per aumentare l'emoglobina nel sangue e per accelerare la crescita cellulare (*Harun et al., 2010*). I carotenoidi, invece, possono essere trasformati nel corpo umano in retinaldeidi, come il beta-carotene; altri carotenoidi, come la luteina, possono proteggere gli occhi dai danni dei raggi ultravioletti oppure essere usati nella prevenzione di malattie come il cancro o cardio-vascolari (*Bai et al., 2011*). Sono ulteriormente estraibili molecole di alto valore, come l'acido γ -linoleico (GLA), arachidonico (AA), eicosapentanoico (EPA) e docosaesanoico (DHA).

Infine, in campo cosmetico l'elevata quantità e varietà di sostanze organiche contenute nelle cellule algali hanno un effetto depurativo e drenante per il corpo (*Caiazza, 2007*). Esistono anche applicazioni nell'ottenimento di prodotti dedicati alla cura dei capelli, alla cura della pelle e alla protezione solare (*Spolaore et al., 2006*).

1.3 Applicazioni delle microalghe nel settore alimentare

Le microalghe sono in grado di generare prodotti organici di varia tipologia, mediante i processi di foto-fissazione: proteine utilizzabili sia per l'alimentazione umana che animale (*Chisti, 2007*) (con un contenuto proteico delle microalghe fino 25 volte superiore a quello del

latte (Caiazza, 2007), vitamine e acidi poli-insaturi (omega 3 e omega 6) utilizzabili come integratori alimentari (Harun et al., 2010), carboidrati utilizzabili mediante fermentazione per la produzione di idrogeno, etanolo e metanolo. Anche la clorofilla estratta dalle microalghe può essere impiegata nel settore alimentare come additivo e come fonte di pigmenti. Confrontate con le piante terrestri, le alghe pur con notevoli differenze tra i diversi gruppi sistematici, appaiono sensibilmente più ricche di proteine, di carboidrati e soprattutto di sali minerali e di oligoelementi, in particolare iodio (presente in quantità da 100 a 1000 volte superiore rispetto a quella degli ortaggi), ferro e calcio (da 2 a 30 volte). Notevole è anche il patrimonio vitaminico. Oltre al discreto contenuto di vitamina A, B1, B2, C, D, E e K (Brown et al., 1999; Becker, 2004), le alghe costituiscono una preziosa fonte della rarissima B12, pressoché assente nei vegetali di terra ferma (Pulz & Gross, 2004; Durmaz, 2007). Un componente particolarmente interessante delle alghe è rappresentato dall'algina, di cui sono particolarmente ricche le alghe brune. L'acido alginico e i suoi sali sono noti per l'elevata capacità di scambio e le proprietà chelanti in grado di eliminare dall'organismo i metalli pesanti e numerose altre sostanze tossiche (Davis et al., 2003; Draget et al., 2005). Quest'ultima proprietà fa delle alghe un alimento indispensabile nella dieta di tutti coloro che sono costretti a vivere in ambienti particolarmente contaminati. Inoltre, la presenza di alginati e fibre insolubili limita l'assorbimento intestinale di grassi e zuccheri, rendendo le alghe efficaci per le diete (Caiazza, 2007).

1.4 Eco-sostenibilità ambientale e microalghe

Un'applicazione delle microalghe di notevole interesse prevede il biofissaggio della CO₂ (Greque de Morais & Vieira Costa, 2007; Wang et al., 2008; Kumar et al., 2010; Sidney et al., 2010; Demirbas A, 2011; Kumar et al., 2011), che è presente con un tenore superiore al 68% nelle emissioni dei cosiddetti gas serra antropogenici (GHG, *Anthropogenic Greenhouse Gases*) responsabili dei cambiamenti climatici globali. Le Nazioni Unite hanno promosso il Protocollo di Kyoto nel 1997, ratificato da 170 Paesi, con l'obiettivo di ridurre le emissioni di GHG. A tale scopo sono state portate avanti numerosissime ricerche e strategie classificabili in tre categorie: approcci basati su una reazione chimica (ad esempio lavaggi con soluzioni alcaline), iniezioni diretta della CO₂ sotto terra o nell'oceano, riduzione della CO₂ per via

biologica mediante una conversione organica. Quest'ultima strategia può essere portata avanti sfruttando la fotosintesi di tutte le piante terrestri e di un enorme numero di microorganismi fotosintetici, anche se le piante contribuiscono solo per il 3-6% alla riduzione delle emissioni globali di anidride carbonica. Le microalghe e i cianobatteri, invece, crescono molto più rapidamente delle piante terrestri e la loro efficienza di fissaggio della CO₂ è 15-50 volte migliore, anche se ci possono essere problemi di inibizione da alte concentrazioni di NO_x e SO_x. Quindi, le microalghe si propongono anche come un'efficiente risposta agli emergenti problemi ambientali, come l'effetto serra (fissando l'anidride carbonica, presente con un tenore del 10-12% nei gas di scarico industriali (*Ho et al., 2011*) o delle centrali elettriche) e l'inquinamento delle acque (fissando l'azoto e assorbendo il fosforo e alcuni metalli pesanti presenti nelle acque reflue) (*Harun et al., 2010*).

1.5 Dalle microalghe ai biocombustibili

Le microalghe possono fornire diversi tipi di combustibili rinnovabili: il metano prodotto dalla digestione anaerobica della biomassa algale, il biodiesel ottenuto dai lipidi delle microalghe, il bioetanolo ottenuto dal processo fermentativo e il bioidrogeno prodotto fotobiologicamente.

Il biodiesel è una delle più promettenti fonti di energia rinnovabile, ottenuto da biomassa rinnovabile mediante la transesterificazione dei tracicilgliceroli. Per la produzione mondiale di biodiesel sono stati scelti diversi lipidi rinnovabili, tra cui oli vegetali, grassi animali e oli di scarto, ma sempre maggiore attenzione è rivolta all'ottenimento di oli da microorganismi. Sostituire tutto il combustibile da trasporto consumato negli USA richiederebbe annualmente 0.53 bilioni di m³ di biodiesel all'attuale velocità di consumo. Le colture oleaginose, gli oli da cucina di scarto e i grassi animali non possono soddisfare realisticamente questa domanda. Per esempio, il soddisfacimento con biodiesel della metà dell'attuale richiesta di combustibili per il trasporto negli USA richiederebbe aree destinate alla coltivazione di piantaggioni oleaginose con estensioni insostenibili, fino a più di 8 volte il territorio degli USA, come evidenziato in Tabella 1.1 (*Chisti, 2007*).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 1 – Caratteristiche e applicazioni delle microalghe

Tab. 1.1 - Confronto tra alcune fonti di biodiesel (riadattata da Chisti, 2007).

Coltura	Resa in olio(L/ha)	Area richiesta (M ha) ^a	% dell'area USA destinata a colture ^a
Mais	172	1540	846
Soia	446	594	326
Colza	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Cocco	2689	99	54
Olio di palma	5950	45	24
Microalghe ^b	136900	2	1.1
Microalghe ^c	58700	4.5	2.5

^a Per soddisfare il 50% della richiesta di combustibile per trasporto richiesto negli USA.

^b 70% olio nella biomassa. ^c 30% olio nella biomassa.

Le microalghe appaiono l'unica fonte rinnovabile di biodiesel in grado di andare incontro alla richiesta globale di combustibili e di sostituire completamente il petro-diesel, senza concorrere con la produzione di cibo, foraggio e altri prodotti derivanti da colture agricole (Chisti, 2007; Chisti, 2008), perché non possono essere usate come fonte di alimentazione per l'uomo e possono crescere in acqua salina e in zone non fertili e inefficienti per l'agricoltura (Demirbas MF, 2011). La produttività media annuale di biomassa microalgale in un sistema di produzione ben progettato e collocato in una zona tropicale può essere di circa 1535 kg m³d⁻¹; con un contenuto medio di olio pari al 30% del peso secco della biomassa, la resa di olio per ettaro è di circa 123 m³ considerando il 90% dell'anno (il restante 10% è assunto non produttivo per le esigenze di manutenzione e pulizia). Questo porta a una resa di biodiesel da microalghe di circa 98.4 m³ per ettaro. Di conseguenza, la produzione di 0.53 bilioni di m³ di biodiesel (per soddisfare la richiesta statunitense di combustibile per trasporto) richiederebbe solo il 3% dell'area coltivabile degli USA. È stato dimostrato che il biodiesel da microalghe è un'alternativa perfino migliore del bioetanolo da canna da zucchero che è il biocombustibile per trasporto attualmente più usato (Chisti, 2008). Inoltre, la produttività in olio di molte microalghe (definita come la massa di olio prodotta per unità di volume di brodo microalgale per giorno) è notevolmente maggiore della produttività delle migliori colture oleaginose (può arrivare ad essere 200 volte maggiore (Demirbas MF, 2011) e dipende dalla velocità di crescita delle alghe e dal contenuto di olio della biomassa (Chisti, 2007).

Capitolo 2

Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe Stato dell'arte

L'estrazione efficiente dei lipidi dalle microalghe rappresenta un fattore determinante per la sostenibilità dei biocarburanti a base di alghe ed è la fase preliminare alla conversione biochimica o termochimica descritta nella successiva Parte II di questa tesi. Vari metodi possono essere applicati ai diversi ceppi di microalghe, in base alle loro dimensioni, forma cellulare e tipo di parete cellulare (*Wang et al., 2012*). Ad esempio, l'estrazione supercritica mediante CO₂ recupera il 25% di olio nel caso della *Nannochloropsis salina* (*Andrich et al., 2005*), il 40% nel caso della *Spirulina arthrospira* (*Mendes et al., 2003*) e il 77.9% nella *Spirulina platensis* (*Andrich et al., 2006*). È, quindi, una sfida importante determinare il metodo di estrazione più efficiente e più economico possibile al fine di ridurre il fabbisogno energetico dell'estrazione stessa. Un'ulteriore sfida è rappresentata dall'esplorazione di alternative, accettabili per l'ambiente e per la salute, agli attuali solventi tossici utilizzati.

Dunque, in questo capitolo saranno passate in rassegna le metodologie di estrazione attuali, ottimizzate nella loro applicazione nel trattamento della biomassa algale. La maggior parte dei metodi più efficienti sono basati sull'utilizzo di appositi solventi organici, eventualmente accoppiati con tecniche di distruzione delle pareti cellulari delle microalghe stesse. Pertanto, è utile suddividere le tecniche di estrazione dei lipidi in due grandi famiglie basate su differenti metodologie:

- metodi meccanici: omogeneizzazione, milling, utilizzo di presse meccaniche, estrazione assistita da ultrasuoni, estrazione assistita da microonde, shock osmotico;
- metodi chimici: estrazione con solvente, estrazione con fluidi supercritici, estrazione per via enzimatica, liquefazione termica.

2.1 Rottura cellulare

2.1.1 Metodi di rottura cellulare

La produzione di biodiesel richiede la distruzione delle cellule microalgali e il conseguente rilascio dei lipidi intracellulari, step da realizzare nel modo più economico possibile evitando l'uso di grandi quantità di solventi organici e massimizzando la quantità del componente desiderato senza il recupero significativo di altri prodotti come DNA e clorofilla. I principali problemi sono legati al fatto che le microalghe hanno una parete cellulare molto elastica e resistente alla rottura. Inoltre, è praticamente impossibile rimuovere dalla biomassa tutta l'acqua proveniente dal terreno di coltura ed essa agisce da lubrificante, ostacolando i processi di rottura delle pareti cellulari.

Schematizzando, le procedure condotte su scala di laboratorio vengono classificate in meccaniche e non meccaniche, come è possibile osservare nello schema proposto in Figura 2.1 (Halim et al., 2012).

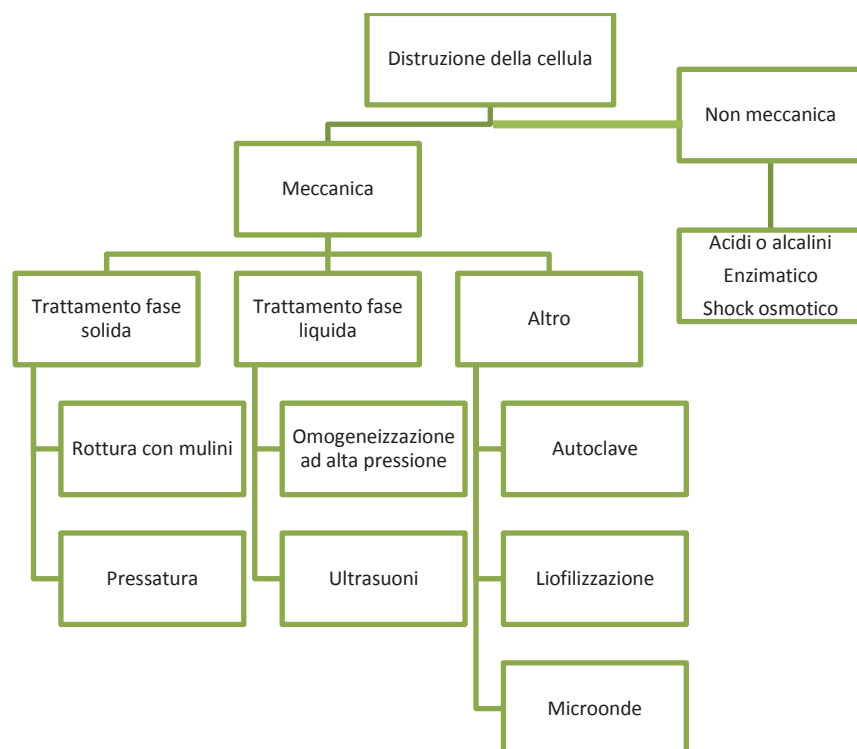


Fig. 2.1 - Tipologie di pretrattamenti su scala di laboratorio (Halim et al., 2012).

Dunque, si può ricorrere a diversi metodi di distruzione delle cellule, come ad esempio il **bead-beating** (determina la rottura meccanica delle cellule grazie a sferette mantenute in movimento ad alta velocità), le **microonde** (frantumano le cellule mediante uno shock indotto da onde ad elevata frequenza) e la **sonicazione** (porta alla rottura sia della parete sia della membrana della cellula mediante l’effetto della cavitazione). Metodi di rottura come la **frizione meccanica** e la **steam explosion** hanno successo solo in presenza di concentrati completamente secchi. È stata valutata anche la possibilità di ricorrere all’**autoclaving** a temperatura e pressione elevate oppure ad altri metodi di rottura non convenzionali che ancora non hanno avuto diffusione dal punto di vista commerciale, come la **lisi enzimatica** e lo **shock osmotico**. Infatti, le alghe possono essere trattate con particolari enzimi che riescono a rompere la parete cellulari e rendere, quindi, l’operazione di estrazione dei lipidi molto agevole. Lo shock osmotico, invece, può essere ottenuto mediante l’aggiunta di NaCl al 10% (w/v) per rompere le pareti cellulari grazie alla pressione osmotica (Amaro *et al.*, 2011). Tuttavia, non esiste un metodo di rottura più efficiente di altri in assoluto, perché tutto dipende dal ceppo di microalga selezionato e dalle caratteristiche della sua parete cellulare.

2.1.2 Rottura delle microalghe. Stato dell’arte

La fase di distruzione delle cellule algali è stata studiata da molti autori e numerose *reviews* sono state prodotte, per quanto riguarda sia la rottura microalgale in generale (Prabakaran & Ravindran, 2011; Halim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012) sia i metodi specifici, descritti di seguito.

Le tecniche di estrazione lipidica che non usano solventi, come ad esempio la pressa meccanica, richiedono che la biomassa sia secca rendendo l’ estrazione ad alta richiesta energetica e poco efficiente (Shen *et al.*, 2009). Quindi, la *pressatura* è efficiente su una biomassa secca e richiede una fase preliminare di asciugatura molto consistente dal punto di vista energetico. Questo metodo sfrutta la pressione per rompere le cellule ed estrarre l’olio, ma, sebbene riesca ad estrarre quasi il 75% dell’olio (percentuale leggermente migliorabile ricorrendo all’utilizzo di solventi chimici), risulta poco efficiente a causa dei lunghi tempi di estrazione. Inoltre, il processo non è molto controllabile e i dispositivi meccanici utilizzati richiedono un buon controllo della rottura delle cellule, che non deve essere:

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe

Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

- ✓ troppo spinta, in modo da evitare un rilascio incondizionato di tutti i prodotti intracellulari, tra cui i detriti cellulari che possono dar luogo ad una denaturazione del prodotto;
- ✓ troppo blanda, per evitare che, nonostante la rottura cellulare, i lipidi immagazzinati all'interno non vengano rilasciati, con conseguente perdita di efficienza del processo.

L'operazione di pressatura è accompagnata da un contemporaneo incremento di temperatura, che in taluni casi può raggiungere anche i 90°C, tanto che alcuni dispositivi di pressatura sono dotati di opportuni sistemi di refrigerazione al fine di non compromettere la qualità dell'olio estratto. La quantità di lipidi che non si è riusciti a tirar fuori con la spremitura a freddo può essere eventualmente recuperata trattando la biomassa pressata con ulteriori processi estrattivi. Inoltre, è bene precisare che le presse non hanno un disegno generalizzabile, in quanto lo sforzo di compressione richiesto dipende soprattutto dalla natura dell'alga da trattare: per tale ragione, oltre alle presse a vite, in commercio sono disponibili anche modelli di pressa a pistone o a espulsore. In letteratura è stato trovato che il processo di estrazione meccanica degli oli dalle alghe mediante pressatura induce un costo di circa 1.8 €/kg di biomassa, quindi non molto competitivo se confrontato con la medesima estrazione di oli da altre biomasse (ad esempio, per l'olio di palma il costo è circa 0.5 €/kg).

Un altro metodo molto promettente ricorre alla rottura cellulare mediante gli *ultrasuoni* (Cravotto *et al.*, 2008; Ranjan *et al.*, 2010; Koberg *et al.*, 2011; Arajuio *et al.*, 2013; Pereira Neto, 2013), in modo da esporre le alghe a un'onda ultrasonica di elevata intensità che crea delle piccole bolle di vuoto intorno alle cellule. Quando le bolle di vuoto raggiungono una certa dimensione nei cicli di alta pressione, esse implodono generando un crollo violento della pressione e dando origine al fenomeno della cavitazione. L'implosione delle bolle genera a sua volta delle pressioni molto elevate che originano dei getti liquidi ad alta velocità che agiscono localmente e inducono delle forze di taglio che sollecitano la parete cellulare tale da romperne meccanicamente la struttura. Quindi, il collasso delle bolle determina un'onda d'urto che distrugge la parete cellulare e causa il rilascio dell'olio in soluzione. Questo metodo è ampiamente usato in laboratorio, ma non sono ancora disponibili informazioni di fattibilità e di costo su larga scala (Harun *et al.*, 2010). Il processo potrebbe essere ulteriormente migliorato mediante l'aggiunta di solventi che agiscono nelle fasi di alta pressione, facilitando il trasferimento dei lipidi dalla cellula nel solvente, cui seguirà una fase

di distillazione che serve a separare gli oli dal solvente. La tecnica degli ultrasuoni è ulteriormente ottimizzabile mediante trattamento enzimatico: la cavitazione aiuta gli enzimi a penetrare all'interno della struttura cellulare migliorando l'estrazione dei lipidi e quindi la resa del processo. Inoltre, gli enzimi hanno la proprietà di poter disgregare più facilmente la parete cellulare. Il problema principale risiede nei costi: l'applicazione di trattamenti enzimatici è comunque più onerosa di un eventuale recupero di esano dagli oli ottenuti mediante spremitura a freddo assistita con solventi chimici.

Le *microonde* rappresentano una fonte di calore senza contatto diretto. Luque de Castro e Garcia-Ayuso (1998) hanno progettato un estrattore Soxhlet a microonde (FMASE), nel quale il solvente nel bulbo veniva riscaldato e fatto evaporare utilizzando due fonti di energia, elettrica e a microonde, accelerando così le performances dell'estrattore. Il FMASE è caratterizzato da un'alta resa nell'estrazione di lipidi da campioni ambientali solidi o prodotti alimentari (Freyburger et al., 1988; Luque-Garcia & Luque de Castro, 2004; Priego-Capote & Luque de Castro, 2005; Viot et al., 2007). Lee et al. (2010) hanno confrontato le prestazioni dei vari metodi di estrazione dei lipidi, includendo le microonde, da tre specie di microalghe: *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus sp.* Essi hanno riportato un contenuto lipidico estratto maggiore quando venivano usate le microonde anziché l'autoclave, il bead-beating, la sonicazione o lo shock osmotico con NaCl al 10% (Lee et al., 2010). Anche Zheng et al. (2011) hanno confrontato diversi metodi di rottura delle cellule di *Chlorella vulgaris* e il trattamento con microonde si è rivelato migliore della sonicazione e di alcuni trattamenti meccanici, ma meno efficiente rispetto alla lisi enzimatica. Balasubramanian et al. (2011) hanno ottenuto l'estrazione di lipidi da microalghe fino al 77% a 95°C impiegando un sistema continuo a microonde e usando esano come solvente. Il pre-trattamento con microonde è stato anche adottato da Dejoye et al. (2011) come stadio preliminare all'estrazione supercritica di lipidi da *Chlorella sorokiniana*.

La *liquefazione termochimica* o idrotermica permette l'estrazione dei lipidi dalla biomassa microalgale in condizioni di alte temperature (fino a 395°C) e pressioni (fino a 1450 psi) in un tempo relativamente alto che può superare i 60 minuti (Minowa et al., 1995; Sawayama et al., 1995; Aresta et al., 2005; Brown et al., 2010). La liquefazione termica avviene in autoclave o in reattori tubolari in acciaio inossidabile (Brown et al., 2010; Shuping et al., 2010; Huang et

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

al., 2011). I rendimenti di bio-olio si attestano tra il 35% e il 65% (in peso). Il metodo si presta poco allo scale-up a causa delle alte temperature e pressioni che condizionano la fattibilità economica del sistema di estrazione.

A conclusione di questo paragrafo sullo stato dell'arte relativo ai diversi metodi di rottura delle microalghe, si riportano in Tabella 2.1 i risultati ottenuti in molti lavori.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell’arte

Tab. 2.1 - Valutazione di diversi metodi di rottura preliminari all’ estrazione con solvente di lipidi da microalghe.

Microalghe	Metodi di rottura esaminati	Metodo di rottura più efficiente: commenti	Solvente estraente	Riferimento bibliografico
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Nannochloropsis oculata</i>	Ultrasuoni	La sonicazione aumenta l’efficienza di estrazione con i solventi studiati.	- Etere di petrolio - Estrazione Soxhlet - Folch - Krienitz & Wirth	<i>Converti et al., 2009</i>
<i>Nannochloropsis</i> <i>Tetraselmis</i>	- Pressione osmotica - Sonicazione: 50 Hz - <i>Bead beating</i> : 500µm, 3200 rpm - <i>Grinding</i> in azoto liquido	Solo il grinding in azoto liquido si è rivelato un metodo di rottura efficiente con il 90-100% di cellule distrutte, anche se non accettabile in larga scala.	Cloroformio-metanolo	<i>Cooney et al., 2009</i>
<i>Scenedesmus dimorphus</i> <i>Chlorella protothecoides</i>	- <i>Bead-beating</i> - French press: 1500 psi - Ultrasuoni - <i>Milling</i> “a umido”	Il metodo di rottura più efficiente è stato il milling su biomassa umida per lo <i>S. dimorphus</i> e il bead-beating per la <i>C. protothecoides</i> .	Esano	<i>Shen et al., 2009</i>
<i>Botryococcus</i> sp. <i>Chlorella vulg.</i> <i>Scenedesmus</i> sp.	- Autoclave: 125°C, 1,5 MPa, 5 min - <i>Bead-beating</i> : diametro 0.1 mm, 2800 rpm, 5min - Microonde: 100°C, 2450 MHz, 5 min - Ultrasuoni: 10 kHz, 5 min - Soluzione 10% NaCl: 1 min con agitazione + 48 h	Le microonde si sono rivelate il metodo più semplice ed efficient per estrarre i lipidi dai ceppi di microalghe testati.	Cloroformio-metanolo (2:1, v/v)	<i>Lee et al., 2010</i>
<i>Scenedesmus</i>	Sonicazione: 20 kHz, 500 W		- Soxhlet con n-esano - Bligh & Dyer - UAE con n-esano - UAE con cloroformio/MeOH	<i>Ranjjan et al., 2010</i>
<i>Chaetoceros gracilis</i> <i>Chaetoceros mulleri</i> <i>Chlorella vulg.</i> <i>Dunaliella</i> sp. <i>Isochrysis</i> sp. <i>Nannochloropsis oculata</i> <i>Tetraselmis</i> sp. <i>Tetraselmis chui</i> <i>Tetraselmis tetrahele</i> <i>Thalassiosira weissflogii</i>	Ultrasuoni: 40 kHz, 80W, 20 min, 25°C		Cloroformio-metanolo (2:1, v/v)	<i>Araujo et al., 2011</i>
<i>Nannochloropsis</i>	- ultrasuoni: 20 kHz, 5 min - microonde: 5 min, potenza 70%; ciclo: 21 s on e 9 s off	Elevata estrazione di lipidi in 5 min con le microonde.	Cloroformio-metanolo (2:1, v/v)	<i>Koberg et al., 2011</i>

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
 Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe

Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

<i>Chlorella sp.</i> <i>Nostoc sp.</i> <i>Tolypothrix sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave: 121°C, 5 min - <i>Bead beating</i>: 3500 rev/min, 5 min - Microonde: 100°C, 2450 MHz, 5 min - Ultrasuoni: 50 Hz, 15 min - Soluzione 10% NaCl: 1 min con agitazione + 48 h 	<p>La sonicazione è il metodo migliore per l'estrazione di lipidi da microalghe in larga scala. <i>Chlorella sp.</i>: microonde e shock osmotico efficienti; autoclave con la minore efficienza tra i metodi di testati. <i>Nostoc sp.</i>: ultrasuoni e microonde con maggiore efficienza, autoclave con la minore efficienza. <i>Tolypothrix sp.</i>: microonde maggiore efficienza, bead beating, shock osmotico e ultrasuoni con efficienze simili.</p>	Cloroformio-metanolo (2:1, v/v)	Prabakaran & Ravindran, 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Grinding</i> con sabbia di quarzo con e senza pre-deidratazione - <i>Grinding</i> in azoto liquido - Ultrasuoni - <i>Bead milling</i> - Lisi enzimatica - Microonde 	<p>Il grinding in azoto liquido si è rivelato il metodo di rottura più efficiente.</p>	Chloroform/methanol 1:1	Zheng et al., 2011
<i>Schizochytrium limacinum</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sonicazione: 2.2 kW, 20 kHz			Gerde et al., 2012
<i>Scenedesmus sp.</i>	Ultrasuoni: 20 Hz, 15-30 min	<p>Il trattamento termico a 80°C si è rivelato più efficiente della sonicazione al fine di produrre metano direttamente dalla biomassa.</p>	/	González-Fernández et al., 2012
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Omo genizzazione ad alta pressione			Samarasinghe et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrasuoni: 40kHz, 29.7 W/L, 2.68 W/m ²	<p>La sonicazione aumenta l'efficienza di estrazione con i solventi studiati.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Bligh & Dyer - Chen et al. - Folch et al. - Hara & Radin - Soxhlet con acetone 	Araujo et al., 2013
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Microonde: 1.2 kW, 2.45 GHz		<ul style="list-style-type: none"> - Biodiesel - Etanolo - Cloroformio 	Iqbal & Theegala, 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	Sonicazione	<p>Efficienza molto alta</p>	Liquidi ionici [Bmim] [MeSO4]	Kim et al., 2013
<i>Nannochloropsis oculata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Microonde: 1025 W, 2.45 GHz - Ultrasuoni: 40 W - Raggi laser: 1064 nm, 10 W, 20 kHz - Termolisi: 90°C per 20 min - <i>Shear</i> meccanico 	<p>La rottura mediante raggi laser non è fattibile in larga scala, mentre le microonde e il trattamento termico potrebbero esserlo. Gli ultrasuoni hanno l'efficienza minore.</p>		McMillan et al., 2013

2.2 Sistemi di estrazione dei lipidi dalle microalghe

Una volta distrutte le cellule, si può procedere all’ estrazione dei lipidi vera e propria, un processo molto costoso da cui dipende la sostenibilità dell’intero processo di produzione del biodiesel dalla biomassa algale. Il metodo di estrazione ideale dovrebbe essere specifico per i lipidi (in modo da minimizzare la co-estrazione di materiali non lipidici) e selettivo solo verso poche frazioni lipidiche, ad esempio lipidi contenenti catene di acidi grassi mono-, di- e trienoici (Amaro *et al.*, 2011). In letteratura (Cooney *et al.*, 2009) è riportata una sintesi completa dei metodi applicabili per l’ estrazione, anche se nella pratica l’ estrazione degli oli avviene molto spesso combinando l’ estrazione con solvente con la rottura cellulare meccanica.

Il metodo più semplice e diretto di estrazione degli oli avviene mediante il cosiddetto processo a singola fase, che non richiede né additivi chimici né l’ utilizzo di macchinari ingombranti. In questa singola fase avviene la separazione delle alghe dal mezzo di coltura, la loro concentrazione e l’ estrazione dei lipidi in un tempo di circa un’ ora. Recentemente, l’ azienda americana OriginOil (www.originoil.com) ha presentato una particolare tecnica di estrazione nota col nome di *single-step oil extraction*, che esegue tre funzioni simultanee (disidratazione, rottura delle cellule ed estrazione dei lipidi) in una singola fase, secondo lo schema di funzionamento illustrato in Figura 2.2.

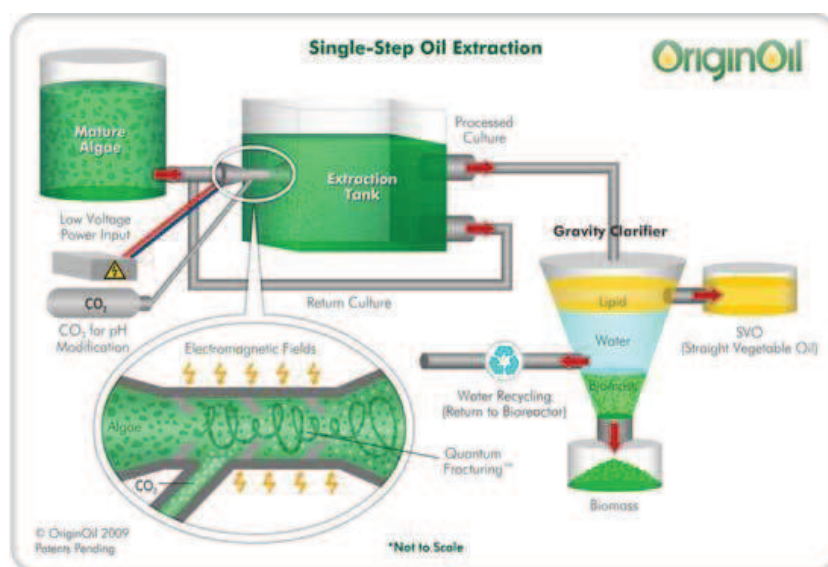


Fig. 2.2 - Originoil Single-Step Oil Extraction (<http://www.oilgae.com/algae/oil/extract/extract.html>).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe

Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

Il processo coinvolge una combinazione di impulsi a ultrasuoni ed elettromagnetici al fine di distruggere le pareti cellulari delle microalghe. Contemporaneamente, una quantità di CO₂ viene iniettata nel recipiente di estrazione per abbassare il pH, facilitando così la separazione della biomassa che si deposita sul fondo e dei lipidi che si trovano sulla superficie (Figura 2.3). Quindi, l'olio è immesso in un chiarificatore a gravità per separare i lipidi, la biomassa residua e l'acqua.

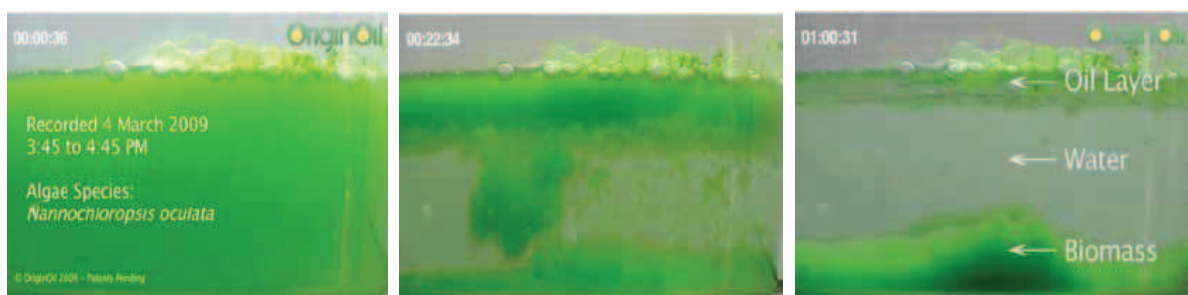


Fig. 2.3 - Stratificazione della biomassa al variare del tempo (www.originoil.com).

Quindi, in questo processo l'estrazione degli oli è ottimizzata combinando pulsazioni magnetiche e variazioni di pH del mezzo di coltura per rendere la parete cellulare delle alghe più fragile. Un metodo pioneristico è quello di impiegare nanoparticelle mesoporose che hanno la proprietà selettiva di attirare e sequestrare esclusivamente acidi grassi liberi e trigliceridi da utilizzare per la produzione di biodiesel.

Un altro processo innovativo è noto con il nome di *cell milking*. L'estrazione di lipidi dalla biomassa algale avviene senza danneggiare le pareti cellulari, usando solventi come il decano e il dodecano (Hejazi et al., 2004; Mojaat et al., 2008) che hanno un'alta idrofobicità e garantiscono l'estrazione dei trigliceridi senza perdita di vitalità. Questa tecnica di estrazione richiede ulteriori indagini per determinare gli effetti a lungo termine di questa *mungitura* sulla vitalità cellulare e sulla produzione di lipidi (Cooney et al., 2009).

2.3 Estrazione con solvente dei lipidi dalle microalghe

2.3.1 Uso di un solvente organico

Il ricorso a un solvente organico (benzene, cicloesano, esano, acetone, cloroformio) permette, dopo la rottura della parete cellulare, la solubilizzazione della frazione lipidica nel solvente stesso, seguita da una distillazione per separare l'olio dal solvente.

Folch et al. (1957) sono stati i primi a sviluppare un metodo classico per l'estrazione quantitativa dei lipidi (Iverson et al., 2001), utilizzando un sistema a base di cloroformio–metanolo–acqua per l'estrazione di lipidi da materiale biologico. Esso prevede un rapporto campione/co-solvente 1:20 (con rapporto cloroformio/metanolo pari a 2:1), seguito da diversi lavaggi dell'estratto grezzo con acqua. Il processo di lavaggio comporta una perdita di lipidi pari all'1%. Il metodo può essere applicato a tessuti contenenti fino all'80% di acqua e utilizza grandi quantità di solvente (Bligh e Dyer, 1959).

Il metodo di Bligh e Dyer (1959) è il metodo di riferimento più citato nella letteratura inerente l'estrazione dei lipidi da materiali biologici (Burja et al., 2007). Si tratta, in sintesi, di una versione modificata del Metodo Folch. Il principale vantaggio deriva dal ridotto rapporto solvente/campione. Si tratta di una tecnica di estrazione da laboratorio, che usa solventi polari e non polari in un sistema ternario monofase di cloroformio-metanolo-acqua. Il metodo prevede la miscelazione del campione e della miscela di solventi per due o tre minuti. Dopo l'estrazione, il sistema è convertito in una soluzione bifasica con aggiunta di cloroformio ed acqua ottenendo uno strato di cloroformio sul fondo contenente i lipidi ed uno strato di metanolo in alto contenente i non-lipidi. Svariate modifiche al metodo sono state riportate in letteratura, compreso l'uso di varie tecniche di disgregazione della parete cellulare mediante ultrasuoni (Dunstan et al., 1992; Burja et al., 2007), di solventi caldi pressurizzati ad alta temperatura (Macnaughton et al., 1997; Lewis et al., 2000) e di campioni liofilizzati (Dunstan et al., 1992). Burja et al. (2007) hanno utilizzato una versione miniaturizzata del metodo di Bligh e Dyer ottenendo un recupero del 47.5% superiore al metodo di Bligh e Dyer classico. Inoltre, Burja et al. (2007) hanno riportato un'efficienza del 73% utilizzando un bagno ad ultrasuoni. Questi ultimi utilizzano notevoli quantità di solvente e, di solito, il campione viene estratto più di una volta per completare il processo di estrazione. Anche Lee et al. (2010)

fanno riferimento al metodo di Bligh e Dyer oppure alla miscela estraente esano/etanolo. Spesso, infatti, si ricorre a una coppia di solventi, come esano/etanolo o esano/isopropanolo, nella quale il solvente più polare distrugge la membrana delle cellule rendendole sufficientemente porose, mentre il co-solvente meno polare è affine ai lipidi e ne “guida” l'estrazione. Il più usato tra i solventi è l'esano per la sua elevata capacità di estrazione e il basso costo (*Harun et al., 2010*), analogamente a quanto avviene nella procedura impiegata per ricavare l'olio dai semi di soia (*Xu et al., 2011*). L'esano è meno efficiente del cloroformio, ma è anche meno tossico, ha un'affinità marginale per le sostanze non lipidiche e apparentemente ha una selettività maggiore nei confronti delle frazioni lipidiche (*Amaro et al., 2011*). Il butanolo risulta molto efficiente per l'estrazione dei lisofosfolipidi, ma evapora più difficilmente e tende ad estrarre più impurezze a causa della sua elevata polarità. Si potrebbe anche usare cloroformio:metanolo (2:1, v/v), ma questo solvente dà problemi ambientali e di sicurezza (*Harun et al., 2010*).

Nell'estrazione con solvente il trasferimento di massa avviene dall'interno verso l'esterno, mentre il trasferimento di calore si verifica dall'esterno verso l'interno. Quando l'estrazione con solvente è assistita da microonde, il trasporto sia di massa che di calore avvengono dall'interno del materiale verso il solvente e l'efficienza di estrazione aumenta con l'aumento di umidità nella biomassa (*Virost et al., 2007*). L'uso di cloroformio ed etanolo come co-solventi nell'estrazione assistita da microonde (MAE), produce circa il 53% in peso secco di lipidi a 120°C, valore comparabile con quello che si ottiene con l'estrazione Soxhlet. A 100°C, invece, il co-solvente estrae circa il 45% in peso secco di lipidi, cioè il 93% del valore del Soxhlet, ma significativamente più basso del valore ottenuto sempre con il MAE ma a 120°C. Ulteriori prove hanno dimostrato il ruolo positivo della temperatura nell'estrazione MAE nell'intervallo 80-120°C rispetto all'estrazione Soxhlet. L'efficienza dell'estrazione MAE scende al 32% a 80°C, temperatura prossima al punto di ebollizione dell'etanolo (78°C). Le concentrazioni di FAMES indicano, allo stesso modo, un'efficienza più alta di cloroformio-etanolo nel MAE a temperature più elevate.

L'estrazione Soxhlet è una classica tecnica di estrazione con solvente usata per estrarre, ad esempio, prodotti farmaceutici da piante e anche da microalghe (*Cheung et al., 1998; Garcia-Ayuso e Luque de Castro, 2001; Krichnavaruk et al., 2008; Balasubramanian et al., 2011;*

Kanda et al., 2013). Nell'estrazione Soxhlet, gli analiti sono estratti alla temperatura di ebollizione del solvente per un tempo di almeno otto ore. L'estrazione Soxhlet è un metodo standard ed è, a tutti gli effetti, il riferimento principale nella valutazione delle prestazioni delle altre tecniche di estrazione, ma ha gli svantaggi di utilizzare grandi quantità di solvente e di portare alla decomposizione termica dei possibili analiti target (*Wang & Weller, 2006*). Le ottimizzazioni di questo metodo riguardano l'uso delle microonde per fornire più velocemente calore al solvente (*Garcia-Ayuso & Luque de Castro, 2001; Luque-Garcia & Luque de Castro, 2004*).

L'estrazione con liquidi pressurizzati (PLE), anche nota con il nome di estrazione accelerata con solvente (ASE), o ancora come estrazione con solvente pressurizzato (PSE), utilizza solventi ad alta temperatura al di sopra del loro punto di ebollizione e ad alta pressione per mantenere il solvente allo stato liquido durante l'estrazione. L'ASE fu proposta inizialmente da Richter et al. (1996) per l'estrazione di sostanze chimiche da campioni ambientali ed è ben nota per la sua alta selettività, i tempi di estrazione brevi e le piccole quantità di solventi organici tossici utilizzati (*Schäfer, 1998; Herrero et al., 2004; Jaime et al., 2005; Rodriguez-Meizoso et al., 2008*). Il campione, posto in una cella di estrazione, viene estratto staticamente, a differenza dell'estrazione Soxhlet dove il solvente fresco viene riciclato in continuo. Herrero et al. (2004) impiegarono questa tecnica per l'estrazione di composti bioattivi dalla microalga *Spirulina platensis* utilizzando l'estrattore ASE-200 della Dionex (Sunnyvale, CA, USA), a una temperatura di 170°C e a una pressione di 1500 psi. I risultati ottenuti hanno permesso di ottenere dei miglioramenti nel recupero dei lipidi ricorrendo a temperature, tempi di estrazione e costanti dielettriche del solvente più elevati. In particolare, le migliori rese sono state ottenute con etanolo a lunghi tempi di estrazione e temperature elevate. L'estrazione con liquidi pressurizzati è stata usata principalmente per l'estrazione di composti bioattivi inclusi β -carotene, antiossidanti e clorofilla (*Denery et al., 2004*), ma non è stato segnalato nell'estrazione di lipidi nella produzione di scale-up dei biocarburanti da microalghe. Una prima ragione risiede nel fatto che il metodo richiede particolari strumenti come l'ASE-200 di Dionex. La seconda ragione è che il raggiungimento e il mantenimento di temperature e pressioni elevate influenzano presumibilmente la fattibilità economica su scala industriale. Il terzo motivo è la riduzione della resa dei composti sensibili al calore ad alte temperature. Inoltre, l'ASE è una tecnica efficace solo per campioni solidi e semi-solidi che

richiedono, quindi, l'essiccazione dei campioni stessi in una misura che può influenzare l'economia della produzione di biocarburanti da microalghe. Tuttavia, l'estrazione su larga scala utilizzando questa tecnica non è stata ancora studiata.

2.3.2 Ricorso ai fluidi supercritici

L'*estrazione supercritica* è molto efficiente e sfrutta elevate pressioni e temperature (*Mendes et al., 1995; Valderrama et al., 2003; Krichnavaruk et al., 2008*) per rompere le cellule, con i vantaggi di non ricorrere a solventi organici tossici e di avere elevate velocità di trasferimento di materia, ma con lo svantaggio di avere costi elevati (*Amaro et al., 2011*). Un fluido nelle condizioni supercritiche assume un comportamento che rispecchia sia le proprietà di un liquido che di un gas. I valori di diffusività sono anche due volte maggiori rispetto a quelle di un liquido, conferendo eccezionali proprietà nei processi di trasferimento di massa. In più i fluidi supercritici hanno la caratteristica di penetrare facilmente i materiali microporosi, come le pareti cellulari delle alghe. In tal caso, facendo interagire il fluido supercritico con le pareti cellulari si può automaticamente ottenerne la rottura e la successiva estrazione di lipidi, fungendo anche da solvente. La combinazione sinergica di densità, viscosità, tensione superficiale, diffusività e dipendenza dalla pressione e temperatura, permette ai fluidi supercritici di avere funzioni di estrazione eccezionali. Tale combinazione va studiata nel dettaglio, perché fortemente dipendente dal tipo di alga da cui si vuole estrarre il biodiesel. Un altro aspetto fondamentale delle estrazioni effettuate mediante fluidi supercritici (SFE) risiede nella capacità di controllare con estrema precisione quale componente estrarre da una matrice complessa (cellula) e quali lasciare all'interno della matrice. Questa "regolazione" si realizza attraverso il controllo preciso di diversi parametri chiave quali innanzitutto la temperatura, poi la pressione, la portata e il tempo di trattamento. Queste eccellenti caratteristiche hanno portato a rendimenti calcolati di estrazione degli oli mediante SFE (*Sahena et al., 2011*) che sono tipicamente maggiori rispetto a quelli realizzati mediante tecniche tradizionali. Non per ultimo è da rilevare l'estrema purezza del prodotto e l'assenza di fasi di decomposizione del materiale che quasi mai si verifica a causa delle temperature di lavorazione relativamente blande. Come fluido supercritico, si ricorre spesso all'anidride carbonica che si comporta come un solvente lipofilo in grado di estrarre soluti non polari. La successiva separazione della CO₂ è semplice e quasi istantanea e non lascia nessun residuo nell'estratto, come

avverrebbe invece impiegando altri solventi organici estraenti. Con l'aggiunta di piccole quantità di co-solventi polari, possono essere estratti anche materiali polari. Diversi ricercatori hanno riportato la loro esperienza nell'estrazione degli oli o di composti bioattivi dalle microalghe (Mendes et al., 2003; Valderrama et al., 2003; Andrich et al., 2005; Aresta et al., 2005; Andrich et al., 2006; Herrero et al., 2006; Krichnavaruk et al., 2008; Sujilata et al., 2008; Kitada et al., 2009; Couto et al., 2010; Cheng et al., 2011; Cardoso et al., 2012).

2.3.3 Estrazione dei lipidi e transesterificazione *in situ*

I costi di estrazione con solvente e conversione dei lipidi possono essere notevolmente ridotti se questi step avvengono in un'unica fase (Haas & Wagner, 2011; Wahlen et al., 2011; Xu & Mi, 2011; Dong et al., 2013). Cartens et al. (1996) hanno condotto la saponificazione diretta della biomassa utilizzando l'esano e l'etanolo insieme al KOH. Gli autori hanno riferito che la saponificazione diretta funziona bene per l'estrazione di lipidi dai tessuti dei pesci, ma non va altrettanto bene quando è applicata alla biomassa microbica. Il metodo è comunque considerato un valido strumento nelle estrazioni in scala di laboratorio. Anche Rodríguez-Ruiz et al. (1998) hanno estratto lipidi da microalghe con transesterificazione diretta, anche se con l'obiettivo di analizzare gli acidi grassi e non di produrre biodiesel. Lewis et al. (2000) hanno realizzato l'estrazione di lipidi *in-situ* (o diretta) a 90°C per 15-120 minuti, seguita dal recupero della frazione degli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES), utilizzando un sistema di solventi bifasico esano-cloroformio (4:1). La transesterificazione diretta, tuttavia, tende a sottovalutare il reale contenuto di acidi grassi della biomassa. Anche Montes D'Oca et al. (2011) hanno studiato l'estrazione e transesterificazione *in situ* a partire da *Chlorella pyrenoidosa*, mentre Ehimen et al. (2010) si sono soffermati sulle variabili che influenzano la transesterificazione *in situ*. La produzione di biodiesel *in situ* assistita da ultrasuoni e microonde è, invece, stata studiata da Koberg et al. (2011) e da Ehimen et al. (2012).

2.4 Confronto tra i diversi metodi di estrazione e studi correnti

I vantaggi e i limiti dei diversi metodi di estrazione degli oli dalla biomassa algale sono riportati in Tabella 2.2 (Pawliszyn, 1993; Sawayama et al., 1995; Guil-Guerrero et al., 2000; Lewis et al., 2000; Macías-Sánchez et al., 2005; Andrich et al., 2006; Burja et al., 2007;

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell’arte

Fajardo et al., 2007; Rodriguez-Meizoso et al., 2008; Widjaja, 2009; Shen et al., 2009; Brown et al., 2010; Harun, 2010; Balasubramanian et al., 2011; Valdez et al., 2011).

Tab. 2.2 - Vantaggi e limiti di diversi metodi di estrazione.

Metodo di estrazione	Efficienza	Vantaggi	Limitazioni
Pressatura	21.2%	Semplice da attuare Assenza di solvente	Processo lento Grande quantità di campione richiesto
Estrazione con solvente	47-80%	Riproducibile Solventi relativamente poco costosi	Solventi infiammabili e/o tossici Recupero del solvente costoso Grande quantità di solvente richiesto
Estrazione supercritica	77.9%	Atossicità Assenza di solvente nei prodotti	Poco efficiente nell’ estrazione quantitativa di analiti polari da matrici solide Alti costi
Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) o microonde (MAE)	21-84%	Ridotto tempo di estrazione Ridotto consumo di solvente Maggiore penetrazione del solvente nella cellula	Alto consumo energetico Scale-up difficile
Liquefazione termochimica	35-65%	Uso di biomassa umida	Alte temperature e pressioni Scale-up difficile
Estrazione con liquidi pressurizzati	40%	Ridotto tempo di estrazione	Alte temperature e pressioni Scale-up difficile Strumentazione specifica
Saponificazione diretta	34-46%	Adatto a scala di laboratorio	Perdita di materiale cellulare
Estrazione con solvente + Saponificazione	60%	Adatto a scala di laboratorio	Perdita di materiale cellulare

Gli studi correnti (*Iqbal & Theegala, 2012*) sono focalizzati sullo sviluppo di un sistema di estrazione dei lipidi dalle microalghe che utilizzi co-solventi meno tossici e relativamente economici, accoppiati con temperature e pressioni di processo elevate. In particolare, la ricerca è rivolta verso i seguenti obiettivi:

- sviluppo e ottimizzazione di un sistema di estrazione di lipidi in continuo (CFLES), che sfrutta la temperatura e la pressione per disgregare le pareti cellulari;
- uso dello stesso biodiesel come solvente di estrazione relativamente sicuro per l’ambiente e per la salute nella tecnica di estrazione basata su microonde (MAE);
- analisi dell’economia del processo in termini di costi di estrazione e consumo energetico.

Il sistema CFLES si è distinto per la sua altissima efficienza sebbene usi solventi tradizionali (cloroformio-metanolo in rapporto 1:2): il sistema impiega la temperatura e la pressione insieme a tecniche di disgregazione cellulare accoppiate con un flusso continuo di co-solvente

attraverso la biomassa. La tecnica basata su CFLES è, quindi, diversa dall’estrazione con liquido pressurizzato (PLE). Nel CFLES la capacità estrattiva del solvente non si esaurisce a causa del flusso continuo di solvente fresco attraverso la biomassa (imitando in tal senso l’estrazione Soxhlet, ma con una velocità maggiore); d’altra parte, la PLE utilizza una ben specifica quantità di solvente in contatto con la biomassa durante l’estrazione. Inoltre, la PLE utilizza valori di temperatura e pressione abbastanza elevati, mentre il CFLES utilizza valori di temperatura più miti.

Gli effetti del solvente sull’ambiente sono ancora sotto esame, poiché i solventi organici comunemente utilizzati per l’estrazione da microalghe, come l’esano, sono noti per i loro effetti tossici sulla salute umana e sull’ecosistema. La natura volatile di questi solventi a bassa temperatura riduce ulteriormente il contatto con gli analiti da estrarre e, quindi, devono essere utilizzate quantità eccessive per assicurare il contatto tra solvente e soluto per un’estrazione efficiente.

Si è esaminata la possibilità di utilizzare un solvente a basso impatto ambientale, come il biodiesel che è rapidamente biodegradabile, non tossico e il suo potere solvente è stato provato con successo in recenti studi (*Hu et al., 2004; Spear et al., 2007; Salehpour et al., 2009; Knothe & Steidley, 2011*). L’uso del biodiesel come co-solvente semplifica notevolmente l’estrazione dei lipidi dal punto di vista della separazione. Inoltre, un tale uso determina un aumento della velocità di transesterificazione (*Lam & Lee, 2010*). Pertanto, il sistema di estrazione con biodiesel come solvente accoppiato con la tecnica di estrazione assistita da microonde può ridurre drasticamente i costi. Tuttavia, una letteratura molto limitata tratta il biodiesel come potenziale solvente. Un co-solvente costituito da biodiesel ed etanolo, contenente il 40% di methyl soyate (BD40), ha fornito risultati comparabili a quelli forniti dal sistema cloroformio-etanolo oppure dall’estrazione Soxhlet.

La costante dielettrica rappresenta una misura relativa della polarità del solvente. L’acqua, essendo una molecola molto polare, ha una costante dielettrica pari a 80.1 a 20°C, mentre il n-esano, essendo una molecola non polare, ha una costante dielettrica di 1.89 a 20°C. Il diesel da idrocarburi e il biodiesel hanno valori di costante dielettrica di 2.2 e 3.35 rispettivamente (*Sorichetti & Romano, 2005; Gonzalez Prieto et al., 2008*). La costante dielettrica per il cloroformio è 4.8. Pertanto, la costante dielettrica del biodiesel è prossima ai valori caratteristici dei solventi tradizionali: ciò indica il biodiesel come una valida alternativa come

solvente al n-esano o al cloroformio nell'estrazione dei lipidi. Tuttavia, a causa della bassa volatilità del biodiesel, il suo potere di penetrazione è basso rispetto al n-esano e al cloroformio. Pertanto, in letteratura si suggerisce di utilizzare biodiesel come co-solvente con un altro solvente polare come l'etanolo.

È evidente che, a causa del suo ruolo primario nell'estrazione, la scelta del solvente adatto svolge un ruolo di fondamentale importanza nell'economia del processo.

2.5 Analisi economica preliminare dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe sulla base dei dati presenti in letteratura

Anche se i risultati dell'estrazione dei lipidi da microalghe su scala di laboratorio sono difficili da estrapolare su scala industriale, l'analisi può comunque aiutare a identificare gli strumenti più adatti che permettano una notevole riduzione dei costi.

A livello produttivo, l'obiettivo principale è quello di coltivare un ceppo microalgale con contenuti lipidici elevati. Tuttavia, tali ceppi risultano essere più sensibili alla contaminazione rispetto ai ceppi con contenuto lipidico basso (*Sheehan et al., 1998; Schenk et al., 2008*). Inoltre, i ceppi con alti contenuti lipidici presentano una crescita rallentata rispetto agli altri (*Sheehan et al., 1998; Pienkos & Darzins, 2009*).

Il recupero rappresenta la fase a più alto livello energetico nella produzione di biocarburanti algali. Infatti, il recupero di cellule microalgali microscopiche sospese in più del 99.9% di acqua costituisce un'importante voce di costo, tanto da contribuire fino al 20-30% ai costi di produzione (*Gudin & Thepenier, 1986; Molina Grima et al., 2003; Pienkos & Darzins, 2009*). L'estrazione dei lipidi dalla biomassa è il successivo processo ad alto livello energetico nella produzione di biofuel algale. I processi di raccolta ed estrazione sono correlati l'un l'altro, nel senso che il primo influenzerà il secondo. Ad esempio, se l'estrazione lipidica viene eseguita tramite spremitura meccanica e successiva estrazione con solvente, la biomassa raccolta nella fase precedente deve essere asciugata significativamente e bisogna considerare che il processo di essiccazione è quello a più alta intensità energetica: l'essiccazione solare non è affidabile a causa delle grandi superfici di essiccazione richieste e a causa del rischio di perdita di lipidi o di altri componenti utili che potrebbero decomporsi in poche ore in presenza di un clima troppo caldo (*Brennan & Owende, 2010*).

Nel caso dell'estrazione tramite CFLES, un contenuto di acqua dell'80% aiuta il processo di estrazione, poiché l'acqua funziona come solvente ad alta temperatura e pressione (*Briones et al., 1990*). L'acqua, in questo caso, viene separata al termine del processo di estrazione e non, quindi, prima dell'estrazione stessa tramite essiccamento termico della biomassa, consentendo il risparmio di notevoli quantità di energia; ad esempio, l'estrazione con solvente accompagnata da spremitura tramite pressa meccanica richiede che la biomassa sia essiccata fino a contenere solo il 10% di umidità: una disidratazione di tal livello incide per circa il 60% sull'intero costo di estrazione! Pertanto, i processi estrattivi basati sulla biomassa secca sono, probabilmente, quelli più antieconomici a causa degli input energetici coinvolti. Alla luce di quanto detto, sono da preferire, certamente, i metodi di estrazione che trattano la biomassa microalgale umida.

La trasformazione dei prodotti estratti rappresenta una fase meno complessa rispetto a quelle di produzione e recupero. Le sfide presenti a tale livello riguardano la rimozione delle impurità, la raffinazione del prodotto finale per lo specifico uso e la creazione della nicchia di mercato per quei prodotti per i quali non esisteva proprio un mercato. Ancora una volta è il processo di estrazione a giocare un ruolo significativo, soprattutto nella destinazione finale dei prodotti ottenuti, in particolare per i prodotti alimentari che possono essere contaminati dall'uso di solventi tossici. La tecnologia in continua evoluzione rende difficile stimare costi attendibili.

La maggior parte degli studi finora pubblicati in letteratura, riguardanti le prestazioni di estrazione di lipidi da microalghe, sono comparati all'estrazione Soxhlet; tale metodo estrattivo, infatti, è molto efficace per impostare un parametro di riferimento per il confronto con altri metodi di estrazione. Sono stati confrontati sia il metodo CFLES sia l'estrazione con microonde, con l'estrazione Soxhlet, in termini di prestazioni ed efficienza. È stato sottolineato il risparmio energetico di solvente e di forza lavoro del CFLES e dell'estrazione con microonde rispetto al Soxhlet. Tuttavia, gli scenari analizzati facevano riferimento a situazioni di laboratorio. Questo confronto non è direttamente applicabile, purtroppo, per l'economia di processo su scala industriale. In letteratura, sono presenti pochi casi di studio in tal senso, ma molto interessante risulta essere il lavoro analizzato da Huang et al. (2012), intrapreso per capire meglio l'economia del processo di estrazione dei lipidi dalle microalghe. Esso copre solo la parte inerente l'estrazione dei lipidi, assumendo che la biomassa sia stata

già raccolta in una massa contenente l’80% di umidità. Un’ulteriore disidratazione, se richiesta, sarà basata sul tipo di estrazione proposta.

Molte variabili sono coinvolte nell’analisi economica della produzione di combustibile da microalghe su larga scala: contenuto di umidità nella biomassa, costo di disidratazione termica, tipo di solvente e quantità utilizzata, costi di riscaldamento del riciclo dei solventi, costo di solvente perduto, costi dell’energia elettrica, gliceridi (TAG) recuperati in base all’efficienza del metodo utilizzato, prezzo di acquisto del solvente. L’economia del processo coinvolge la quantità di energia termica necessaria per la disidratazione, il recupero dei solventi e l’energia elettrica necessaria al funzionamento del sistema di estrazione. In tale analisi economica sono stati confrontati i costi per gallone stimati con le seguenti tecniche e combinazioni di solvente: estrazione con solvente con estrattore meccanico (Sol-Mech.); CFLES con solventi convenzionali (CFLES-CS-100°C); CFLES con miscela di solvente a base di biodiesel ed etanolo (CFLES-BD-100°C); estrazione assistita da microonde con solventi convenzionali (MAE-CS-100°C); estrazione assistita da microonde con solvente a base di biodiesel ed etanolo, in rapporto 2:1 (MAE-BD-100°C); estrazione assistita da microonde con solvente a base di biodiesel (40%) ed etanolo (MAE-BD-120°C). È stato utilizzato il rapporto tra olio estratto e costo per gallone per determinare un criterio basato sulle prestazioni delle tecniche di estrazione lipidica. La Figura 2.4 rappresenta questo rapporto per tutti e sei i casi di estrazione esaminati nel lavoro di Huang et al. (2012). Sulla base di questo rapporto, l’estrazione con solvente mediante estrattore meccanico si trova all’ultimo posto tra le tecniche in esame.

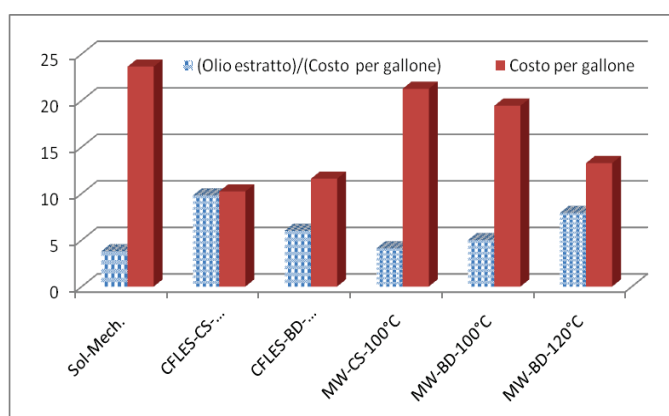


Fig. 2.4 – Rapporto olio estratto/costo per gallone per tutte le sei modalità di estrazione esaminati.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe

Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

L'estrazione con solvente mediante estrattore meccanico (Sol-Mech.) è uno dei più comuni per l'estrazione di olio vegetale, prodotti chimici speciali e prodotti farmaceutici. Esso utilizza una tecnica di estrazione solido/liquido continua, in cui il solvente di estrazione viene accoppiato con un estrattore meccanico. Il solvente di estrazione usato prevalentemente è l'esano, a causa del suo punto di ebollizione basso (68.7°C), dell'alta solubilità di oli e grassi in esso e del prezzo relativamente basso. In Figura 2.5 è rappresentato un esempio di estrattore meccanico a immersione prodotto da Crown Iron Works Company, Minneapolis, MN. Questa apparecchiatura è usata per estrarre sostanze chimiche da prodotti grossolani o granulari (come la soia) che affondano nella vasca contenente il solvente. Sebbene le differenze tra le microscopiche cellule algali e i semi di piante oleaginose richiedano processi diversi per il recupero dei lipidi (*Pienkos & Darzins, 2009*), l'estrazione di olio da alghe secche è più o meno simile a quella di olio dalla soia, entrambe con contenuti solidi di circa il 90% (*Lardon et al., 2009*). L'estrattore utilizza lenti nastri trasportatori che trasportano il materiale da trattare in un bagno di solvente, in controcorrente. L'immersione completa dei solidi assicura un buon contatto con il solvente. I fiocchi di soia nell'estrattore vengono lavati in un primo tempo con una miscela di olio/esano e successivamente con esano puro, producendo una miscela solvente/olio (micella). Il solvente viene fatto poi allontanare dalla micella nella fase successiva (desolventizzazione). Questo estrattore non viene utilizzato per l'estrazione di lipidi dalle alghe. La rottura delle pareti cellulari delle microalghe attraverso l'attrito meccanico è possibile solo quando la massa algale è quasi completamente disidratata. Lo svantaggio dell'estrazione con solvente con estrattore meccanico per l'olio da microalghe, quindi, è che la biomassa deve essere essiccata al 10% di umidità (*Erickson, 1995*), ma ciò determina significativi consumi di energia termica pari a circa 0.627 kWh/kg acqua (*Mohn, 1980; Molina Grima et al., 2003; Murthy, 2011*).

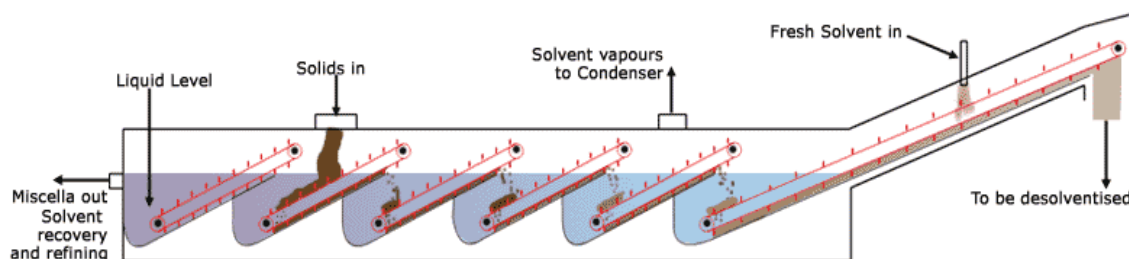


Fig. 2.5 - Estrattore ad immersione solido/liquido continuo prodotto da Crown Iron Works Company, Minneapolis, MN (http://www.crowniron.com/technologies/spx_model4.cfm).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell’arte

Il sistema di estrazione a flusso continuo di lipidi (CFLES) ha un’efficienza del 100% in laboratorio, utilizzando solventi convenzionali. Queste stime sono basate su una miscela costituita da esano ed etanolo nelle proporzioni del 40% e 60% rispettivamente. Il costo di estrazione dei lipidi per gallone con questa tecnica arriva a 10.22 \$ al gallone: esso rappresenta il valore più basso di quelli trovati. Pertanto il CFLES con solventi convenzionali rappresenta la tecnica più efficiente e meno costosa. Il grande vantaggio del CFLES è che la biomassa non deve essere asciugata: il sistema funziona bene anche con il 70% di umidità. Lo svantaggio principale nell’usare biomassa umida risiede nella maggiore quantità di solvente richiesta rispetto all’ estrazione meccanica con solvente.

Il CFLES-BD, utilizzando biodiesel ed etanolo come solventi al posto di esano e metanolo, è una tecnica di estrazione con un certo valore intrinseco in termini di sicurezza ambientale. Le stime sono basate su una miscela costituita da biodiesel ed etanolo nella proporzione 40:60% rispettivamente. Il costo per gallone risulta in questo caso pari a 11.59 \$, un valore più elevato rispetto a quanto ottenuto per il CFLES-CS, ma sempre più basso rispetto al Sol-Mech. I benefici di questa tecnica di estrazione sono i seguenti: non è necessaria la separazione del biodiesel dai lipidi estratti; assenza di costi di riciclo per evaporazione o per perdita di biodiesel, come accade nel caso dei solventi tradizionali; il biodiesel stesso può facilitare la reazione di transesterificazione, se il biodiesel è l’obiettivo finale.

Il sistema MAE è stato utilizzato in una piccola scala pilota per l’ estrazione dell’olio dalla soia (*Terigar et al., 2011*). È stata registrata un’efficienza di estrazione del 93% utilizzando etanolo come solvente. Per l’analisi economica del sistema MAE è stato assunto di elaborare un gallone di biomassa sia in continuo sia in discontinuo con un tempo di ritenzione di 15 minuti. Il costo per gallone per l’ estrazione dei lipidi, usando questa tecnica è pari a 21.26 \$, valore molto prossimo a quello ottenuto con il Sol-Mech.: ciò fa precipitare questa tecnica estrattiva al penultimo posto di questa classifica, seguita soltanto dalla tecnica Sol-Mech. Un altro svantaggio del MAE è rappresentato dai bassi valori di efficienza estrattiva, che si aggira intorno al 60-65% (*Barnard et al., 2007; Moseley & Wooman, 2009*): ciò si ripercuote negativamente sul costo dell’ estrazione. Il grande vantaggio del MAE è che la “pasta” algale raccolta non va essiccata ulteriormente prima del processo di estrazione, evitando in tal modo il costo di essiccamento termico.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

L'estrazione assistita da microonde con solventi costituiti da una miscela di biodiesel ed etanolo, a 100°C (MAE-BD-100°C), è simile alla precedente, ma l'esano è stato sostituito dal biodiesel, il quale agisce come l'esano per creare un sistema bifasico in presenza di acqua. Ciò riduce il costo di estrazione, dai precedenti 21.26 \$ a 19.43 \$ per gallone. È importante sottolineare il fatto che l'efficienza di estrazione non è influenzata in modo significativo dalla sostituzione della frazione di esano con una uguale di biodiesel. Non deve, quindi, sorprendere, se questa tecnica estrattiva si pone nei piani bassi della classifica, posizionandosi al quarto posto, appena al di sopra dell'estrazione MAE con solventi tradizionali.

L'efficienza dell'estrazione assistita da microonde con solventi costituiti da una miscela di biodiesel ed etanolo, a 120°C (MAE-BD-120°C), risulta essere del 100%. Rispetto al caso precedente, MAE-BD-100°C, la percentuale di biodiesel nel solvente è stata aumentata dal 12.5% al 40%. Poiché la perdita e il recupero di solvente sono tra le voci che più incidono sul costo di estrazione dei lipidi, quest'ultimo diminuisce significativamente se si utilizza un volume di solvente più piccolo. Si arriva così a una stima del costo di estrazione per gallone di soli 13.27 \$, ovvero del secondo miglior risultato registrato in questo confronto. Uno svantaggio di tale metodo è rappresentato dalle alte temperature operative: ciò può causare la degradazione di alcune sostanze chimiche termosensibili, anche se è stato visto che gli acidi grassi essenziali come il DHA e l'EPA non sono influenzati significativamente dalla temperatura elevata. Del resto, l'estrazione ad alta temperatura ha un vantaggio importante nel processo di downstream, avendo ridotto il calore richiesto per il recupero del co-solvente (etanolo in questo caso).

Sebbene l'estrazione dell'olio dalle microalghe sia già in uso esteso su scala di laboratorio, non ci sono informazioni sufficienti sulla fattibilità e sui costi di questa operazione su scala commerciale.

Nel corso degli studi è emerso che il principale ostacolo nell'estrazione di lipidi da microalghe è la presenza di acqua. La massima concentrazione di biomassa in un sistema aperto è pari a circa 0.3 g (su base secca) l⁻¹, per cui si tratta di un processo di produzione in cui il 99.7% del volume del reattore è riempito da acqua, che in ogni caso deve essere trattata. La naturale separazione acqua – olio, che i primi ricercatori proposero nel caso in cui le cellule fossero state rotte mediante shock (ad esempio shock osmotico), nella realtà non si verifica perché i lipidi o rimangono attaccati alla biomassa o formano un'emulsione in acqua.

In una certa misura, l’acqua formerà “gusci” di solvente intorno ai lipidi o acidi grassi liberi, inibendo la formazione di micelle più grandi che si sarebbero separate per differenza di gravità, o impedendo al solvente miscibile idrofobo di contattare i lipidi e, quindi, solubilizzarli. I primi studi sull’argomento hanno cercato di by-passare il problema dell’acqua nell’estrazione lipidica, proponendo l’essiccazione della biomassa come processo anteriore all’estrazione stessa (a base di solventi convenzionali), ma queste tecniche non si sono dimostrate adatte su scala commerciale a causa dei requisiti energetici relativamente alti richiesti dall’essiccazione della biomassa, nonché a causa dei costi di distillazione successivi. Tutto ciò ha portato ad un gran numero di tecnologie estrattive sviluppate per lavorare in presenza di acqua, ma, nonostante l’evoluzione degli approcci di estrazione, quasi nessun processo estrattivo è stato sviluppato e messo in atto su scala commerciale.

Dalle stime attuali, purtroppo, il costo per gallone di biodiesel algale è ben al di sopra rispetto al diesel petrolifero. Il rapporto *Algae 2020* ha riportato che gli attuali costi stimati per la produzione di biocarburanti algali sono compresi tra i 9 \$ e i 25 \$ per gallone per la produzione di microalghe in sistemi aperti, e tra i 15 \$ e i 40 \$ per gallone nel caso dei fotobioreattori (Thurmond, 2009; Singh e Gu, 2010). Abbassare i costi di produzione del biodiesel richiede la riduzione del numero di passaggi costosi nella produzione, raccolta, estrazione ed essiccazione delle microalghe (Singh e Gu, 2010).

La letteratura corrente indica che il costo di estrazione dei lipidi è prevalentemente controllato dal costo associato con l’uso di solventi e dell’energia elettrica. La perdita di una frazione dei solventi incide significativamente sulle stime del costo complessivo. Ciò è tanto più vero per l’estrazione CFLES o per la MAE piuttosto che per la Sol-Mech. Infatti, in quest’ultimo caso, il costo dominante è associato con l’essiccazione termica della biomassa. Recuperare i solventi risulta meno dispendioso che disidratare ed essiccare la biomassa. Il consumo energetico per l’essiccazione si aggira intorno a 0.714 kWh kg⁻¹ contro lo 0.129 kWh kg⁻¹ e lo 0.275 kWh kg⁻¹ per il recupero dell’esano e dell’etanolo, rispettivamente. In ogni caso, quindi, ridurre al minimo la perdita di solvente significa diminuire i costi in modo significativo. Sulla base di questi risultati, usare il biodiesel come co-solvente significa evitare il costo della disidratazione termica e quello del recupero e della perdita del solvente.

La letteratura è ricca di altre analisi economiche sulla produzione di biocarburanti algali. Ad esempio, Sun et al. (2011) hanno riportato che il costo stimato di produzione sia compreso tra

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 2 – Rottura cellulare ed estrazione di lipidi da microalghe – Stato dell'arte

1 \$ e 42 \$ per gallone. Analogamente, Lardon et al. (2009) hanno riportato il consumo di energia per l'estrazione a secco e ad umido, trovando che l'estrazione ad umido consuma il 74.4% di energia mentre quella a secco arriva al 93%.

Tutte le analisi riportate sono basate sul solo consumo energetico, non includendo i costi della manodopera o i ritorni associati con altri prodotti biologici derivati dalle alghe. Un'altra analisi significativa dei costi è stata realizzata da Molina Grima et al. (2003), che hanno stimato un costo di produzione e raccolta della biomassa pari al 43%, un costo di estrazione – esterificazione pari al 53% ed un costo di trattamento del prodotto finale pari al 4%. Le stime sono state basate sul processo di estrazione dalla biomassa umida.

Capitolo 3

Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

3.1 Confronto tra diversi metodi di estrazione di lipidi da *Chlorella vulgaris* (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova)



Sulla base della preliminare ricerca bibliografica e dell'analisi economica, è stata programmata una sperimentazione condotta presso il Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari dell'Università degli Studi di Genova. I test sperimentali di estrazione sono stati effettuati sul ceppo microalgale *Chlorella vulgaris* coltivata e, dunque, disponibile in maggiori quantità nel laboratorio citato. È stato, quindi, messo a punto un protocollo sperimentale valido in generale e da applicare anche ad altri ceppi di microalghe. In particolare, sono state condotte delle prove di estrazione con solvente assistite da diversi pre-trattamenti. La metodica messa a punto prevede le seguenti operazioni:

- 1) inoculo della *Chlorella vulgaris* in un opportuno mezzo di coltura e monitoraggio della sua crescita in fotobioreattore, mediante quotidiana analisi spettrofotometrica;
- 2) separazione della biomassa microalgale dal mezzo di coltura mediante centrifugazione (Figura 3.1);

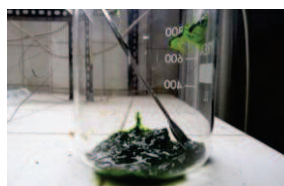


Fig. 3.1 - Biomassa microalgale centrifugata e separata dal terreno di coltura
(Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

- 3) essiccamento a 103°C per 12 ore e valutazione del residuo secco, pari a circa il 95% (Figura 3.2);

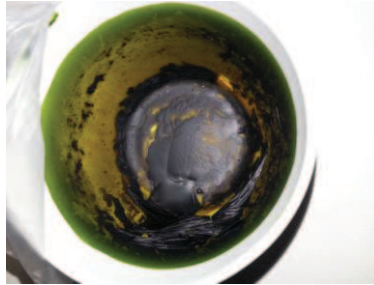


Fig. 3.2 - Biomassa microalgale ottenuta dopo l'essiccamento in stufa a 103°C per 12 ore (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

- 4) triturazione della biomassa secca con un pestello in un mortaio;
- 5) preparazione del sistema di estrazione: posti 0.5 g di microalga secca in un pallone da 100 ml, sono stati aggiunti 50 ml di solvente metanolo/cloroformio 1:2 che garantisce la migliore efficienza (Converti *et al.*, 2009);
- 6) eventuali pre-trattamenti: ultrasuoni per 30 minuti o microonde per 10 minuti;
- 7) estrazione mediante percolazione per 3 ore su una piastra magnetica riscaldante (Figure 3.3 e 3.4);



Fig. 3.3 – 3.4 - Sistema di estrazione con solvente mediante percolazione (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

- 8) separazione della biomassa residua dal solvente mediante filtri (Figura 3.5);

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe



Fig. 3.5 - Separazione della biomassa esausta dopo l'estrazione dal solvente ricco in lipidi (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

- 9) aggiunta di un determinato quantitativo di acqua deionizzata per spostare l'equilibrio tra le fasi e favorire la separazione della fase lipofilica (cloroformio + lipidi estratti) dalla fase idrofilica (metanolo + acqua);
- 10) centrifugazione a 3000 rpm per 2 minuti per favorire la separazione tra le fasi;
- 11) aspirazione dello strato inferiore (cloroformio + lipidi) e rilascio in un crogiolo precedentemente pesato;
- 12) lavaggi della fase idrofilica per recuperare gli eventuali lipidi residui (Figura 3.6);



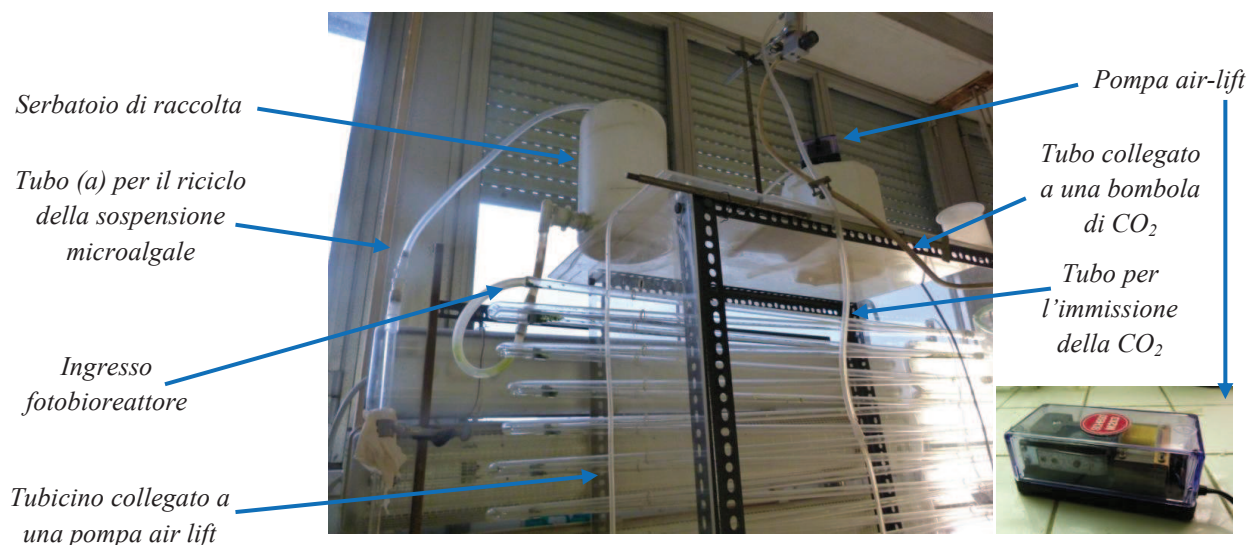
Figura 3.6 - Fase lipofilica: cloroformio + lipidi estratti (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

- 13) evaporazione del cloroformio contenuto nel crogiolo e valutazione della massa dei lipidi residui.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

La crescita della *Chlorella vulgaris* è stata seguita contemporaneamente in due diversi fotobioreattori in piccola scala.

Il fotobioreattore 1 (Figure 3.7, 3.8 e 3.9) è costituito da 20 tubi lunghi circa 1 m e con un diametro di 2 cm, raccordati ad *hairpins* e disposti in modo leggermente obliquo per favorire la caduta del liquido per gravità. Il primo tubo in alto è collegato a un serbatoio di raccolta che funge da recipiente di calma per la sospensione di microalghe. Da questo serbatoio la sospensione scende nei tubi per gravità. L'ultimo tubo in basso è collegato a un tubo in plastica che, attraverso un separatore a T, è collegato ad altri due tubi in plastica: uno (a) viene usato per scaricare/prelevare la sospensione quando il rubinetto in esso posizionato risulta aperto, mentre l'altro (b) ricicla la sospensione fino al serbatoio di raccolta quando il rubinetto in (a) è chiuso. Nel tubicino (b) si innesta un altro tubo collegato a una pompa air lift che manda aria e determina la risalita della sospensione fino al serbatoio di raccolta. Le lampade sono disposte orizzontalmente su un lato.



Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

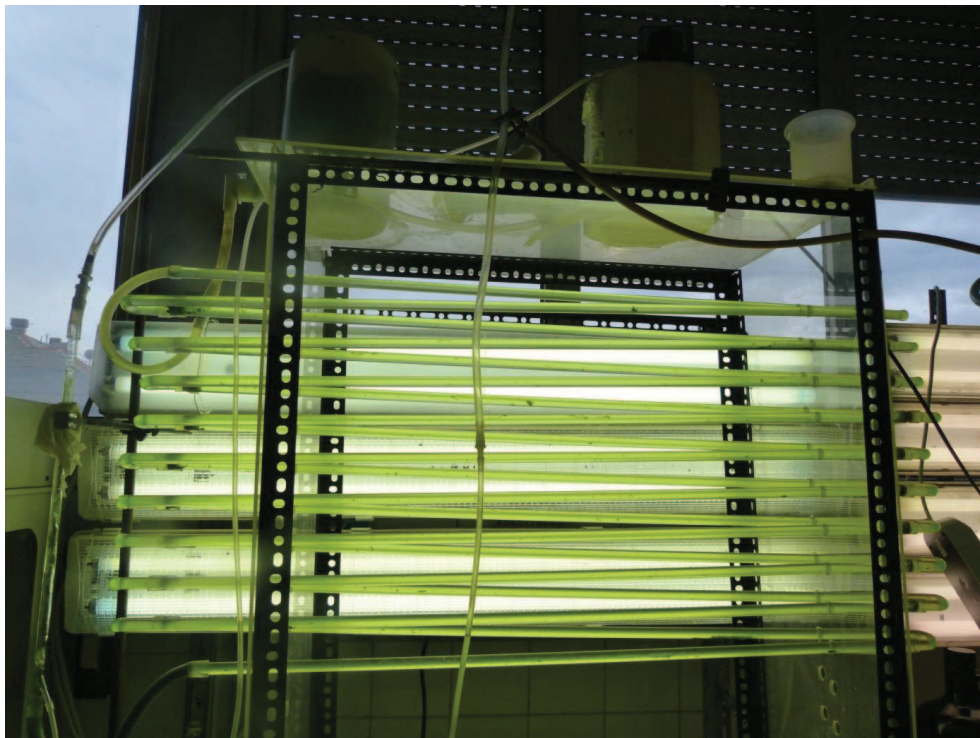
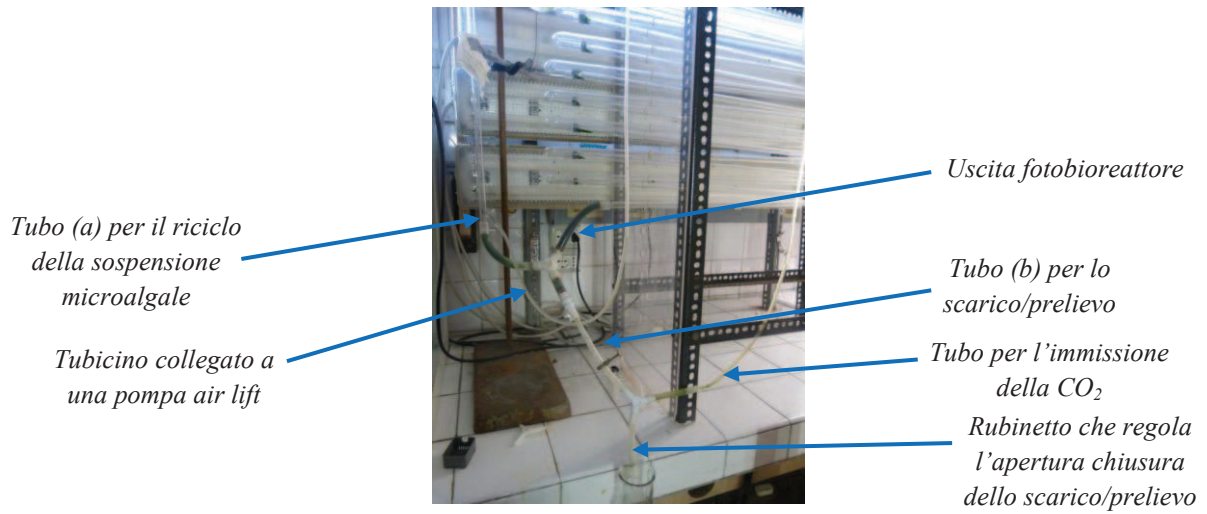


Fig. 3.7 – 3.8 – 3.9 - Fotobioreattore 1
(Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

Il fotobioreattore 2 (Figure 3.10, 3.11 e 3.12) è formato da 40 tubi raccordati tra loro attraverso tubicini in plastica ad U. Le lampade sono posizionate in verticale tra un tubo e l'altro e nella parte esterna ci sono dei fogli bianchi per riflettere la luce.

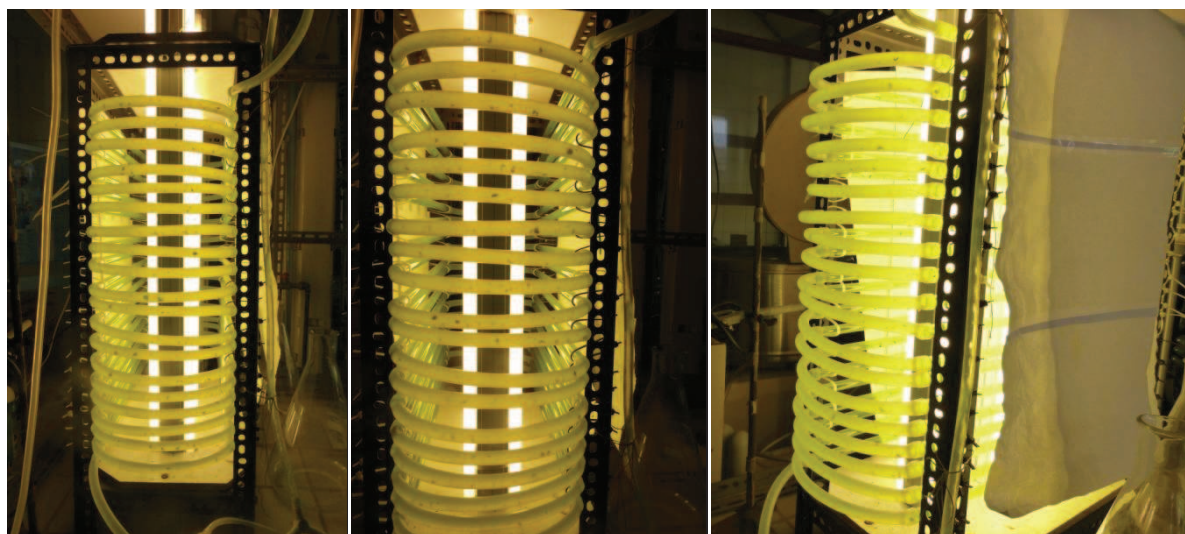


Fig. 3.10 – 3.11 – 3.12 - Fotobioreattore 2
(Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

Durante la crescita è stata insufflata CO₂ con una portata di 2-4 l/h (oltre questo valore non si ha alcun beneficio e si sprecherebbe CO₂). L'alimentazione ottimale di CO₂ su un volume di 6 litri è tra il 2 e il 16%, ma poiché non si registra un sostanziale miglioramento passando dal 2% al 16%, si lavora al 2% per evitare un eccessivo e inutile consumo di CO₂. Da ognuno dei due flussimetri (schema in Figura 3.13) esce un altro tubo destinato uno al “Fotobioreattore 1” e l'altro al “Fotobioreattore 2”. I tubi in uscita dal flussimetro terminano con una pietra con un foro al centro più piccolo del diametro del tubo, in modo da disperdere la CO₂ in bollicine più piccole. Il tubo in uscita dal flussimetro viene immerso direttamente nel recipiente di raccolta in alto.

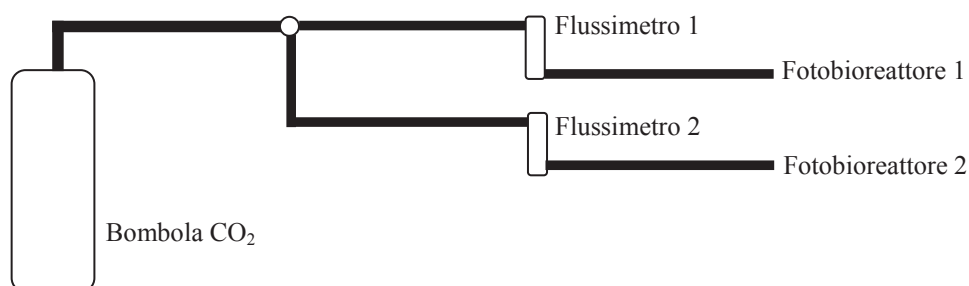
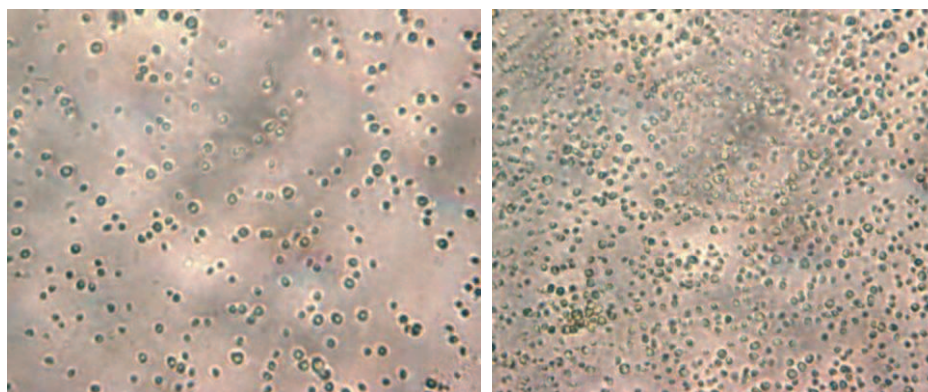


Fig. 3.13 - Schema del sistema di immissione di CO₂.

È stata fatta anche un'analisi al microscopio (*Leica*) della sospensione di entrambi i fotobioreattori, per verificare che non ci fosse contaminazione di altri ceppi (soprattutto *Spirulina*, su cui si fanno dei test nello stesso laboratorio). L'ingrandimento è stato di 40X.

Dalle immagini (Figure 3.14 e 3.15) è evidente l'assenza di contaminazione e la maggiore concentrazione della sospensione nel "Fotobioreattore 2".



Fotobioreattore 1

Fotobioreattore 2

Fig. 3.14 – 3.15 - Analisi al microscopio delle colture microalgali nei due fotobioreattori (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

Dopo 15 giorni sono stati fermati i fotobioreattori e le curve di crescita (temperatura di 18-20°C) sono riportate in Figura 3.16.

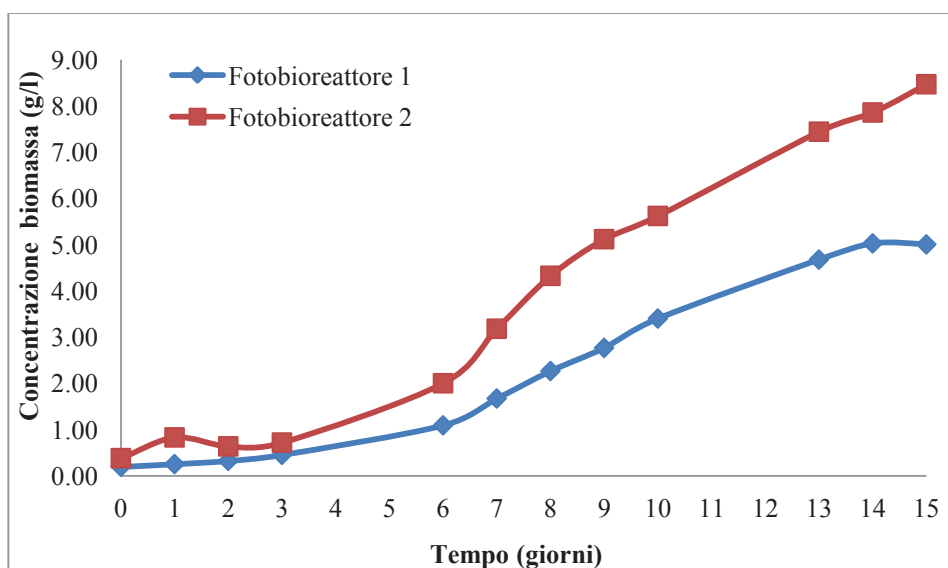


Fig. 3.16 – Crescita cellulare di *Chlorella vulgaris* nei due fotobioreattori (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

La metà del volume presente nel fotobioreattore 1 era stato tenuto da parte e lasciato esposto alla luce in una beuta in agitazione con aria immessa tramite una pompa air-lift, per vedere se le condizioni di stress portassero a un aumento della produzione di lipidi.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

Dopo una settimana si è misurata l'assorbanza della sospensione e si è ottenuto un valore di concentrazione pari a 2.22 g/l. Tale concentrazione è praticamente dimezzata rispetto a quella misurata l'ultimo giorno di funzionamento del fotobioreattore. Questo significa che, in assenza di CO₂, si sta verificando una morte cellulare più rapida della crescita.

Sono state, quindi, condotte le prove di estrazione secondo il protocollo sopra descritto.

I risultati, ottenuti da diverse prove replicate nelle stesse condizioni, sono riportati nella Tabella 3.1, ove vengono sintetizzati i soli valori medi:

Tabella 3.1 - Percentuale di lipidi estratti rispetto alla biomassa secca iniziale con diverse tecniche di estrazione (Laboratorio di Biotecnologie Ambientali e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Genova).

Pre-trattamento	% Lipidi nella biomassa
Nessuno	4.52%
Ultrasuoni	5.37%
Ultrasuoni (su biomassa cresciuta in condizioni di stress nutritivo)	24.81%
Microonde	17.45%

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare che entrambi i pre-trattamenti analizzati hanno portato a un aumento della percentuale di lipidi estratti rispetto alla sola estrazione con solvente. Infatti, senza i pre-trattamenti l'estrazione dei lipidi è dovuta essenzialmente alla penetrazione del solvente nelle cellule microalgali e alla solubilizzazione degli oli che vengono portati in soluzione. I pre-trattamenti (ultrasuoni e microonde), invece, favoriscono la rottura cellulare rendendo disponibile una maggiore quantità di lipidi. In particolare, le microonde hanno un effetto molto più marcato e permettono di recuperare, con la successiva percolazione, una quantità di lipidi pari al 17.45% della massa microalgale usata inizialmente. La sonicazione prima della percolazione, invece, permette di portare in soluzione una quantità di lipidi pari al 5.37% della massa microalgale iniziale. È interessante il rilevante aumento dei lipidi estratti nel momento in cui si ricorre a una biomassa sottoposta a condizioni di stress nutritivo, confermando quanto trovato in letteratura.

3.2 Ottimizzazione dell'estrazione con esano ed etanolo **(Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria)**

Nonostante siano molti i metodi di estrazione proposti e di cui si è largamente discusso precedentemente, la maggior parte di questi sono praticamente inutilizzabili su scala industriale. Inoltre, il basso tenore di lipidi accumulabili dalla *Chlorella sorokiniana* in

condizioni di crescita fototrofa (massimo 18-24%) impone il ricorso a un solvente estraente. La sola pressatura meccanica o una qualsiasi tecnica di rottura cellulare, non porterebbe a un efficiente recupero di lipidi senza l'uso di un solvente che li porti in soluzione. Il *metodo di Bligh e Dyer* è il più usato nei lavori scientifici per la determinazione dei lipidi totali contenuti nella matrice algale di partenza, ma è difficile prevedere un suo utilizzo su larga scala dal momento che ricorre a solventi difficilmente gestibili come il cloroformio e il metanolo. In letteratura sono riportati diversi solventi alternativi, ma la loro efficienza di estrazione dipende fortemente dal ceppo di microalghe di partenza. Una possibile soluzione è rappresentata dall'esano (*Vijayaraghavan & Hemanathan, 2009; Rawat et al., 2013*), un solvente largamente usato a livello industriale per l'estrazione di oli da semi oleaginosi o da altre matrici, come ad esempio la sansa d'oliva (*Wang & Weller, 2006*). L'esano, infatti, è poco costoso (*Harun et al., 2010; Mercer & Armenta, 2011*) e meno tossico rispetto ad altri solventi. Inoltre, sebbene sia meno efficiente del cloroformio, ha una maggiore affinità verso i lipidi non polari (*Pragya et al., 2013*) e, di conseguenza, riduce i successivi step di purificazione se i lipidi non polari sono il prodotto obiettivo del processo.

Il metodo di estrazione con esano mediante Soxhlet è quello maggiormente utilizzato insieme alla classica estrazione con cloroformio/metanolo. Rispetto a tutti gli altri solventi, l'esano ha guadagnato molta popolarità sia per la sua bassa affinità con i componenti non lipidici, sia perché è molto meno costoso (*Pragya et al., 2013*). Inoltre, presenta una temperatura di ebollizione non molto alta (68°C) che lo rende facilmente separabile (*Banerjee et al., 2002*). Inoltre, rispetto alla miscela di solventi, precedentemente citati, è meno tossico. Infatti, fintanto che l'estrazione di questi oli ha come fine ultimo la produzione di biocombustibili, l'aspetto economico può avere un ruolo più importante per cui o si decide di usare un solvente meno costoso, oppure uno più efficiente. Ma dal momento che gli oli delle microalghe possono avere effetti benefici anche in campo farmaceutico, alimentare e cosmetico, in questo caso è fondamentale scegliere un solvente la cui presenza, sebbene minimizzata, possa non arrecare danni alla salute umana. L'esano è, quindi, un valido compromesso tra buone prestazioni, economia e tollerabilità ambientale e umana. Se confrontato con altri solventi come benzene, cicloesano e acetone, la sua efficienza in termini di potere estraente è molto più alta (*Harun et al., 2010*). Tuttavia, l'estrazione con solo esano non sempre risulta una

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

tecnica ottimale nella completa estrazione dei lipidi. Quanto detto fino ad ora è valido per l'estrazione dei lipidi non polari, ma poiché la maggior parte dei lipidi microalgali è di natura polare (Tabella 3.2) si ha la necessità di aumentare le rese anche di questo tipo di oli.

Tab. 3.2 - Composizione dei lipidi nella *Phaeodactylum tricornutum* (Cartens et al., 1996).

Lipidi	Lipidi totali (% peso su biomassa secca)
Neutri	23.3
Polari	76.8
Glicolipidi	49.1
Fosfolipidi	27.7

Per questo motivo si opta per la combinazione dell'esano con un co-solvente polare. Ad esempio il sistema esano/isopropanolo viene impiegato nel campo dei tessuti, mentre quello esano/etanolo presenta una buona capacità solvente nel trattamento delle microalghe (Cartens et al., 1996; Molina Grima et al., 1994). La combinazione dei solventi consente di migliorare le prestazioni in termini di potere estraente, consentendo il recupero dei lipidi sia polari sia non polari. Si è deciso, quindi, di analizzare gli effetti e le rese di estrazione sfruttando come solventi esano, etanolo e una combinazione tra essi. L'etanolo è stato scelto perché, oltre ad aver mostrato una buona capacità nell'estrazione lipidica dalle microalghe, è ancor meno tossico e non presenta effetti dannosi per la salute umana se anche fosse presente in tracce nel prodotto finale.

Lo studio della miscela esano/etanolo deve tener conto degli equilibri e della disposizione in un sistema monobasico o bifasico, secondo il diagramma triangolare mostrato in Figura 3.17.

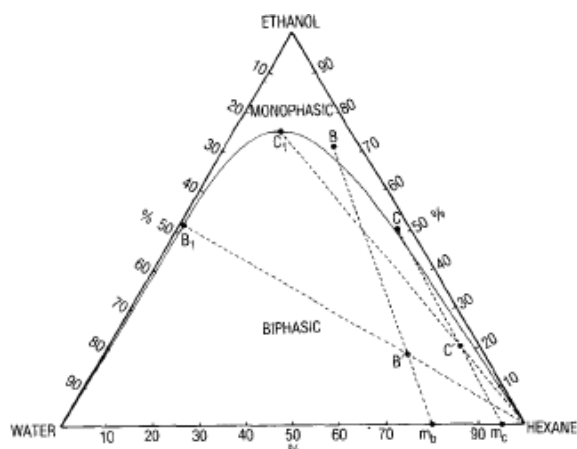


Fig. 3.17 - Diagramma di fase esano/etanolo/acqua (Molina Grima et al., 1994).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

In questo diagramma è possibile osservare come miscele con una determinata composizione in esano ed etanolo si presentano come un sistema monobasico (punto B), ma con la successiva aggiunta di una certa percentuale di acqua ed esano (punto mb), la miscela che si forma tende a stratificarsi dando origine a un sistema bifasico (punto B'). Il vantaggio che ne consegue è che dapprima si agevola l'estrazione poiché si ha la macerazione della matrice algale in un solvente che si presenta in un'unica fase. La stratificazione consentirà il recupero degli oli nella fase non alcolica, mentre la componente non lipidica rimarrà disciolta nella fase acqua e alcol, esattamente come succede con il sistema cloroformio/metanolo (*Molina Grima et al., 1994*).

Alla luce di queste considerazioni, sono state fatte delle prove di estrazione con esano ed etanolo per valutarne l'efficienza su matrice algale. In particolare, le prove di estrazione sono state effettuate sulla biomassa (*Chlorella sorokiniana*) prelevata direttamente dai fotobioreattori nel campo prototipale di Marina di Gioiosa Jonica. Il residuo solido ottenuto è stato poi sottoposto a un processo di co-digestione (Parte IIB).

Al momento del prelievo, la biomassa era sospesa nel terreno di coltura originale con una concentrazione di 0.496 g_{secco}/l, quindi pari a circa lo 0.05% w/w. La biomassa è stata separata dal terreno di coltura mediante centrifugazione a 3500 rpm per 6 minuti e, successivamente, essiccata in stufa a 103°C per 12 ore. La biomassa secca è stata poi tritata finemente e sottoposta ad estrazione solido-liquido.

Preliminarmente, è stato usato cloroformio/metanolo 1:2 come solvente estraente nelle seguenti condizioni: rapporto matrice/solvente 1:100, temperatura 60°C, tempo di estrazione 3 ore. È stato valutato anche l'effetto del pretrattamento di sonicazione (30 minuti) sulla resa di estrazione finale. Nella Tabella 3.1 viene riportato quanto ottenuto a valle delle prove di estrazione condotte con e senza sonicazione. Dai risultati emerge che la sonicazione su questo tipo di alga non migliora di molto le cose e questo era stato già constatato nelle prove condotte precedentemente sulla *Chlorella vulgaris* (paragrafo 3.1). Le rese basse ottenute, però, non devono sorprendere (*Matsukawa et al., 2000*). In condizioni ottimali di coltivazione controllata, terreno ricco di nutrienti, un buon bilanciamento di ore diurne e notturne, clima ideale e temperatura costante, la *Chlorella sorokiniana* presenta un contenuto lipidico pari al 19-20%, per cui il 9% è senza dubbio un buon risultato. Bisogna, però, tener presente che

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

questo tipo di solvente è ideale per la determinazione dei lipidi totali, ma non lo è nella sua implementazione su larga scala. Una precisazione va fatta circa la sonicazione. Avendo constatato la sua limitata efficacia sulla resa finale, si è ritenuto inutile valutare ulteriormente il suo effetto nelle prove successive.

A questo punto ci si è prefissati di trovare un solvente che consentisse il raggiungimento di tali rese ma il cui utilizzo non avesse limitazioni nel passare da scala di laboratorio a impieghi a livello industriale. Come già discusso precedentemente, l'esano mostra caratteristiche interessanti non solo come solvente ma anche perché soddisfa i criteri di sicurezza. È tollerabile una sua piccola percentuale come residuo negli oli estratti e questo garantisce anche la possibilità di utilizzare questi oli per scopi farmaceutici. Le prime prove realizzate utilizzando questo solvente si sono incentrate principalmente sulla ricerca del valore ottimale del rapporto matrice/solvente (M). Da un'analisi bibliografica è emerso che tale valore è pari a 180 (*Energia dalle biomasse.CIRIAF*). Si è valutata, quindi, la possibilità di ottimizzare questo valore e, se possibile, di ridurlo per poter gestire dei volumi più contenuti. Test preliminari hanno dimostrato che l'estrazione a temperatura ambiente e pressione atmosferica è del tutto inefficiente. È necessario, quindi, lavorare a temperature maggiori e in particolare alla temperatura di ebollizione del solvente, la quale non è comunque talmente elevata da portare a una degradazione dei lipidi estratti. In queste condizioni, è necessario corredare il sistema di estrazione con un condensatore che condensi in continuo il solvente man mano che questo evapora e lo immetta nuovamente nel sistema di estrazione in fase liquida. Le prove di estrazione sono state condotte per 5 ore con diversi rapporti matrice secca (espressa in grammi)/solvente (espresso in millilitri) e i risultati sono stati confrontati con una prova di estrazione standard con cloroformio/metanolo 1:2 condotta per 3 ore. Le rese in lipidi, quantificati rispetto alla biomassa secca di partenza, sono riportate nella Tabella 3.3:

Tab. 3.3 - Resa in lipidi al variare del solvente usato e del rapporto matrice/solvente (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Solvente	Pretrattamenti	t _{estrazione}	M (g/ml)	Resa (w/w)
Cloroformio-MeOH	Nessuno	3 h	1:100	9.02 ± 0.13%
Cloroformio-MeOH	Sonicazione 30 min	3 h	1:100	10.69 ± 0.55%
Esano	Nessuno	5 h	1:180	2.82 ± 0.17%
Esano	Nessuno	5 h	1:150	1.96 ± 0.21%
Esano	Nessuno	5 h	1:100	1.59 ± 0.46%
Esano	Nessuno	5 h	1:50	0.94 ± 0.04%

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

È evidente che l'esano è un solvente molto meno efficiente rispetto al cloroformio/metanolo, con cui si raggiunge il 9% di lipidi senza alcun pre-trattamento. Questa quantità di lipidi è in accordo con quanto trovato da Matsukawa et al. (2000), sebbene le condizioni operative siano diverse. Invece, anche con rapporti matrice/solvente più bassi e un tempo di estrazione maggiore, la resa con esano non raggiunge il 3% (w/w) e diminuisce in modo regolare man mano che aumenta il rapporto matrice/solvente. Entrambi gli andamenti possono essere facilmente spiegati e sono supportati dalla letteratura.

In particolare, la resa inferiore ottenuta con esano rispetto al cloroformio/metanolo può essere giustificata dalla diversa polarità dei solventi in gioco. Infatti, la minore efficienza dell'esano è sostanzialmente dovuta all'indice di polarità, che è prossimo allo 0 per l'esano, mentre è più alto per cloroformio (pari a 4.1) e metanolo (pari a 5.1). Tenendo conto del fatto che i lipidi presenti nelle cellule di microalghe possono avere sia natura polare (come i fosfolipidi) sia natura non polare (come i trigliceridi e, in generale, i cosiddetti lipidi neutri), è evidente che il solvente cloroformio/metanolo – essendo costituito sia dal cloroformio meno polare che dal metanolo più polare – riesca ad estrarre entrambi i tipi di lipidi. L'esano, invece, è un solvente non polare e riesce a portare in soluzione solo i lipidi neutri che sono presenti in percentuali molto più basse rispetto ai lipidi polari. Ad esempio, Wan et al. (2012) hanno trovato che in condizioni di crescita fototrofa, la *Chlorella sorokiniana* (ceppo CCTCC M209220) accumula solo il 2.9% di lipidi neutri rispetto ai lipidi totali e solo in condizioni di crescita eterotrofa (con l'aggiunta di glucosio) i lipidi neutri diventano il 60-61% dei lipidi totali.

Tuttavia, non tutti i lipidi prodotti dalle microalghe sono idonei per la produzione di biodiesel. Infatti, solo i lipidi neutri e, in particolar modo i triacilgliceroli (TAG), costituiscono il substrato ideale per la produzione del biocombustibile (Pienkos & Darzins, 2009).

A questo punto sono possibili due modi alternativi di procedere, la cui scelta dipende dalla destinazione finale dei lipidi estratti:

- 1) se l'estrazione è finalizzata all'ottenimento di lipidi da destinare alla produzione di biodiesel, l'esano è il solvente selezionato e, ferme restando le condizioni di crescita fototrofa, si procede cercando di ottimizzare la resa in lipidi usando il minor volume di solvente possibile. Ad esempio, Wan et al. (2012) hanno trovato che in condizioni di crescita fototrofa, la *Chlorella sorokiniana* (ceppo CCTCC M209220) accumula solo il 2.9% di lipidi neutri rispetto ai lipidi totali e solo in condizioni di crescita eterotrofa (con

l'aggiunta di glucosio) i lipidi neutri diventano il 60-61% dei lipidi totali. Il basso tenore di trigliceridi (da transesterificare per ottenere il biodiesel) aumenta in alcune specie di alghe nella fase stazionaria in condizioni di limitazione di azoto, fosforo o silicio (*Rawat et al., 2013*). Di conseguenza, si cercherà di ottimizzare l'estrazione con la riduzione dei volumi ma fondamentale sarà lo step di crescita della biomassa. Fattori su cui si può agire per incrementare l'accumulo di lipidi nella matrice sono il controllo del livello di azoto, l'intensità della luce, la temperatura, la salinità, la concentrazione di biossido di carbonio. Tuttavia, occorre fare una precisazione: garantire un buon accumulo di lipidi nella matrice microalgale non si traduce come alta produttività degli oli stessi, poiché la produttività tiene conto anche del quantitativo di biomassa prodotta. Occorre, quindi, stabilire lo scopo dell'utilizzo delle microalghe e indirizzarsi verso colture dedicate. In particolare, limitando il contenuto di azoto non solo si favorisce il contenuto lipidico ma questi ultimi sono in maggioranza acidi grassi di trigliceridi (TAG), più utili per la conversione in biodiesel (*Brennan et al., 2010*);

2) se l'estrazione è finalizzata all'ottenimento dei lipidi totali (compresi i fosfolipidi) e di altri componenti bioattivi polari (ad esempio antiossidanti) destinati a un mercato diverso da quello dei biocombustibili, allora è necessario accoppiare l'esano con un solvente polare.

1. Come evidenziato in Tabella 3.3, minore è il rapporto matrice/solvente (e quindi maggiore è il volume di solvente usato a parità di matrice da estrarre) e maggiore sarà la resa in lipidi, che passa dallo 0.94% (rapporto matrice solvente 1:50) al 2.82% (rapporto matrice/solvente 1:180). Quindi, a parità di quantità di biomassa secca, è necessario un aumento del volume di esano del 260% per avere un aumento della resa del 200%. Bisogna tenere in considerazione che questa estrazione è stata portata avanti in condizioni batch per 5 ore.

La resa in lipidi potrebbe essere aumentata rimuovendo il solvente con l'estratto e alimentando solvente fresco in continuo. In tal modo, la biomassa è sempre a contatto con solvente fresco, la forza spingente che promuove l'estrazione è maggiore e le rese dovrebbero essere più alte. A tal fine, sono state fatte delle prove con esano in rapporto matrice/solvente 1:50 (w/v) e, anziché avere un unico ciclo di estrazione della durata di 5 ore, sono stati fatti 5 cicli di estrazione ciascuno della durata di 1 ora. Alla fine di ogni ora, il solvente con i lipidi estratti è stato rimosso ed è stato sostituito con solvente fresco per il successivo ciclo di

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

estrazione della durata di 1 ora. Il solvente rimosso alla fine di ogni ciclo è stato poi recuperato mediante un evaporatore rotante e sono stati quantificati i lipidi estratti. La prova è stata ripetuta 4 volte e la resa complessiva in lipidi dopo i 5 cicli di estrazione è risultata pari al $2.23 \pm 0.47\%$. È evidente che 5 cicli di estrazione da 1 ora con rapporto matrice/solvente 1:50 portano a una resa molto più alta di quella ottenuta con un ciclo di estrazione da 5 ore sempre con un rapporto matrice/solvente 1:50 e paragonabile alla resa ottenuta con un ciclo da 5 ore e rapporto 1:180, come mostrato in Tabella 3.4.

Tab. 3.4 - Confronto tra la resa in lipidi ottenuta in un unico ciclo di estrazione e la resa in lipidi ottenuta in 5 cicli di estrazione a parità di tempo di estrazione totale (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Solvente	Numero di cicli	t _{estrazione ciclo}	t _{estrazione totale}	M (g/ml)	Resa (w/w)
Esano	1	5 h	5 h	1:180	$2.82 \pm 0.17\%$
Esano	1	5 h	5 h	1:50	$0.94 \pm 0.04\%$
Esano	5	1 h	5 h	1:50	$2.23 \pm 0.47\%$

In tal modo, si possono ottenere le stesse rese nello stesso tempo con un volume minore di solvente in gioco e, di conseguenza, in apparecchiature più piccole. Minore è la durata di ogni ciclo, più l'estrazione sarà approssimabile a un processo continuo. Inoltre, si è osservato che dopo il quarto ciclo di estrazione (e quindi 4 ore totali), l'apporto di solvente fresco non aumenta ulteriormente la resa. Questo significa, che tutti i lipidi "estraibili" mediante esano possono essere estratti dopo 4 cicli di un'ora ciascuno e un ulteriore ciclo con solvente fresco sarebbe superfluo non portando a un significativo aumento della resa in lipidi. La resa in lipidi neutri non può essere migliorata ulteriormente e non raggiunge, quindi, mai il 3% con la biomassa di partenza usata.

2. L'aggiunta di un solvente polare porterebbe all'estrazione anche di tutti i lipidi e di altri composti polari presenti nella biomassa di partenza. Per questo motivo, sono state fatte delle prove per valutare se l'accoppiamento dell'esano con un solvente polare potesse spingere la resa di estrazione fino a valori confrontabili con quelli ottenuti con cloroformio/metanolo. In particolare, è stato necessario selezionare il co-solvente più opportuno tenendo conto della sua capacità di rompere i legami a idrogeno o le forze elettrostatiche tra i lipidi legati alle membrane e le proteine nelle membrane cellulari. Inoltre, il solvente deve avere una polarità più simile possibile a quella dei lipidi che vogliono essere estratti (Cooney *et al.*, 2009).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

Nel nostro caso, possibili co-solventi dell'esano sono il metanolo, l'etanolo e l'isopropanolo. Il metanolo, però, presenta problemi di tossicità maggiori (Molina Grima et al., 1994), per cui le prove sono state fatte con etanolo come co-solvente. L'etanolo è un emergente solvente "green", grazie alla sua bassa tossicità e alla possibilità di ottenerlo da fonti rinnovabili come canna da zucchero o materiale lignocellulosico. Il sistema estraente esano/etanolo è stato già testato da Molina Grima et al. (1994) sulla microalga *Isochrysis galbana* e da Cartens et al. (1996) sulla microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Tuttavia, tale sistema non risulta essere mai stato testato sul genere *Chlorella* e a maggior ragione sulla *Chlorella sorokiniana*. Poiché l'efficienza di un solvente dipende fortemente dal ceppo di microalga di partenza, si è deciso di testare questo sistema sulla biomassa proveniente dall'impianto di Marina di Gioiosa Jonica. Quindi, nel nostro caso, il solvente estraente usato è stato esano/etanolo in rapporto 1:2.5 (v/v). Anche in questo caso la biomassa è stata centrifugata, essiccata in stufa a 103°C per 12 ore e finemente tritata in un mortaio con un pestello. L'estrazione è stata portata avanti alla temperatura di ebollizione del solvente per 4 ore e con un rapporto matrice solvente pari a 1:76 (w/v), come suggerito da Molina Grima et al. (1994). I risultati hanno dimostrato che quando l'esano non polare è accoppiato con un solvente polare come l'etanolo la resa aumenta di molto, come mostrato in Tabella 3.5.

Tab. 3.5 - Confronto tra la resa in lipidi ottenuta in un unico ciclo di estrazione con esano/etanolo 1:2.5 a diversi tempi e diversi rapporti matrice/solvente M (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Solvente	Numero di cicli	t _{estrazione ciclo}	t _{estrazione totale}	M (g/ml)	Resa (w/w)
Esano-EtOH (96%) 1:2.5	1	4 h	4 h	1:76	7.03 ± 0.29%
Esano-EtOH (96%) 1:2.5	1	5 h	5 h	1:100	9.23 ± 0.85%
Esano-EtOH (96%) 1:2.5	1	3 h	3 h	1:100	8.17 ± 1.4%

Verificato che il solvente estraente esano-etanolo porta a una resa più alta nelle condizioni suggerite dalla letteratura (rapporto matrice/solvente pari a 1:76 per 4 ore), sono state condotte ulteriori prove a un diverso rapporto matrice/solvente e a diversi tempi di estrazione. In particolare, è stato scelto un rapporto M pari a 1:100 in modo da poter fare un immediato confronto con la resa ottenuta usando esano e cloroformio/metanolo 1:2. Dal confronto – evidenziato nella seguente Figura 3.18 – emerge che a parità di M (1:100) e di tempo di estrazione (pari a 3 ore), il sistema esano-etanolo porta a una resa in lipidi estratti prossima a quella ottenuta con cloroformio-metanolo. Invece, la resa ottenuta con il sistema

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

esano/etanolo è molto più alta di quella ottenuta con il solo esano a parità di M (1:100) e tempo di estrazione (5 ore).

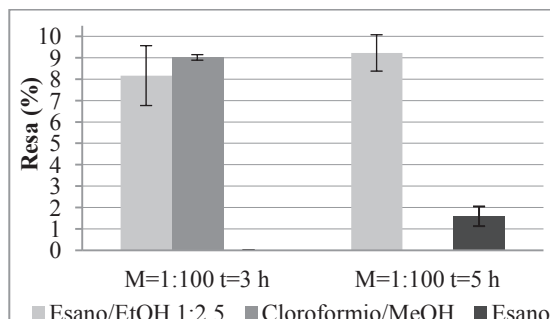


Fig. 3.18 - Confronto tra il sistema estraente esano/etanolo con il sistema cloroformio/metanolo e il solo esano (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Infine, sono stati svolte prove con il solo etanolo come solvente estraente, come già studiato anche da Wang & Wang (2012). L'etanolo, infatti, ha un indice di polarità pari a 5.2, quindi maggiore sia del cloroformio (4.1) sia del metanolo (5.1). I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 3.6 ed evidenziano come l'etanolo sia un solvente più efficiente della coppia esano/etanolo (Figura 3.19). Infatti, in questo secondo caso la presenza dell'esano abbassa la polarità del sistema rispetto all'etanolo puro ed evidentemente nella nostra microalga *Chlorella sorokiniana* la gran parte dei lipidi è nella forma polare. Di conseguenza, un solvente come l'etanolo risulta più efficiente su tali lipidi.

Tab. 3.6 - Risultati ottenuti con etanolo come solvente estraente (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Solvente	Numero di cicli	t _{estrazione ciclo}	t _{estrazione totale}	M (g/ml)	Resa (w/w)
EtOH (96%)	1	2 h	2 h	1:100	7.18 ± 0.45%
EtOH (96%)	1	3 h	3 h	1:100	8.46 ± 0.78%
EtOH (96%)	1	5 h	5 h	1:100	9.96 ± 0.98%

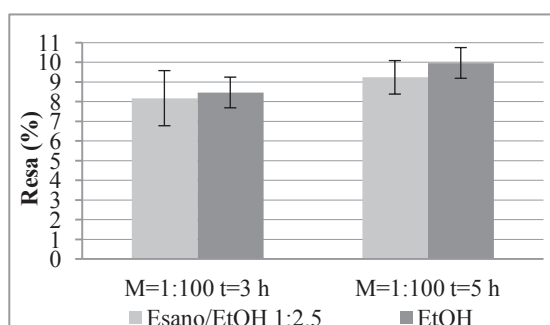


Fig. 3.19 - Confronto tra il sistema estraente esano/etanolo con il solo etanolo (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Anche Molina Grima et al. (1994) trovarono che l'etanolo dava una resa leggermente superiore al sistema esano/etanolo relativamente alla microalga *Isochrysis galbana*.

Considerando un tempo di estrazione di 2 ore, è stata valutata la possibilità di condurre sia un'unica estrazione con rapporto matrice/solvente pari a 1:100, sia una prova che prevede due cicli da un'ora con rapporto matrice/solvente pari a 1:50. Il risultato riportato in Figura 3.20 pone l'accento sull'importanza di garantire una buona forza spingente per migliorare l'estrazione.

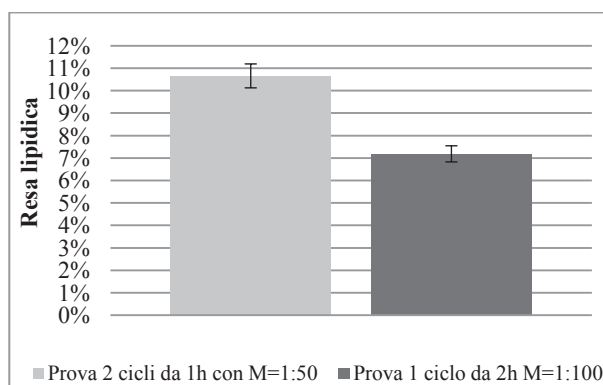


Fig. 3.20 - Confronto tra le rese ottenute mediante estrazione con etanolo (96%) con un ciclo da 2 ore e con 2 cicli da 1 ora ciascuno. La percentuale lipidica è espressa in %wt rispetto alla biomassa secca caricata (Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie, Università della Calabria).

Il quantitativo di solvente utilizzato in una prova e nell'altra è sempre lo stesso, ciò che cambia è che, mentre nella prova a 2 ore il gradiente di concentrazione con il progredire della diffusione va via via diminuendo, in quella a 2 cicli il fatto di aggiungere solvente fresco consente di poter mantenere elevata la forza spingente e quindi favorire la diffusione dei lipidi in un bulk liquido in cui la concentrazione degli oli è molto bassa.

Un'ultima prova è stata effettuata estraendo i lipidi in due step con due solventi diversi. Inizialmente, la matrice solida è stata sottoposta a estrazione con etanolo (96%) per 2 ore (rapporto matrice/solvente 1:100). Terminata l'estrazione, la biomassa è stata separata dal solvente arricchito di lipidi e su essa è stata avviata una seconda estrazione per 2 ore con esano (rapporto matrice/solvente 1:100). Le rese sono in accordo con quanto osservato con le prove precedenti e i due solventi, combinati insieme, creano una sorta di rallentamento che penalizza anche se di poco la resa.

A parità di tempo di estrazione e di rapporto di alimentazione (M) il solvente migliore tra quelli analizzati è l'etanolo (96%) che mostra rese molto prossime a quello che è stato definito, all'inizio di questo paragrafo, il solvente più efficace. Ma la scelta dell'abbinare i due solventi nasce dalla necessità di voler recuperare entrambe le tipologie lipidiche. Come già detto precedentemente, l'esano, sebbene mostri rese molto ridotte rispetto a tutti gli altri solventi, è l'unico che garantisce il recupero dei lipidi non polari importanti per la produzione di biodiesel. Fatte queste considerazioni, sebbene queste rese non siano soddisfacenti, le prove condotte hanno confermato la validità di operare con più cicli e nell'ottica di un'ulteriore ottimizzazione si potrebbe fare in modo di riutilizzare il solvente, recuperato dalla separazione con gli oli, nelle successive estrazioni.

3.3 Estrazione con “green solvents” di lipidi da *Chlorella sorokiniana* **(Laboratorio *Process Engineering for Sustainable Systems*, KU Leuven, Belgio)**

3.3.1 Termodinamica dell'estrazione con solvente

Il più comune metodo di estrazione è quello solido-liquido mediante solventi organici, caratterizzato sostanzialmente da due step. Il primo step consiste nella diffusione del solvente nel soluto sino a raggiungere una condizione di equilibrio, per cui la concentrazione di oli all'interno della matrice solida è identica a quella nel bulk liquido. Il secondo step è la separazione del solvente dalla massa solida. Esso presenta come punti cruciali l'analisi delle caratteristiche lipidiche della biomassa algale nonché la scelta del solvente. Quest'ultimo deve possedere, soprattutto quando si ha l'obiettivo di convertire gli oli in biodiesel, un'elevata specificità nei confronti dei lipidi in modo da non trascinare con sé proteine e carboidrati che sono di per sé dei contaminanti (*Medina et al., 1998*). Naturalmente, appurato il fatto che i lipidi possono essere sia polari che apolari, si procede a scegliere un solvente che sia polare o apolare. Procedendo con l'estrazione mediante solvente apolare (cloroformio, n-esano), tale processo potrebbe essere schematizzato in cinque fasi (Figura 3.21): dapprima il solvente penetra attraverso la membrana cellulare nel citoplasma (fase 1), interagisce con i lipidi neutri creando forze simili a quelle di van der Waals (fase 2), si forma un complesso solvente/lipidi (fase 3), quest'ultimo viene guidato, mediante la realizzazione di un gradiente

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

di concentrazione, a diffondere nella membrana cellulare (fase 4), ed infine si riversa nel bulk liquido (fase 5).

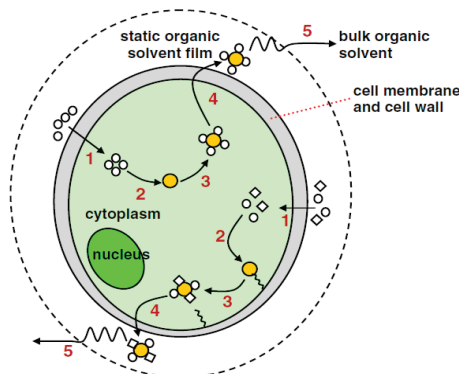


Fig. 3.21 - Meccanismo di estrazione con solvente (Halim et al., 2012).

Tuttavia, i lipidi neutri possono formare dei complessi con i lipidi polari i quali, a loro volta, instaurano legami a idrogeno con le proteine della membrana cellulare. Da qui la necessità di utilizzare un solvente polare (metanolo, etanolo, isopropanolo) che, recupera i residui lipidici interrompendo i legami con le proteine, essendo questi particolarmente indesiderati (Medina et al., 1998). Il processo è identico a quello descritto prima e differisce solo nella fase 3 in cui, anziché esserci un solo solvente che agisce, è presente anche quello polare che forma legami a idrogeno con i lipidi polari.

L'estrazione con solvente dei lipidi dalla biomassa è un processo in cui l'analita bersaglio è trasferito da una fase (ad esempio, una fase solida nel caso della biomassa secca e una fase liquida acquosa nel caso della biomassa umida) a una seconda fase immiscibile (ad esempio, un alcool come il metanolo o un alogenuro alchile come il cloroformio). In altre parole, le molecole di analita (in questo caso i lipidi) devono dissolversi nel solvente e formare una soluzione:



La solubilità dell'analita nel solvente è regolata dall'energia libera di Gibbs del processo di dissoluzione che è direttamente collegata alla costante di equilibrio che regola la concentrazione di analita in entrambe le fasi (Mead et al., 1986):

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{\text{Analita}_{\text{fase del solvente}} * \text{Solvente}_{\text{fase del solvente}}}{\text{Analita}_{\text{fase dell'analita}} * \text{Solvente}_{\text{fase dell'analita}}} = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Quanto più analita si dissolverà nel solvente, tanto più il logaritmo del quoziente diventerà positivo e, quindi, l'energia libera di Gibbs per questa reazione sarà negativa: ciò sarà indice del fatto che la reazione procede favorevolmente verso l'analita che si dissolve nel solvente. Appena l'analita si sarà dissolto completamente nel solvente, il quoziente del logaritmo tenderà a infinito e l'equilibrio sarà completamente spostato verso destra: le molecole di analita bersaglio (cioè i lipidi) saranno completamente estratti nella fase del solvente. La solubilità dell'analita bersaglio in vari solventi è governata da due parametri indipendenti: l'entalpia di mescolamento ΔH^0 e l'entropia di miscelazione ΔS^0 . La solubilità dell'analita nel solvente è, così, favorita quando il processo di dissoluzione cede energia (cioè $\Delta H^0 < 0$) e/o quando il processo di dissoluzione aumenta l'entropia (cioè $\Delta S^0 > 0$). Pertanto, il cambiamento favorevole di uno di questi due parametri potrebbe (come non potrebbe) compensare la variazione sfavorevole dell'altro (Mead *et al.*, 1986; Reichardt, 1988). Il modo con cui la molecola di analita interagisce chimicamente con il solvente selezionato, dirà se la variazione di entalpia sarà positiva o negativa, se la variazione di entropia sarà positiva o negativa e se la loro somma produrrà una energia libera di Gibbs favorevole. La somma globale di questi due termini è definita dal contributo relativo totale di tutte le forze intermolecolari esistenti tra le molecole di analita e di solvente: forze elettrostatiche, forze di London e legami a idrogeno (Mead *et al.*, 1986). Di conseguenza, lo sviluppo di un qualsiasi processo di estrazione con solvente deve comprendere una scelta di solvente (o miscela con co-solvente) che produca un insieme di interazioni chimiche tra le molecole di analita e solvente che sia più favorevole rispetto alle interazioni chimiche tra le molecole di solvente stesse (cioè auto-associazione) e tra l'analita e la matrice con cui era già associato. Come regola generale, gli analiti che si associano fortemente si dissolvono facilmente in solventi forti, mentre gli analiti debolmente associati si dissolvono meglio in solventi deboli. In altre parole, i soluti polari si dissolveranno in solventi polari, mentre i soluti non polari si dissolveranno meglio in solventi non polari.

È noto a tutti che la logica con cui si sceglie un solvente tiene conto del fatto che il simile scioglie il simile, per cui solventi protici (polari) hanno un'affinità maggiore verso i composti

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

che si solubilizzano in acqua, mentre quelli aprotici (non polari) sono più affini a composti idrofobi. Da un punto di vista prettamente termodinamico, tra i tanti parametri presi in considerazione per la scelta del solvente ottimale (indice di polarità, valore di Kauri-butanolo, solubilità di Hildebrand), quello più accettato è l'indice di solubilità di *Hansen* (HSP) (*Hansen, 2007*). Questo indice prevede che un determinato soluto si scioglie in un certo solvente se la loro energia di interazione è equivalente. Si parte dalla definizione di energia totale di coesione (E) ove si portano in conto il grado di dispersione atomico o meglio di van der Waals (E_D), le interazioni dipolari molecolari (E_P) e i legami a idrogeno (E_H).

$$E = E_D + E_P + E_H$$

Dividendo tutti i membri per il volume molare V si ottengono i seguenti parametri:

$$\frac{E}{V} = \delta^2 \text{ (Solubilità totale di Hildebrand)}$$

$$\frac{E_D}{V} = \delta_D^2 \text{ (Parametro di dispersione di Hansen)}$$

$$\frac{E_P}{V} = \delta_P^2 \text{ (Parametro dipolare di Hansen)}$$

$$\frac{E_H}{V} = \delta_H^2 \text{ (Parametro dei legami a idrogeno di Hansen)}$$

Tutti i parametri hanno la dimensione di $\text{MPa}^{1/2}$. Graficamente questi parametri possono essere proiettati in una struttura detta sfera di solubilità con raggio R_0 . I solventi ottimali si posizionano all'interno della sfera mentre quelli non buoni rimangono fuori da questa sfera.

La distanza del solvente rispetto il centro della sfera (R_a) si può calcolare come:

$$R_a^2 = 4 (\delta_{Ds} - \delta_{Dp})^2 + (\delta_{Ps} - \delta_{Pp})^2 + (\delta_{Hs} - \delta_{Hp})^2$$

Identificando con il pedice s il solvente e p il soluto. Il rapporto tra i due raggi è noto come *Relative Energy Difference* (RED):

$$RED = \frac{R_a}{R_0}$$

Quindi, se tale rapporto è minore dell'unità allora la capacità del solvente è molto buona. Tutti questi calcoli sono validi anche per miscele di solventi: basta tener presente che è necessario considerare il contributo di ogni singolo solvente

$$\delta_{i,mix} = \sum_{j=1}^{n\ solv} \varphi_j \delta_{ij}$$

dove φ_j è la frazione volumetrica del solvente i -esimo nella miscela (Hansen, 2007).

3.3.2 Estrazione con solventi “green”

Vista l'attenzione sempre crescente agli effetti negativi di molti solventi sulla salute dell'uomo, sulla sicurezza nei luoghi di lavoro e sull'ambiente, è stata considerata la possibilità di ricorrere a solventi alternativi a quelli tradizionali, sicuri per l'uomo e con un basso impatto ambientale, secondo i principi dell'emergente *green chemistry* (Anastas & Warner, 1998; Clarck, 1999; Anastas & Kirchhoff, 2002; Warner et al., 2004; Horváth & Anastas, 2007; Manley et al., 2007; Anastas & Eghbali, 2009; Dunn, 2011). Molti approcci *green* prevedono il ricorso a sistemi *free-solvent*, ma se l'uso di solventi organici liquidi è inevitabile, allora è necessario almeno sostituire i tradizionali solventi (per lo più di origine petrolchimica) con “nuovi” solventi meno pericolosi (Sherman et al., 1998; Nelson, 2003; Sheldon, 2005; Alfonsi et al., 2007; Clark & Tavener, 2007). In quest'ottica, sono stati testati diversi solventi per estrarre i lipidi dalle microalghe (*Chlorella sorokiniana*) coltivate nell'impianto di Marina di Gioiosa Jonica. In particolare, sono stati scelti i solventi che più si avvicinano – in termini di polarità e di parametri di solubilità di Hansen – al sistema cloroformio/metanolo (usato come riferimento in gran parte della letteratura sull'estrazione totale dei lipidi dalle microalghe) e all'esano (impiegato come solvente tradizionale anche negli impianti in grande scala per estrarre oli da semi oleaginosi e matrici vegetali). Nello specifico, sono stati selezionati i seguenti solventi: etanolo, D-limonene, i cui indici di polarità, parametri di Hansen e livelli di impatto ambientale sono riportati in Tabella 3.7. È evidente che l'etanolo, pur presentando un indice di polarità e i parametri di Hansen molto simili a quelli del metanolo, presenta un minore impatto ambientale ed è incluso nella lista dei solventi *green* (Alfonsi et al., 2008), per cui può essere usato come solvente estraente

alternativo. Il butanolo e il propanolo, invece, hanno un indice di polarità più basso confrontabile con quello del cloroformio, pur avendo un minore impatto ambientale rispetto al metanolo e al cloroformio. Per le prove sperimentali è stato selezionato il normal-propanolo perché presenta lo stesso impatto ambientale del n-butanolo e dell'i-propanolo, ma ha un valore di solubilità totale più alto e, quindi, più vicino a quello del metanolo. Anche gli esteri acetati hanno un basso impatto ambientale, ma hanno un indice di polarità simile a quello del cloroformio e parametri di solubilità intermedi tra quelli di un alcol e quelli del cloroformio. Infine, il D-limonene e l'etil lattato sono solventi emergenti dei quali non sono disponibili i livelli di impatto ambientale. Essi hanno polarità e parametri di Hansen confrontabili con quelli dell'esano e dell'acetonitrile, rispettivamente.

Tab. 3.7 – Indice di polarità e parametri di Hansen di diversi solventi estraenti.

Solvente	Indice di polarità	Parametri di Hansen [MPa ^{1/2}]				Impatto ambientale		
		δ_D	δ_P	δ_H	δ_{totale}	Aria	Acqua	Smaltimento
Metanolo	5.1	15.1	12.3	22.3	29.6	6	3	6
Cloroformio	4.1	17.8	3.1	5.7	19.0	7	7	6
Esano	0	14.9	0	0	0	5	8	1
Etanolo	5.2	15.8	8.8	19.4	26.5	5	1	6
n-Butanolo	4	16.0	5.7	15.8	23.2	5	5	3
n-Propanolo	4	16.0	6.8	16.4	24.6	6	2	6
i-Propanolo	3.9	15.8	6.1	16.4	23.6	6	2	6
Etil acetato	4.4	15.8	5.3	7.2	18.1	6	4	4
Isobutil acetato	3.9	15.8	3.7	6.3	17.4	5	2	2
Etil lattato	~ 5.8	15.0	7.6	21.0	21.0	/	/	/
D-limonene	~ 0	16.4	0.2	0.2	16.4	/	/	/

3.3.3 Sperimentazione in laboratorio



Le prove di estrazione sono state condotte tutte mediante percolazione con un rapporto matrice/solvente 1:100 per 3 ore a 60°C, che è la temperatura alla quale inizia l'ebollizione del sistema cloroformio-metanolo. In aggiunta, alcune estrazioni sono state condotte anche alla temperatura di ebollizione del solvente testato. I valori di resa percentuale, in termini di rapporto tra la masse di estratto e quella di microalghe secche alimentate, sono riportati in Tabella 3.8.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

Tab. 3.8 – Rese di estrazione con diversi solventi e a diverse temperature (KU Leuven, Belgio).

Solvente	Temperatura (°C)	Resa (w/w)
Cloroformio/Metanolo 1:2	60	11.65 ± 0.34%
Esano	60	1.28 ± 0.08%
Esano	68	1.37 ± 0.36%
Etanolo	60	5.19 ± 0.53%
Etanolo	78	8.55 ± 0.81%
Etil acetato	60	2.21 ± 0.86%
Etil acetato	77	2.19 ± 0.28%
Isobutil acetato	60	2.33 ± 0.45%
Etil lattato	60	3.94 ± 0.52%
D-limonene	60	/
Etanolo/n-Propanolo 1:1	60	4.65 ± 1.48%
Etanolo/Etil lattato 1:1	60	6.87 ± 1.30%
Etanolo/Etil lattato 1:2	60	5.57 ± 1.39%
Etanolo/Etil lattato 2:1	60	4.95 ± 0.89%
Etanolo/Etil acetato 1:1	60	5.34 ± 0.53%
Etanolo/Etil acetato 2:1	60	5.68 ± 0.01%
Etanolo/Isobutil acetato 1:1	60	4.18 ± 0.58%
Etanolo/Isobutil acetato 2:1	60	4.55 ± 1.13%

Un'analisi qualitativa dell'estratto sarebbe a questo punto fondamentale per valutare l'applicabilità di un certo solvente, sebbene tutti presentino rese praticamente dimezzate rispetto al sistema cloroformio-metanolo a parità di temperatura (60°C).

In ogni caso, il sistema etanolo/etil lattato 1:1 ha presentato una resa maggiore rispetto agli altri *green solvents*. Con questo sistema si è cercato, quindi, di aumentare la resa mediante più cicli di estrazione. Nello specifico, sono stati testati 4 sistemi:

- 5 cicli di estrazione da 1 ora ciascuno; in ogni ciclo è stato usato un rapporto matrice/solvente 1:100, per cui il sovente usato complessivamente è maggiore di quello usato in un unico ciclo da 3 ore (Tabella 3.9);
- 4 cicli di estrazione da 3 ore ciascuno; quindi, dopo la prima estrazione condotta per 3 ore, la matrice residua è stata sottoposta a ulteriori 3 cicli di estrazione, ciascuno con un rapporto matrice/solvente 1:100 (Tabella 3.10);
- 3 cicli di estrazione da 1 ora ciascuno, ma con un rapporto matrice/solvente complessivo pari a 1:100 (uguale a quello usato per l'estrazione in un unico ciclo da 3 ore); pertanto in ogni ciclo di estrazione è stato usato un rapporto matrice/solvente pari a 1:33 (Tabella 3.11);
- 2 cicli di estrazione da 1.5 ore ciascuno, ma con un rapporto matrice/solvente complessivo pari a 1:100 (uguale a quello usato per l'estrazione in un unico ciclo da 3 ore); pertanto in ogni ciclo di estrazione è stato usato un rapporto matrice/solvente pari a 1:50 (Tabella 3.12).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
 Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

Tab. 3.9 - Rese di estrazione ottenute con 5 cicli da 1 h ciascuno (KU Leuven, Belgio).

Solvente	Ciclo	t _{estrazione ciclo} (h)	M (g/ml)	Resa (w/w)	Resa (w/w) t _{tot} =1 h; M _{tot} =1:100	Resa (w/w) t _{tot} =2 h; M _{tot} =1:200	Resa (w/w) t _{tot} =3 h; M _{tot} =1:300	Resa (w/w) t _{tot} =4 h; M _{tot} =1:400	Resa (w/w) t _{tot} =1 h; M _{tot} =1:100
Etanolo/ Et. lattato 1:1	1°	1	1:100	5.61%	5.61%	7.31%	9.06%	10.77%	11.35%
	2°	1	1:100	1.70%					
	3°	1	1:100	1.75%					
	4°	1	1:100	1.71%					
	5°	1	1:100	0.58%					

Dai risultati mostrati in Tabella 3.9, si può osservare come si riesce a raggiungere la stessa resa percentuale ottenuta con il sistema cloroformio/metanolo ma solo dopo 5 ore e usando una quantità di solvente complessiva 5 volte maggiore.

Tab. 3.10 - Rese di estrazione ottenute con 4 cicli da 3 h ciascuno (KU Leuven, Belgio).

Solvente	Ciclo	t _{estrazione ciclo} (h)	M (g/ml)	Resa (w/w)	Resa (w/w) t _{tot} =3 h; M _{tot} =1:100	Resa (w/w) t _{tot} =6 h; M _{tot} =1:200	Resa (w/w) t _{tot} =9 h; M _{tot} =1:300	Resa (w/w) t _{tot} =12 h; M _{tot} =1:400
Etanolo/ Et. lattato 1:1	1°	3	1:100	6.21%	6.21%	7.22%	8.04%	9.34%
	2°	3	1:100	1.01%				
	3°	3	1:100	1.82%				
	4°	3	1:100	1.30%				

I risultati mostrati in Tabella 3.10 evidenziano che i cicli da 3 ore non sono efficienti, perché la resa ottenuta dopo 12 ore è ancora inferiore rispetto al sistema che prevede cicli da 1 ora.

Tab. 3.11 - Rese di estrazione ottenute con 3 cicli da 1 h ciascuno (KU Leuven, Belgio).

Solvente	Ciclo	t _{estrazione ciclo} (h)	M (g/ml)	Resa (w/w)	Resa (w/w) t _{tot} =1 h; M _{tot} =1:33	Resa (w/w) t _{tot} =2 h; M _{tot} =1:66	Resa (w/w) t _{tot} =3 h; M _{tot} =1:100
Etanolo/ Et. lattato 1:1	1°	1	1:33	1.80%	1.80%	2.49%	3.10%
	2°	1	1:33	0.69%			
	3°	1	1:34	0.61%			

Tab. 3.12 - Rese di estrazione ottenute con 3 cicli da 1 h ciascuno (KU Leuven, Belgio).

Solvente	Ciclo	t _{estrazione ciclo} (h)	M (g/ml)	Resa (w/w)	Resa (w/w) t _{tot} =1.5 h; M _{tot} =1:50	Resa (w/w) t _{tot} =1.5 h; M _{tot} =1:100
Etanolo/ Et. lattato 1:1	1°	1.5	1:50	4.18%	4.18%	5.72%
	2°	1.5	1:50	1.54%		

Le rese mostrate nelle Tabelle 3.11 e 3.12 sono molto importanti perché da esse si evince che un rapporto matrice/solvente minore di 1:100 non è sufficiente ad avere un'estrazione efficiente dei lipidi dalla matrice microalgale. Infatti, sebbene il tempo totale sia pari a 3 ore e il rapporto matrice/solvente sia pari a 1:100, la resa ottenuta con un unico ciclo è maggiore di quella ottenuta con 2 o 3 cicli a rapporto matrice/solvente ridotto. Quindi, nonostante il

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 3 – Studio sperimentale dell'estrazione dei lipidi dalle microalghe

ricorso a più cicli di estrazione porti in generale a un aumento della forza spingente, è necessario avere un rapporto matrice/solvente pari a 1:100.

Capitolo 4

Progettazione dell'estrattore pilota

4.1 Calcoli preliminari

Le prove condotte nel laboratorio sono state necessarie al fine di definire i rapporti ottimali da utilizzare nonché le tempistiche inerenti all'estrazione vera e propria. Un primo elemento importante è legato ai rapporti di alimentazione. Si è visto, infatti, che operando per 5 ore con un rapporto M pari a 1:100, utilizzando uno dei solventi proposti nel capitolo precedente, la resa lipidica è abbastanza buona. Il valore ottimale è stato registrato con la miscela di solventi esano/etanolo. Dunque, per avere un'idea della produttività, se si assume di dover trattare complessivamente 1 kg di biomassa secca sono necessari 100 litri di solvente e dopo un ciclo estrattivo di 5 ore si recupererebbero 22.8 g di oli e circa 977.2 g di biomassa secca. È evidente la difficoltà di realizzazione di un sistema di questo tipo non solo per le dimensioni che comunque sono proibitive ma soprattutto per la difficoltà che si incorrerebbe nella separazione del solvente ricco di oli dalla biomassa secca. Basti anche pensare che gli estrattori Soxhlet sono in genere dimensionati per capacità da 100/250/500 ml, ideale quindi per lavori di laboratorio ma non su grande scala. Con un volume fissato di 500 ml di solvente e un valore di M pari a 1:100, la quantità di biomassa secca da trattare è pari a:

$$massa\ alghe_{secca}[g] = \frac{V_{solv} [ml]}{M} = \frac{500\ ml}{100\ ml/g} = 5\ g$$

Per estrarre lipidi da 1 kg di biomassa secca è necessario un numero di estrazioni pari a:

$$n_{estrazioni} = \frac{massa\ TOT}{massa\ STEP} = \frac{1000\ g}{5\ g} = 200$$

Il tempo di estrazione totale sarà, quindi, pari a:

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 4 – Progettazione dell'estrattore pilota

$$t_{TOT} = n_{estrazioni} * t_{singola\ estrazione} = 1000\ h$$

A questo punto, stimando una giornata lavorativa di 8 ore, è possibile realizzare una sola estrazione al giorno, per cui saranno necessari circa 7 mesi. È, quindi, evidente l'improponibilità di tale sistema su trattamenti più ampi per recuperare soltanto 22.8 g di olio.

Se si riducesse il tempo di estrazione a 3 ore così da realizzare due prove in un giorno i 22.8 grammi di olio si recupererebbero in 3 mesi e mezzo. Si tratta comunque di valori alti.

Le stesse prestazioni si possono raggiungere se, ad esempio, si realizza un'estrazione questa volta però dividendola in due step con M pari a 1:50 e un tempo di estrazione di 3 ore:

$$massa\ alghe_{secca}[g] = \frac{V_{solv}\ [ml]}{M} = 10\ g$$

$$n_{estrazioni} = \frac{massa\ TOT}{massa\ STEP} = 100$$

Poiché in un giorno è possibile realizzare 2 prove, complessivamente saranno necessari 50 giorni per realizzare il trattamento di 1 kg di alghe totali.

Ciò che emerge da questi semplici calcoli è la necessità di dover disporre di sistemi con capacità più alte oppure, per ridurre i tempi di estrazione, fare in modo di realizzarla in più cicli, per cui i punti importanti sono:

- la necessità di adottare la tecnica che prevede più cicli di estrazione;
- l'inadeguatezza di estrattori Soxhlet se si ha la necessità di trattare quantitativi superiori ai 700g/mese.

Per avere un'idea su quando sia conveniente optare per l'utilizzo di un estrattore Soxhlet, rielaborando le previsioni è stato impostato un banale calcolo circa i volumi necessari al variare del quantitativo di biomassa (Figura 4.1) e della biomassa complessivamente trattata (Figura 4.2). Sulla base di queste idee si è cercato quindi di riproporre un sistema che avesse quanta più similarità con l'estrattore Soxhlet e che presentasse una struttura tale da ovviare i problemi legati alla separazione degli oli dalla biomassa residua. Un ulteriore concetto su cui si è lavorato è stata la necessità di predisporre di un sistema che fosse flessibile sia nelle operazioni in batch che in continuo. Un concetto importante già citato nel capitolo precedente,

è legato al fatto che operare a cicli di estrazione diventa non solo utile per la riduzione dei volumi ma, anche, vantaggioso economicamente se vi è un ricircolo del solvente.

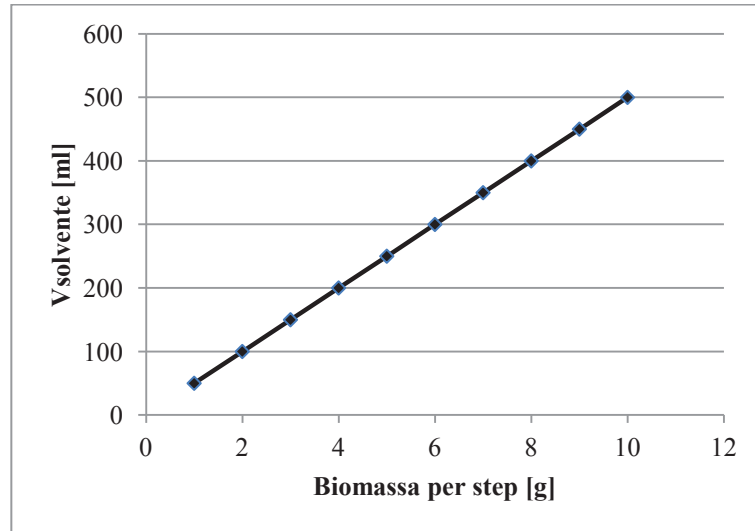


Fig. 4.1 - Volumi di solvente al variare della biomassa utilizzata per singolo step di estrazione, considerando estrazioni da 3 ore con $M=50$ per un mese.

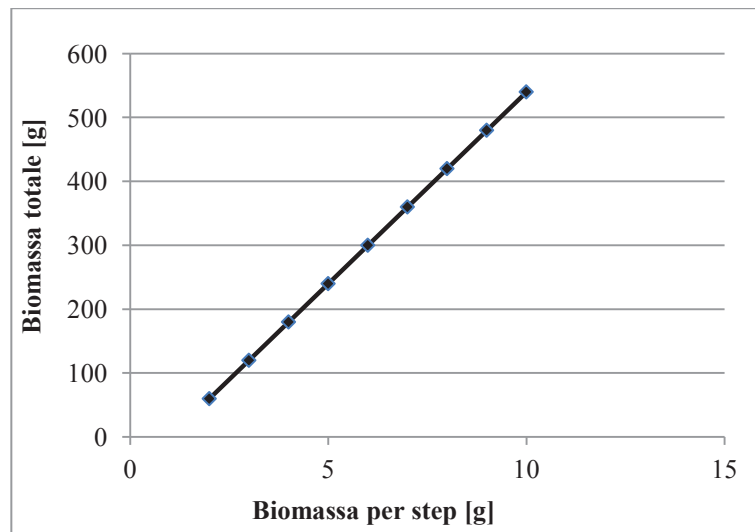


Fig. 4.2 – Biomassa totale estratta al variare della biomassa utilizzata per singolo step di estrazione, considerando estrazioni da 3 ore con $M=50$ per un mese.

Nelle prove condotte in laboratorio la separazione del solvente dagli oli è stata effettuata mediante evaporatore rotante. Lo stesso evaporatore opera alla temperatura di ebollizione dei solventi, temperatura identica anche nell'estrazione. Per cui vi è la possibilità di combinare le due operazioni. Questo progetto è partito dal considerare, come richiesta da soddisfare, la

possibilità di poter lavorare 10 kg di biomassa secca in un mese. Per cui tutti i calcoli fatti precedentemente possono essere scalati secondo questi quantitativi.

Si è visto che il rapporto di alimentazione pari a 50 è ideale soprattutto se realizzato con cicli di estrazione da 3 ore. In un mese è possibile sviluppare al massimo 60 estrazioni, dal momento che se ne possono realizzare due ogni giorno.

$$n_{estrazioni} = 2 \text{ estrazioni/giorno} * 30 \text{ giorni} = 60$$

$$massa \text{ STEP} = \frac{massa \text{ TOT}}{n_{estrazioni}} = \frac{10000 \text{ g}}{60} = 167 \text{ g}$$

$$V_{solv} = massa \text{ STEP} * M = 167 \text{ g} * 50 \text{ ml/g} = 8350 \text{ ml}$$

È evidente quindi che la capacità che il sistema di estrazione deve garantire è almeno di 10 litri, per cui lavorando con un volume di solvente di 10 litri, si ha che:

$$massa \text{ alghe}_{secca} [g] = \frac{V_{solv} [ml]}{M} = \frac{10000 \text{ ml}}{50 \text{ ml/g}} = 200 \text{ g}$$

$$n_{estrazioni} = \frac{massa \text{ TOT}}{massa \text{ STEP}} = \frac{10000 \text{ g}}{200 \text{ g}} = 50$$

Da questi dati già 25 giorni sono sufficienti per supportare la produttività richiesta. Si tratta di calcoli semplici che possono essere adottati nel dimensionamento dei sistemi a seconda di quali siano i quantitativi di biomassa da trattare. Assumendo quindi, secondo le prove condotte in laboratorio, una resa di circa 9% (tale valore nasce da una media stimata dalle prove condotte a cicli con etanolo 96%), si stima che in 25 giorni il quantitativo di olio estratto sarà all'incirca di 4.56 g/giorno per un totale di 114 g.

4.2 Considerazioni per lo scale-up

Indipendentemente dal solvente usato, un estrattore semplice, poco costoso e flessibile, dovrà garantire essenzialmente due cose:

- l'estrazione a temperatura superiore a quella ambiente;
- il ricircolo in continuo di solvente fresco.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 4 – Progettazione dell'estrattore pilota

Sono state individuate diverse possibili soluzioni commerciali, ma il loro costo è molto più alto del budget previsto per questa operazione nel progetto.

Il sistema si configurerà, quindi, come mostrato in Figura 4.3 e dovrà prevedere i seguenti pezzi:

1. pallone incamiciato in cui si raccoglie il solvente con l'estratto; il pallone deve avere un volume di 10 litri ed essere incamiciato in modo da permettere l'evaporazione del solvente da riciclare al sistema di estrazione; l'olio, invece, non evaporerà e si accumulerà nel pallone;
2. raccordo verticale sopra il pallone in cui vengono convogliati i vapori del solvente sottoposto ad evaporazione mediante il ricorso alla camicia riscaldante;
3. raccordo curvo (a 90° o di qualsiasi altra angolazione) tra il pezzo verticale del punto 2 e il condensatore del punto 4;
4. condensatore con serpentina di raffreddamento (con previsti ingresso e uscita dell'acqua di raffreddamento), necessario per la condensazione del solvente da riciclare nella camera di estrazione;
5. recipiente di accumulo/stoccaggio (volume 10 litri) posto sotto il condensatore; questo recipiente può essere semplicemente lo shell di un condensatore (senza la serpentina di raffreddamento!); tale recipiente deve essere raccordato nella parte superiore con il condensatore e nella parte inferiore con l'estrattore; l'unica accortezza è che nella parte inferiore sia prevista una valvola, che viene tenuta chiusa quando si lavora in discontinuo e che invece viene aperta quando si vuole alimentare il solvente fresco nella camera di estrazione sottostante; tale recipiente è necessario per lo stoccaggio del solvente che viene man mano condensato e che non si vuole rimandare direttamente nella camera di estrazione quando si lavora in condizioni batch o semi-continue;
6. estrattore; si tratta di un recipiente (volume 10 litri) con il coperchio smontabile e raccordato al recipiente di accumulo sovrastante; la camera di estrazione deve essere dotata di camicia esterna per poter lavorare alla temperatura desiderata e di una piccola elica collegata ad un motore di bassissima potenza; tale elica deve essere immessa lateralmente ed è necessaria per favorire la diffusione del solvente verso la matrice da estrarre e dei lipidi estratti verso il bulk della fase liquida; la parte inferiore della camera deve essere rivestita con un filtro o una tela (ritenzione 50-100 µm) che trattenga la biomassa algale dentro la camera di estrazione; infine, immediatamente all'uscita dell'estrattore in basso deve essere

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 4 – Progettazione dell'estrattore pilota

prevista una valvola: tale valvola viene chiusa quando si decide di fare una estrazione in condizioni batch, mentre viene aperta quando si decide di far ricircolare il solvente che – arricchito con i lipidi estratti – viene convogliato nel pallone 1;

7. raccordo tra estrattore e pallone; alla fine del raccordo e immediatamente prima del pallone deve essere prevista una valvola; tale valvola deve rimanere chiusa durante l'evaporazione del solvente per evitare che i vapori di solvente risalano lungo il raccordo 7 invece che in quello verticale (2).

Il sistema risulta quindi facilmente smontabile e i singoli pezzi si trovano facilmente in commercio e necessitano di un semplice assemblaggio mediante raccordi e piccole valvole. Tale sistema è estremamente flessibile e permette di gestire facilmente la temperatura di estrazione, i volumi di solvente in gioco e il tempo di estrazione. Inoltre, consente di cambiare la modalità di estrazione (batch, semi-continua o continua) mediante la semplice apertura e chiusura di valvole in ingresso o in uscita dai singoli pezzi sopra descritti.

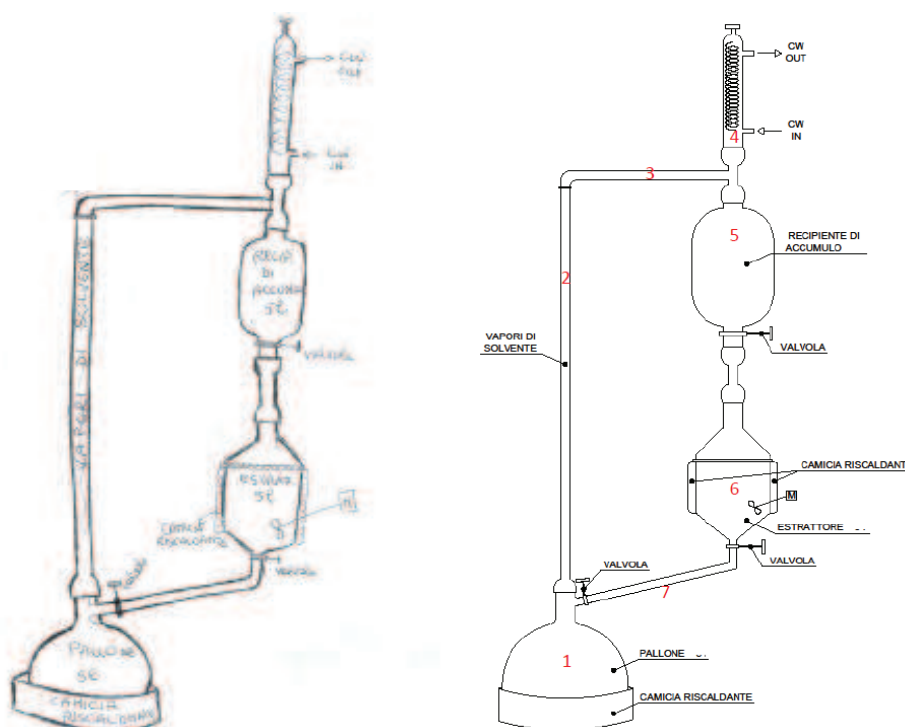


Fig. 4.3 - Disegno del sistema di estrazione.

Lavorando con un volume di solvente pari a 10 litri e considerando un rapporto matrice solvente pari a 1:50, si possono trattare 200 grammi in ogni estrazione da 3 ore (con cicli da 30 minuti ciascuno). Ciò significa che si può arrivare a trattare fino a 600 g di biomassa secca

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IA – Estrazione di lipidi da microalghe
Capitolo 4 – Progettazione dell'estrattore pilota

al giorno. Nell'ipotesi che si riesca ad avere una resa altissima in lipidi (10% in peso rispetto alla biomassa secca di partenza), a fine giornata si otterrebbero 60 g di olio e 540 g di biomassa algale residua. Quindi, in 20 giorni di otterrebbero 1.2 kg di olio e i 10 kg di biomassa necessaria ad alimentare mensilmente il digestore anaerobico. La sperimentazione sul campo potrebbe poi evidenziare la possibilità di lavorare con una quantità minore di solvente o per tempi minori o con cicli di estrazione più frequenti (ad esempio ogni quarto d'ora), ma ciò non determinerà cambiamenti alla struttura del sistema di estrazione proprio per la flessibilità con la quale è stato concepito.

Il progetto esecutivo dell'estrattore destinato all'impianto prototipale di Marina di Gioiosa Jonica è riportato nella sua forma finale in Figura 4.4, dove sono riportate anche le dimensioni delle varie parti del sistema.

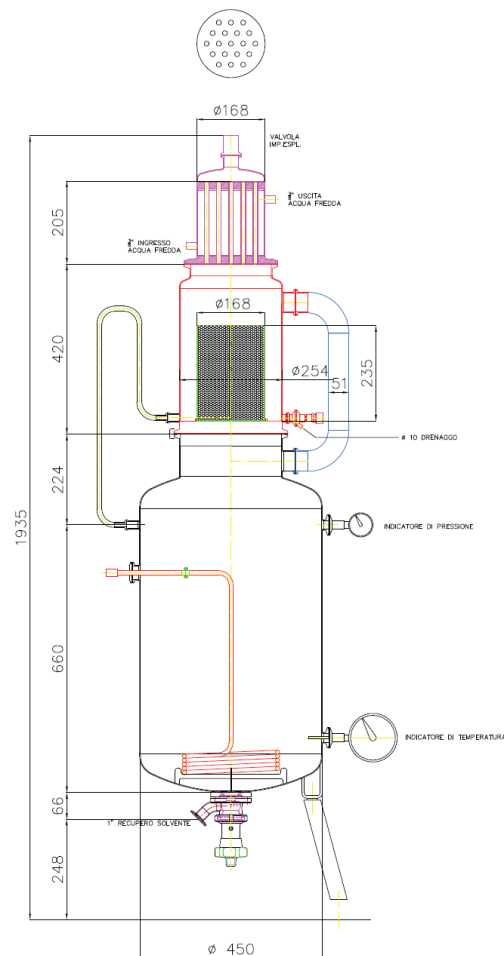


Fig. 4.4 – Progetto esecutivo dell'estrattore con solvente prototipale (Tutti i diritti sono riservati e appartenenti al partenariato del progetto PON01_02061).

Parte IB

**ESTRAZIONE DI LIMONENE DA
BUCCE DI LIMONE DI ROCCA IMPERIALE IGP**

Capitolo 1

Il limonene e le sue applicazioni

1.1 Gli agrumi e il limone di Rocca Imperiale IGP

Gli agrumi appartengono alla famiglia delle *Rutaceae*, sottofamiglia *Aurantioideae*. Sono di origine tropicale e provengono dall'Asia e in particolare da una vastissima zona che si estende dai versanti meridionali dell'Himalaya alla Cina meridionale, all'Indocina, alla Thailandia, alla Malaysia e all'Indonesia. Non è facile, però, poter stabilire con certezza il centro di origine di ogni singola specie agrumicola anche perché in alcuni casi è incerta la loro entità botanica. I principali agrumi coltivati (Figura 1.1) che appartengono al genere *Citrus* e rivestono maggiore importanza economica, possono rientrare nei seguenti gruppi: gli aranci, i mandarini, i pompelmi e gli agrumi acidi (cedri, limoni, bergamotti e lime). Inoltre, vi sono altri agrumi, che appartengono ai generi *Fortunella* (i kumquat, interessanti per i loro frutti da dessert e come pianta ornamentale) e *Poncirus* (arancio trifogliato, usato come porta-innesto). La produzione di frutta è la ragione principale della coltivazione degli agrumi ed in base a questa si possono segnalare diversi gruppi secondo la loro destinazione:

- alimentazione diretta, o estrazione di succhi: aranci, limoni, mandarini, e pompelmi
- produzioni di canditi come cedro e chinotto
- estrazione di profumi o essenze come il bergamotto
- ornamentale e con frutto commestibile: kumquat, fortunella, calamondino.

Nonostante le differenze di forma, colore e dimensioni, tutti gli agrumi sono caratterizzati dalla struttura mostrata in Figura 1.1. Le *bucce* sono costituite da un'epidermide formata da cere epicutcolari a forma di piastrine. Il quantitativo di cere dipende dalla varietà, dalle condizioni climatiche e da quelle di crescita. Questo strato di solito ospita una microflora formata prevalentemente da funghi e da batteri, più abbondante nei climi umidi. Ciò rende conto della necessità di provvedere ad un opportuno lavaggio della frutta prima dei

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

procedimenti di estrazione del succo e dell'essenza, per minimizzare la contaminazione proveniente dalla superficie dei frutti (Kimball, 1999). Immediatamente sotto l'epidermide si trova il *flavedo* caratterizzato dal colore giallo, verde o arancio. Nel flavedo sono localizzate le vescicole oleifere che sono caratterizzate da pareti molto sottili e fragili; dentro di esse è contenuto l'olio essenziale con una pressione positiva; ciò permette il suo recupero per abrasione dello strato di flavedo. Il costituente successivo è l'*albedo* formato da cellule a struttura tubolare che formano una vera e propria rete con la maggior parte del volume tissutale compresso nello spazio intercellulare. Lo spessore dell'albedo varia in base al tipo di agrumi e alle cultivar. Ciò rende necessaria la possibilità di poter regolare gli estrattori per compensare lo spessore dello strato di albedo, soprattutto quando si desidera la migliore qualità possibile. L'albedo è molto ricco di flavonoidi che se trasferiti nel succo lo rendono particolarmente amaro. Segue l'*endocarpo*, costituito dagli involucri membranosi degli spicchi muniti nel loro interno di peli cellulari succulenti, mentre al centro troviamo la *medula* che tiene insieme i vari spicchi. La polpa rappresenta circa l'80% del frutto ed è la parte più importante per l'utilizzazione ai fini alimentari. I semi sono in numero vario per ogni spicchio; talvolta si ha apirenia o aspermia (assenza di semi). La parte più interna del frutto, *core*, è formata da un tessuto spugnoso simile a quello dell'albedo.



Fig. 1.1 - Struttura di un agrume

Relativamente al limone, in Italia la coltivazione avviene essenzialmente nelle regioni che presentano un clima caldo e secco e in cui le temperature invernali non scendono sotto lo zero. In particolare, la produzione è distribuita per il 90% in Sicilia e il restante 10% tra

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

Calabria e Campania. Le varietà maggiormente diffuse sono il *Femminello*, che rappresenta il 70-75% della produzione nazionale, il *Monachello* e l'*Interdonato* coltivato soprattutto nella provincia di Messina. Il *Femminello* è caratterizzato da una pezzatura medio-grande con una buccia fine e un'elevata capacità produttiva; possiede un alto contenuto in acido citrico, un'elevata qualità degli oli essenziali (in particolare la prima fioritura, denominata appunto “primofiore”) e una succosità superiore al 30%; produce tre fioriture l'anno interessando tutte le stagioni con intensità produttiva diversa. Il *Monachello* ha una pezzatura medio-piccola ed è una varietà molto apprezzata per l'elevata resistenza al mal secco, ma meno produttiva e più lenta ad entrare in produzione. Infine, l'*Interdonato* è varietà derivata probabilmente dall'incrocio tra il limone e il cedro.

La pianta risulta nel suo complesso poco produttiva, soprattutto nei mesi invernali, ma ha una buona resistenza al mal secco e fornisce un “primofiore” che matura precocemente (settembre-ottobre).



Nel 2001 è nato il “Consorzio per la Tutela e la Valorizzazione del Limone di Rocca Imperiale”, al fine di tutelare e valorizzare in forma associata il “Limone di Rocca Imperiale” attraverso la creazione di un marchio e di un disciplinare di produzione.

Il Limone di Rocca Imperiale, prodotto di eccellenza della coltura Calabrese, è inserito all'interno dell'Elenco delle produzioni tipiche della Regione Calabria e nell' Elenco Nazionale dei prodotti agro-alimentari tradizionali promosso dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Si tratta di un prodotto agroalimentare “esclusivamente biologico” tradizionale della Regione Calabria ed è annoverato fra i prodotti ad Indicazione Geografica Protetta (IGP) riconosciuti dall'Unione Europea dal 21 Febbraio 2012. L'area di produzione del Limone di Rocca Imperiale con una superficie di 200 Ha e con una produzione di circa 5000 tonnellate di prodotto annuo, rappresenta il 70% della produzione limonicola dell'intera provincia di Cosenza. Le caratteristiche peculiari del Limone di Rocca Imperiale sono: resa in succo superiore al 30%, contenuto in limonene superiore al 70% che insieme ad altri componenti aromatici conferisce ai frutti un profumo forte e intenso. È provato che queste caratteristiche qualitative e organolettiche si differenziano da quelle provenienti da altre aree

di coltivazione, conferendo ai frutti una propria identità nei mercati locali, regionali e nazionali. Queste qualità esclusive sono essenzialmente legate ai fattori ambientali: clima, terreno e acqua del luogo di produzione. Infatti, il comune di Rocca Imperiale presenta caratteristiche geografiche, climatiche e pedologiche non riscontrabili in altre zone limonicole e tali da caratterizzare in maniera tipica ed esclusiva i limoni prodotti. Dall'analisi dei dati climatici registrati in un sessantennio di osservazioni si evidenzia che i valori di temperatura, non hanno mai superato i limiti termici del limone, infatti la temperatura media annua è pari a 18.2°C, la media del mese più caldo di 27.2°C, la temperatura media del mese più freddo di 10.2°C, la media delle temperature minime dei mesi più freddi non scende al di sotto dei 6-7°C e la media delle temperature massime nei mesi più caldi è pari a 32.5°C. L'acqua che presenta un fattore limitante per la coltura del limone, in questa zona è presente con una piovosità media annua della zona di circa 600 mm, ben distribuita, soprattutto nella fase autunno-inverno, e mediamente in primavera all'inizio del ciclo colturale. Anche l'ambiente pedologico risulta particolarmente favorevole alla coltivazione. Sono infatti presenti in prevalenza profili di tipo alluvionale dotati di buona fertilità.

L'Indicazione Geografica Protetta "Limone di Rocca Imperiale" è riservata ai frutti di limone che rispondono alle condizioni ed ai requisiti stabiliti dal "Disciplinare di produzione della indicazione geografica protetta *Limone di Rocca Imperiale*".

1.2 Gli oli essenziali

La possibilità di valorizzare biomasse di scarto per ottenere composti ad alto valore aggiunto e biofuels ha portato a un interesse sempre crescente verso la lavorazione degli agrumi (limone, arancia, mandarino, lime e pompelmo), la quale genera un gran numero di sottoprodotti derivati dalla buccia. In particolare, dopo la fase di spremitura e raccolta del succo, gli scarti possono essere la materia prima da cui ricavare pectine, esperidina e naringina concentrate, bucce essiccate, melasse, alcol, carotenoidi, acido citrico e oli essenziali. Gli oli essenziali sono miscele complesse di composti volatili, liquidi e solidi che si ritrovano nelle strutture vegetali cui conferiscono l'odore caratteristico. In particolare, gli oli essenziali ricavati dagli agrumi sono costituiti da composti volatili quali terpeni e derivati ossigenati (aldeidi, alcoli ed esteri), per un totale di 40 componenti identificati negli oli essenziali estratti dalle bucce di pompelmo fresche, 27 negli oli estratti dalle bucce essiccate

all'ambiente e 17 negli oli estratti dalla bucce essiccate in un forno (Kamal et al., 2011). Il principale costituente degli oli essenziali ottenuti dagli agrumi è il d-limonene o (R)-(+)-4-isoproprenil-1-metilcicloesene, un monoterpene monociclico classificato nel Code of Federal Regulation come agente aromatizzante. Per quanto concerne l'umidità delle bucce, gli studi di Kamal et al. (2011) suggeriscono un aumento del quantitativo di limonene presente al diminuire dell'umidità. La matrice essiccata, infatti, consentirebbe al limonene di fuoriuscire più facilmente, poiché la presenza di "acqua" ostacola il suo allontanamento. Si ha, infatti, una percentuale di limonene pari a 65.5% per matrice secca e 50.8% per matrice fresca. Gli altri due monoterpeni presenti in maggiore quantità sono l' α -pinene (1.5% per matrice essiccata) e il β -myrcene (3.60% per matrice essiccata).

1.3 Il limonene: aspetti fisici, chimici e biochimici

Il limonene è un idrocarburo, in particolare una cicloolefina classificata come monoterpene ciclico.

I terpeni sono biomolecole costituite da multipli dell'unità isoprenica e possono essere lineari, ciclici o entrambi. Quando i terpeni sono modificati con reazioni tali da portare alla formazione di gruppi funzionali contenenti atomi diversi dal carbonio, come gruppi idrossilici, carbonilici o contenenti azoto, vengono chiamati terpenoidi. Molti autori con il termine *terpene* indicano anche i vari *terpenoidi*. I terpeni vengono classificati in base al numero di unità isopreniche (C₅H₈) contenute, così come sintetizzato nella tabella 1.1:

Tab. 1.1 - Classificazione dei terpeni

Classificazione	Unità isopreniche	Atomi di Carbonio
Emiterpeni	1	5
Monoterpeni	2	10
Sesquiterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sesterpeni	5	25
Triterpeni	6	30
Politerpeni	>6	>30

Come accennato inizialmente, alla classe dei monoterpeni appartiene il limonene, un liquido incolore a temperatura ambiente e con un forte odore di arance, limoni o trementina a seconda della composizione chirale. Prende il suo nome dal limone, la cui buccia, così come quella di

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

altri agrumi, contiene grandi quantità di questo composto chimico, che è in gran parte responsabile dell'odore caratteristico.

Il limonene è una molecola chirale, pertanto si può presentare nelle forme enantiomere destrogira e levogira (Figura 1.2) e nella forma racema detta anche dipentenica. È un liquido che odora di limone (l'enantiomero R) o di trementina (l'enantiomero S). Il principale composto chimico presente in natura e di maggior interesse in campo industriale e merceologico è il d-limonene, ovvero il (R)-(+)-4-isoproprenil-1-metilcicloesene.

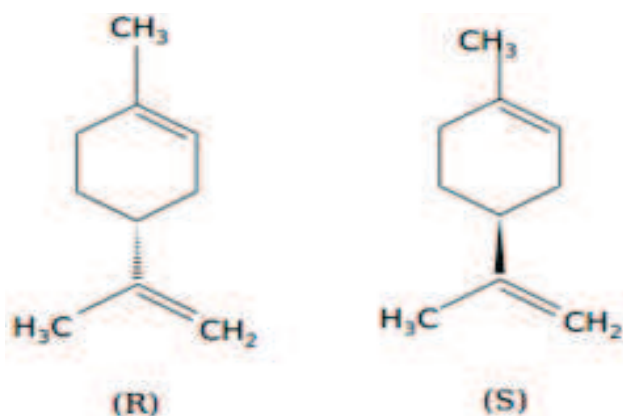


Fig. 1.2 - Forme enantiomere del limonene.

Il limonene è prodotto in natura dal geranyl-pirofosfato tramite ciclizzazione del neril-carbocatione, o un suo equivalente. Il passaggio finale consiste nella perdita di un protone dal catione per formare l'alchene. In Figura 1.3 si riporta lo schema di produzione del limonene per biosintesi del geranyl-pirofosfato.

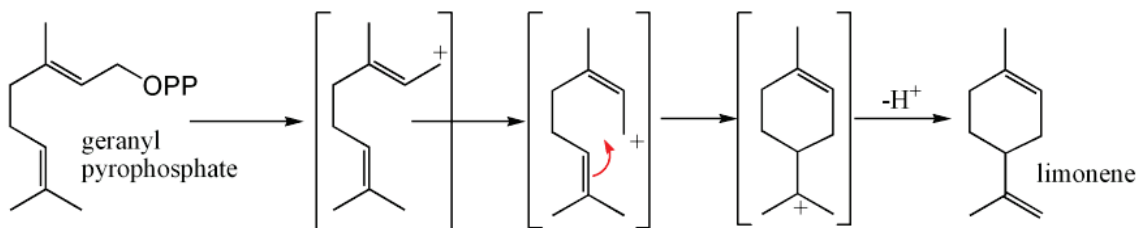


Fig. 1.3 - Biosintesi del limonene.

Nella tabella 1.2 si riportano le proprietà fisiche e chimiche del d-limonene.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

Tab. 1.2 - Proprietà chimiche del limonene.

<i>Proprietà chimico-fisiche del d-limonene</i>	
<i>Proprietà</i>	<i>Valori</i>
Purezza Commerciale	94 (grezzo) – 99.6 (elevata purezza)
Colore	incoloro
Odore	limone, inodore ad elevata purezza
Peso Molecolare [g/mol]	136.23
Temperatura di ebollizione [°C; 1 atm]	178 (elevata purezza)
Temperatura di fusione [°C]	-96.9
Tensione di Vapore [mmHg a 0-25°C]	0.41-2.1
Calore Specifico [cal/g·°C]	0.438
Flash Point [°C, open cup]	46 (grezzo) – 49 (elevate purezza)
Costante Dielettrica [10 MHz a 20°C]	2.37
Numero di Perossidi	2 - 5
Rotazione Ottica	+96 (grezzo)
Solubilità [mg/L a 25°C]	13.8 (in acqua pura)
	13.5 (soluzione al 20% di saccarosio)
Viscosità [cP]	3.5 (-50°C)
	1.5 (0°C)
	0.9 (25°C)
	0.7 (50°C)
	0.25 (178°C)

La struttura molecolare del limonene potrebbe essere alterata chimicamente mediante ossidazione di alcoli, aldeidi, chetoni o acidi, o attraverso reazioni di riduzione e isomerizzazione, che potrebbero portare alla formazione di una grandissima varietà di terpeni o metaboliti di oli essenziali, mostrati in Figura 1.4.

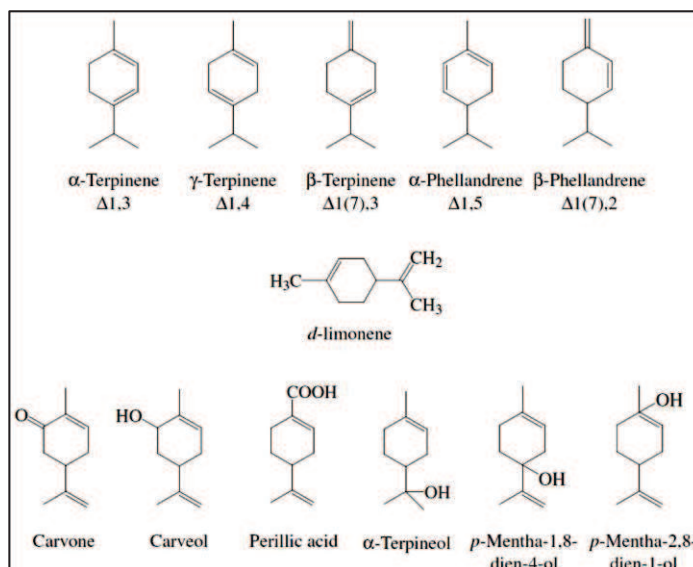



Fig. 1.4 - Struttura del d-limonene, forme ossidate e metadieni derivati.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

Di seguito viene anche riportata una sintesi della scheda di sicurezza del limonene (Tabella 1.3).

Tab. 1.3 - Scheda internazionale di sicurezza del (+)-Limonene secondo il regolamento (CE) Num. 1907/2006 (www.merck-chemicals.com)

<i>Tipo di rischio/esposizione</i>	<i>Rischi acuti/sintomi</i>	<i>Prevenzione</i>	<i>Primo soccorso/Mezzi estinguenti</i>
INCENDIO	Infiammabile.	NO fiamme libere, NO scintille e NON fumare.	Polvere, schiuma alcool-resistente, spruzzo d'acqua, anidride carbonica.
ESPLOSIONE	Oltre 48°C possono formarsi miscele vapore/aria esplosive.	A temperature superiori a 48°C usare un sistema chiuso, ventilazione e materiale elettrico antideflagrante.	In caso di incendio: mantenere freddi i fusti, ecc., bagnandoli con acqua.
ESPOSIZIONE		Rigorosa igiene.	
INALAZIONE		Ventilazione.	Aria fresca, riposo.
CUTE	Arrossamento. Dolore.	Guanti protettivi. Vestiaro protettivo.	Rimuovere i vestiti contaminati. Sciacquare e poi lavare la cute con acqua e sapone.
OCCHI	Arrossamento.	Occhiali di sicurezza.	Prima sciacquare con abbondante acqua per alcuni minuti (rimuovere le lenti a contatto se è possibile farlo agevolmente), quindi contattare un medico.
INGESTIONE		Non mangiare, bere o fumare durante il lavoro.	Risciacquare la bocca.
Rimozione di un versamento		Immagazzinamento	Imballaggio ed etichettatura
Protezione personale: respiratore con filtro P1 per particelle inerti. NON permettere che questo agente chimico contaminino l'ambiente. Raccogliere il liquido fuoriuscito e sversato in contenitori sigillabili il più lontano possibile. Assorbire il liquido restante con sabbia o adsorbente inerte e spostare in un posto sicuro.		A prova di fuoco. Separato da ossidanti forti. Immagazzinare in un'area senza tombini o accesso alle fognie.	Simboli Xi; Simboli N R: 10-38-43-50/53 S: 2-24-37-60-61 
Pericoli chimici		Reagisce violentemente con una miscela di penta fluoruro	

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

	di iodio e tetrafluoruro etilene, causando pericolo di incendio ed esplosione. Reagisce con ossidanti
Limiti di esposizione	TLV non definito MAK: 20 ppm; 110 mg/m ³ sensibilizzazione della cute (Sh) Categoria limitazione di picco: II; Gruppo di rischio per la gravidanza: C
Rischi per inalazione	Generalmente le forme ossidate della sostanza possono causare sensibilizzazione. Questo può accadere quando la sostanza pura o diluita rimane a contatto con l'aria per alcuni giorni. Tuttavia non può essere fornita alcuna indicazione circa la velocità con cui si raggiunge una contaminazione dannosa nell'aria per evaporazione della sostanza a 20°C
Effetti dell'esposizione a breve termine	La sostanza è irritante per la cute ed è mediamente irritante per gli occhi
Effetti dell'esposizione ripetuta o a lungo termine	Contatti ripetuti o prolungati possono causare sensibilizzazione cutanea.
Dati ambientali	La sostanza è molto tossica per gli organismi acquatici. Può esserci bioaccumulo di questa sostanza chimica nei pesci.
Dati di trasporto	Per il trasporto di questa sostanza vengono utilizzati; UN 2052 (Transport Emergency Card 30S2052) e UN 2319 (Transport Emergency Card 30GF1-III) con Classe di rischio 3, Gruppo di imballaggio III.

1.4 Applicazioni del limonene

Gli oli essenziali estratti dagli agrumi sono sottoprodotti della lavorazione degli stessi agrumi (*Mamma & Christakopoulos, 2013*) e hanno una grandissima importanza commerciale grazie ai loro possibili impieghi in vari campi. In particolare, essi sono usati nelle industrie alimentari come additivi in molti prodotti (bevande, succhi di frutta, liquori, dolci, gelatine, gelati) sia per la loro aroma sia per le loro proprietà funzionali antifungine, antimicrobiche, ecc. (*Burt S, 2004; Fisher & Phillips, 2008; Viuda-Martos et al., 2008*). Grazie alle loro proprietà antibiotiche e aromatizzanti, gli oli essenziali sono anche usati in profumi, cosmetici, prodotti per la casa e formulazioni farmaceutiche. Gli oli essenziali ricchi in limonene sono usati anche nell'aromaterapia senza alcuna tossicità clinica (*Edris, 2007; Gonzáles-Molina et al., 2010; Miller et al., 2012*). Inoltre, essi potrebbero essere usati per la loro azione anti-cancerogena. Ad esempio, il d-limonene presenta un'attività chemioterapeutica ed effetti anti-cancro relativamente ai tumori alla mammella e al fegato (*Elegbede et al., 1986; Elson et al. 1988; Maltzman et al., 1989; Crowell et al., 1992; Haag et al., 1992; Crowell & Gould, 1994; Gould et al., 1994; Gould, 1995; Crowell et al., 1996;*

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 1 – Il limonene e le sue applicazioni

Hohl, 1996; Crowell, 1997; Gould, 1997; Crowell, 1999; Miller et al., 2011; Thoppil & Bishayee, 2011). Come si evince dalla Figura 1.5 gli effetti chemio-preventivi di composti naturali, tra cui il limonene, sono molteplici e diversificati ma tutti tesi a limitare la proliferazione cellulare o indurre apoptosi delle cellule cancerose. Il meccanismo di azione del limonene non è ancora del tutto chiaro. L'ipotesi che questa sostanza svolga un'azione antitumorale è stata formulata sulla base del fatto che le Ras proteine controllano la proliferazione e la differenziazione cellulare e che la loro presenza è stata riscontrata in molti malati di tumore. Si è osservato che nelle cellule tumorali animali (mammelle e pancreas) e umane (seno, colon e linfociti) il limonene inibisce l'isoprenilazione delle proteine 21-26-kDa, incluse le Ras (21-kDa) all'ultimo gruppo carbossilico della cisteina.

Contemporaneamente si ha l'inibizione della proliferazione delle cellule, che concorda con l'inibizione della corrispondente protein-prenil transferasi (farnesyl transferasi e geranylgeranyl transferasi) da parte del limonene. Anche la 3-idrossi-3-metilglutarilCoA-reduttasi (percorso metabolico dell'acido mevalonico; inibizione della sintesi del colesterolo) è inibita dal limonene e dai suoi metaboliti, con un conseguente impoverimento del pool di farnesylpirofosfato e di geranylgeranylpirofosfato ed una riduzione della isoprenilazione delle proteine. Gli esperimenti in vivo effettuati su ratti malati di cancro alla mammella hanno confermato questi effetti. Esperimenti in vitro effettuati sulle cellule tumorali umane menzionate in precedenza hanno dimostrato che i metaboliti del limonene prodotti dai mammiferi sono degli inibitori più attivi del semplice limonene. Studiando linfociti umani sani e malati è stato inoltre osservato che il limonene ed i suoi metaboliti esercitano un'azione inibitrice della isoprenilazione delle proteine 21- 26-kDa e della proliferazione cellulare più potente nelle cellule tumorali. A differenza di quanto avviene in vivo, nelle colture di cellule sane e tumorali il limonene non viene metabolizzato. Si può quindi concludere che l'azione anticancerogena non è svolta dal limonene, ma dai suoi metaboliti principali: alcool perillico, acido perillico e limonene-1,2-diolo (*Hardcastle et al., 1999*).



Fig. 1.5 - Effetti chemiopreventivi dei composti naturali.

Infine, il d-limonene ha potere antiossidante (per cui risulta importante nel proteggere le cellule dallo stress ossidativo e dalle disfunzioni mitocondriali), effetti anti-diabetici (*Edris, 2007; Murali & Saravanan, 2012; Murali et al., 2013*) e altre applicazioni cliniche (*Sun, 2007*).

Oltre a queste applicazioni alimentari, cosmetiche, farmaceutiche e farmacologiche, il d-limonene è usato come additivo nei pesticidi (*Dotolo, 1989; Ibrahim et al., 2001*) per il controllo di pulci e zecche sugli animali domestici, sottoforma di spray insetticida e repellenti. Inoltre, il d-limonene è considerato un solvente “green”, biodegradabile e non tossico in sostituzione ai solventi di origine petrolchimica, ben più pericolosi, impiegati nelle industrie oleochimiche e delle cere, resine, vernici, adesivi e colle (*Virost et al., 2008*).

Capitolo 2

Metodi di estrazione del limonene dalle bucce di agrumi

2.1 Localizzazione e variabilità degli oli essenziali

I monoterpeni, costituenti degli oli essenziali di cui fa parte il limonene, sono contenuti nella cellula vegetale (Figura 2.1) all'interno dei vacuoli e dei cloroplasti (principali organuli cellulari ad azione fotosintetica).

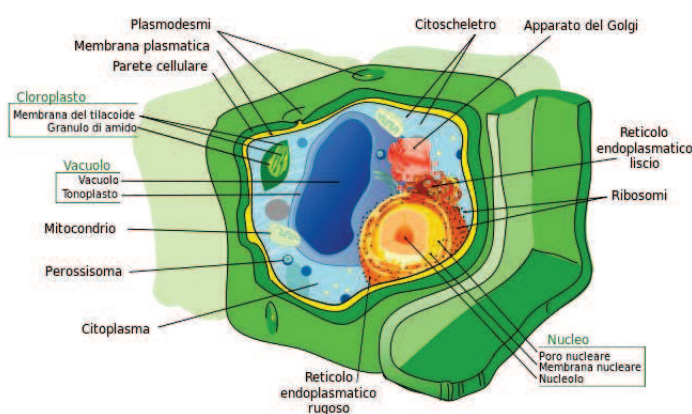


Fig. 2.1 - Struttura della cellula vegetale.

Le strutture secretive, che elaborano l'olio essenziale, si presentano differenti e specializzate a seconda della famiglia cui appartiene la pianta. Dunque, la localizzazione degli oli essenziali nelle varie parti della pianta (fiori, frutti, semi, steli, corteccia, radice, ecc.) differisce notevolmente a seconda del tipo di specie. In particolare, gli oli essenziali si accumulano principalmente nelle foglie (*Lamiaceae*), nei fiori (*Rosaceae*), nei frutti (*Rutaceae*) e nei semi (*Rosaceae*). Gli oli essenziali degli agrumi (appartenente alla famiglia delle *Rutaceae*) sono localizzati soprattutto in cellule lisigene nel flavedo dei frutti. Durante il ciclo vitale della pianta gli oli essenziali mutano di continuo la loro composizione chimica in base alla

stagione, alle condizioni climatiche, all'annata. Questa variabilità si riscontra talvolta anche in piante della medesima specie, appartenenti però a chemotipi diversi. Perciò, le piante destinate all'estrazione dell'olio essenziale dovrebbero essere raccolte solo in determinati periodi dell'anno e dello sviluppo vegetativo (periodo balsamico), in corrispondenza dei quali la concentrazione delle essenze di interesse è massima.

2.2 Analisi dei metodi di estrazione degli oli essenziali

Le tecniche di estrazione tradizionalmente utilizzate sono principalmente basate sulla pressatura o spremitura a freddo, sull'estrazione con solventi mediante percolazione o sistema Soxhlet (*Wang & Weller, 2006*) e sulla distillazione attraverso l'interfacciamento con acqua a 100°C o vapore (*Ferhat et al., 2007*). Nonostante la norma AFNOR NF T 75-006 dell'ottobre 1987, definisca in modo molto restrittivo l'olio essenziale come “*un prodotto ottenuto a partire da una materia prima vegetale, sia per distillazione con vapore, sia con dei processi meccanici a partire dall'epicarpo dei Citrus, sia per distillazione a secco*”, questi metodi convenzionali hanno alcuni svantaggi, essenzialmente legati agli alti costi energetici e ai lunghi tempi di estrazione. Inoltre, la spremitura a freddo porta a basse rese estrattive e favorisce le reazioni di idrolisi, ossidazione e resinificazione (*Ferhat et al., 2007*). La distillazione in corrente di vapore e l'idrodistillazione, invece, avvengono ad alte temperature per tempi lunghi e possono determinare variazioni dei componenti dell'olio essenziale e spesso una perdita delle molecole più volatili (*Ferhat et al., 2007*). Inoltre, gli oli essenziali ottenuti mediante distillazione si deteriorano facilmente a causa dell'instabilità dei terpeni presenti (*Yamauchi & Sato, 1990*). Di conseguenza, molti nuovi metodi sono stati studiati al fine di avere estrazioni più veloci ed efficienti, aumentare la quantità dell'olio essenziale estratto, preservare la sua qualità e avere minori consumi energetici. Questi metodi possono essere raggruppati essenzialmente in due categorie: distillazioni modificate ed estrazioni con solvente modificate. Al primo gruppo appartengono la distillazione accelerata, l'idrodifusione, il processo assistito da microonde (MAP), l'estrazione *free-solvent* mediante microonde (SFME) e l'idrodistillazione assistita da microonde (MAHD). Fanno parte del secondo gruppo, invece, l'estrazione con fluidi supercritici SFE (*Reverchon, 1997; Diaz et al., 2005*), con solvente assistita da ultrasuoni UAE (*Vinatoru, 2001*), con solvente assistita da microonde MAE (*Bousbia et al., 2009; Ferhat et al., 2006; Ferhat et al., 2007; Sahraoui et*

al., 2008; *Virost et al.*, 2008), con caduta di pressione controllata (*Rezzoug et al.*, 2000), con acqua sub-critica (*Gámiz-Gracia & Luque de Castro*, 2000). Per completezza, le principali tecniche di estrazione, sia convenzionali che non convenzionali, di oli essenziali da matrici vegetali sono descritte nei successivi paragrafi.

2.3 Tecniche tradizionali

2.3.1 Spremitura a freddo

Il metodo della spremitura per ottenere gli oli essenziali era particolarmente impiegato nel passato per estrarre le essenze dai fiori o da altre parti delle piante, ma oggi è associato esclusivamente all'estrazione di oli essenziali da agrumi (arancio, bergamotto, mandarino, limone e cedro). In particolare, si procede con la spremitura dalle loro bucce fresche, purché i frutti non siano trattati e appartengano quindi a una coltura biologica. La buccia viene sminuzzata e pressata con l'aggiunta di poca acqua in una pressa meccanica a freddo o in un torchio idraulico. La miscela di acqua e olio essenziale viene poi separata mediante centrifugazione. Un altro metodo più moderno, è la punzonatura, effettuata in cilindri traforati pieni di aghi, all'interno dei quali vengono posti i frutti freschi; per mezzo della forza meccanica, gli esperidi vengono quindi bucati, con conseguente fuoriuscita dell'olio essenziale. L'estratto ottenuto mediante spremitura a freddo da agrumi è stato confrontato da *Ferhat et al.* (2007) con quello ottenuto mediante un'altra tecnica estrattiva tradizionale (idrodistillazione) e una tecnica non convenzionale assistita da microonde.

2.3.2 Idrodistillazione

L'idrodistillazione è il processo più utilizzato, insieme alla distillazione con vapore, per l'estrazione di oli essenziali mediante l'apparato Clevenger (Figura 2.2). Il materiale di partenza, a contatto diretto con l'acqua, è soggetto a temperature intorno a 100°C. L'ebollizione dell'acqua avviene a basse temperature grazie all'apporto del vapore d'acqua (P_v) alla pressione totale. Si ritiene che l'acqua in questo processo svolga una triplice funzione: l'acqua calda ammorbidisce il materiale e penetra al suo interno agevolando la fuoriuscita dei componenti solubili; il vapore d'acqua ricondensando sulla superficie del materiale fornisce il calore latente di vaporizzazione ai componenti volatili e contribuisce

fortemente alla pressione totale grazie alla sua pressione di vapore. L'acqua non è comunque un vero e proprio solvente di estrazione perché non scioglie i terpeni, che, infatti, sono sostanze lipofile, quindi ciò che si ottiene in un'ultima analisi è l'olio separato dall'acqua. Infatti, dopo la condensazione del vapore l'olio e l'acqua tornano ad essere immiscibili e possono essere facilmente separati. Questo processo potrebbe, però, modificare la composizione degli oli a causa del riarrangiamento dei composti termolabili. Inoltre, la presenza di acqua potrebbe indurre la parziale idrolisi di alcuni composti e solubilizzare i composti aventi solubilità in acqua non trascurabile. Le essenze particolarmente delicate vengono distillate a pressione ridotta in modo da essere soggette a temperature inferiori.

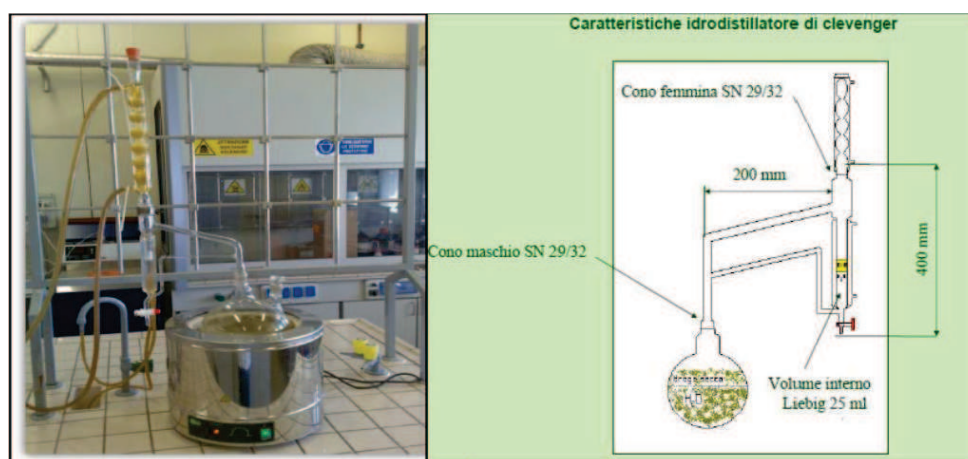


Fig. 2.2 - Apparato Clevenger per idrodistillazione.

2.3.3 Distillazione con vapore

La distillazione con vapore (Figura 2.3) è un metodo simile all'idrodistillazione ma la matrice solida, in tal caso, non è a contatto diretto con l'acqua. La matrice solida da cui estrarre gli oli viene posta su una griglia su cui è fatto passare vapore a circa 110°C. La matrice rilascia il componente da estrarre nel vapore che è convogliato verso una serie di stadi di raffreddamento successivi che provocano la liquefazione del vapore stesso. L'olio essenziale, presente nella matrice, normalmente galleggia sulla superficie del distillato acquoso perché più leggero e quindi può essere separato più facilmente. Di fatto, anche la distillazione in corrente di vapore, come l'idrodistillazione, non è una vera e propria estrazione perché il solvente non riesce a solubilizzare il soluto. Si tratta piuttosto di una separazione per trascinamento fisico di elementi che hanno per loro natura un'alta volatilità.

Per accelerare l'estrazione, la distillazione con vapore è spesso associata all'idrodiffusione, che consiste nell'applicazione di una leggera pressione sottovuoto. Questo metodo incontra, però, una difficoltà legata alla quantità ottimale di vapore richiesta per una data quantità di materiale solido. Dai dati di letteratura è emerso che, mediante questo metodo, è possibile estrarre il 93% degli oli essenziali presenti nella matrice solida, mentre il restante 7% deve essere estratto impiegando altre tecniche (Masango, 2004).

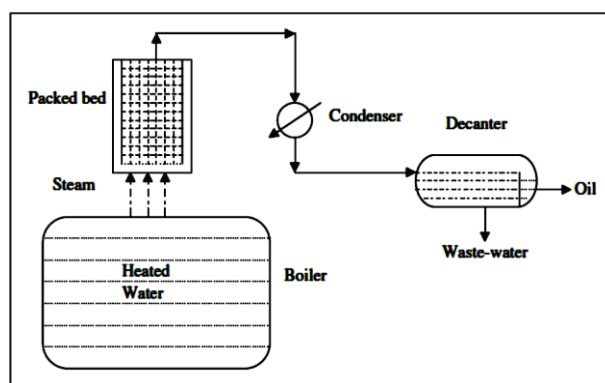


Fig. 2.3 - Schema del processo di estrazione per distillazione con vapore.

2.3.4 Estrazione con solvente organico

Per estrazione con solvente si intende la classica estrazione solido-liquido, l'operazione che consente la separazione di uno o più componenti presenti in una fase solida (oli essenziali presenti nelle bucce di limone) per mezzo di un solvente che lo/li solubilizza.

L'estrazione con solventi organici è normalmente utilizzata per estrarre composti a più alto peso molecolare rispetto all'estrazione in corrente di vapore e per trattare prodotti termolabili. Preliminarmente, al fine di effettuare un'efficiente estrazione, occorre operare una rottura o una modifica fisica delle membrane cellulari, attraverso l'impiego di mezzi meccanici, trattamenti chimici e, laddove le sostanze da estrarre non siano termolabili, trattamenti termici. Un sistema meccanico semplice è la macinazione che permette una parziale rottura delle cellule, con conseguente aumento della superficie di contatto matrice-solvente e una maggiore velocità di diffusione della soluzione imbibita verso l'esterno della struttura cellulare. Tale soluzione risulta vantaggiosa anche per i soluti confinati negli spazi intercellulari.

Nonostante la diffusione del solvente all'interno del solido sia lenta e l'allontanamento del solvente dalla matrice sia difficile, l'estrazione solido-liquido continua ad essere quella che consente rese maggiori. Quando un solvente viene aggiunto ad un solido che contiene un soluto avvengono in sequenza i seguenti fenomeni (Figura 2.4):

1. il solvente diffonde dalla soluzione alla superficie del solido attraverso lo strato limite;
2. il solvente penetra nel solido bagnandolo e riempiendo tutte le microporosità in esso contenute e finendo per costituire al suo interno una *fase imbibente* continua, ossia capace di ridurre la tensione superficiale della soluzione in modo da favorirne la penetrazione nel materiale solido;
3. il soluto, disperso nel solido si scioglie nel solvente, creando così, all'interno del solido, una soluzione relativamente concentrata in soluto;
4. la differenza di concentrazione di soluto tra la soluzione relativamente concentrata, che è all'interno del solido, e quella diluita, che è all'esterno, genera una diffusione del soluto verso l'esterno;
5. il soluto diffonde verso la soluzione attraverso lo strato limite nella massa della soluzione;

La diffusione si arresta quando la concentrazione del soluto è la stessa nella soluzione che imbibisce il solido e in quella che bagna esternamente il solido (forza spingente nulla).

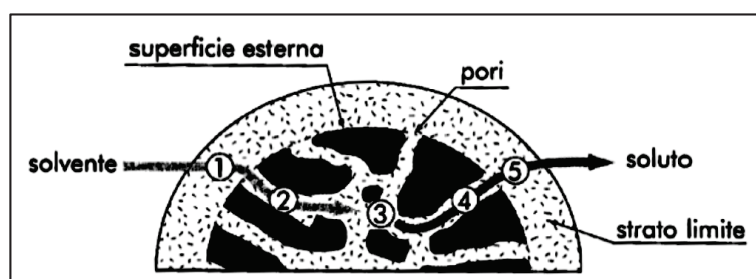


Fig. 2.4 - Schema di diffusione all'interno della matrice solida.

Riassumendo, dunque, si può dire che l'estrazione solido-liquido comprende due fasi principali: una che è regolata dal fenomeno fisico della diffusione del soluto che ha come obiettivo di pervenire all'equilibrio, cioè all'uguaglianza della concentrazione della soluzione imbibente e della soluzione libera, e una che è regolata dalla separazione meccanica di

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 2 – Metodi di estrazione del limonene

separazione della soluzione dai solidi e che ha come obiettivo di separare la maggiore quantità possibile di soluzione dai solidi.

La composizione del solvente scelto, ha effetto sulla quantità di componente estratto nel liquido e sulla velocità con cui esso viene estratto. Il criteri di scelta del tipo di solvente da impiegare sono molteplici:

- selettività: è la misura di quanto il soluto di interesse si scioglia preferibilmente nell'estratto rispetto agli altri componenti, come eventuali altri soluti;
- capacità del solvente: indica la massima concentrazione che il soluto può raggiungere in quel solvente. Maggiore è la capacità, minore è la quantità di solvente richiesta;
- tossicità, pericolosità e impatto ambientale. L'uso di materiali pericolosi richiede il ricordo ad accorgimenti e apparecchiature particolare per ridurre il rischio entro limiti accettabili e le emissioni entro i limiti di legge. L'uso di sostanze tossiche ad elevato impatto ambientale fa perciò lievitare sia i costi dell'investimento sia i costi di esercizio. La pericolosità è soprattutto da mettere in relazione con la più o meno facile infiammabilità, che può richiedere per gli impianti delle caratteristiche particolari alquanto costose. Sono anche da valutare le possibili tecniche di smaltimento dei reflui e la biodegradabilità;
- tensione di vapore: poiché l'estrazione prevede la successiva separazione dell'estratto in soluto e solvente, l'efficacia e il costo di questa operazione può dipendere dalla tensione di vapore del solvente in relazione del metodo scelto. Così se si decide di utilizzare la distillazione per recuperare il solvente, sarebbe desiderabile una tensione di vapore elevata o bassa a seconda che si voglia ottenere il solvente come prodotto di testa o di coda. In ogni caso, tanto più è alta la tensione di vapore tanto maggiore può risultare l'impatto ambientale, in relazione alla tossicità del solvente, per la maggiore facilità di un suo rilascio nell'ambiente. Inoltre calore specifico e calore latente influiscono sui costi energetici dell'operazione;
- stabilità termica: è in relazione alla necessità di operazioni a caldo per separare l'estratto. La stabilità termica influenza il consumo del solvente e la formazione di sottoprodotti, che devono a loro volta essere separati e che possono presentare tossicità e impatto ambientale superiori a quelli del solvente. Anche l'inerzia chimica è un fattore da considerare, in quanto influisce sulla scelta dei materiali di costruzione delle apparecchiature;

- viscosità: è bene che sia la più bassa possibile per favorire il trasporto di massa tra le due fasi. Per avere buone resi di estrazione è preferibile lavorare con solventi che abbiano una viscosità inferiore a 10 mPa·s;
- costo: è importante soprattutto in relazione al consumo di solvente.

2.4 Tecniche non convenzionali

2.4.1 Estrazione con CO₂ supercritica

La tecnica di estrazione con fluidi supercritici (FS) sfrutta le peculiari caratteristiche che un sostanza assume quando si trova in particolari condizioni di temperatura e pressione. In particolare, l'estrazione con CO₂ supercritica è una tecnica promettente per la produzione di sostanze di interesse farmacologico, profumi e aromi da matrici vegetali. In Figura 2.5 viene rappresentato il diagramma di fase della CO₂. L'estremo superiore della curva di equilibrio liquido-vapore viene identificato come *punto critico* di coordinate T_c (temperatura critica) e P_c (pressione critica). La CO₂ è il principale solvente utilizzato nell'estrazione con fluidi supercritici, in quanto non è infiammabile, né tossico e presenta il vantaggio di ottenere prodotti "solvent-free", ovvero privi di solvente. Essa infatti una volta ripristinate le condizioni ambiente ritorna nel suo stato gassoso e abbandona spontaneamente l'estratto.

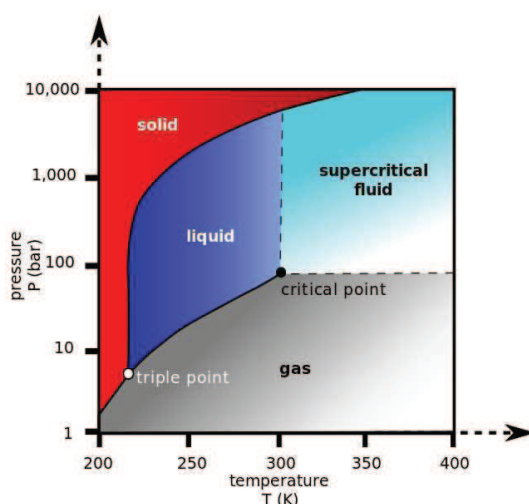


Fig. 2.5 - Diagramma di fase della CO₂.

La CO₂ in fase liquida e supercritica si presenta come un buon solvente verso soluti compatibili per polarità molecolare, ma in fase liquida non è possibile avere una sufficiente

selettività di estrazione. Al contrario, in fase supercritica è possibile modulare il potere solvente, normalmente correlato alla densità: piccole variazioni di pressione fanno variare notevolmente la densità, come messo in evidenza nel diagramma con andamento sigmoide riportato in Figura 2.6 dove, per $T=313.15\text{ K}$, per variazioni di pressione tra 9 e 70 MPa la densità del diossido di carbonio varia rapidamente tra 200 e 700 kg/m^3 acquisendo così un elevato potere solvente; la stessa cosa può dirsi della diffusività, della viscosità e della compressibilità (Reverchon, 1993).

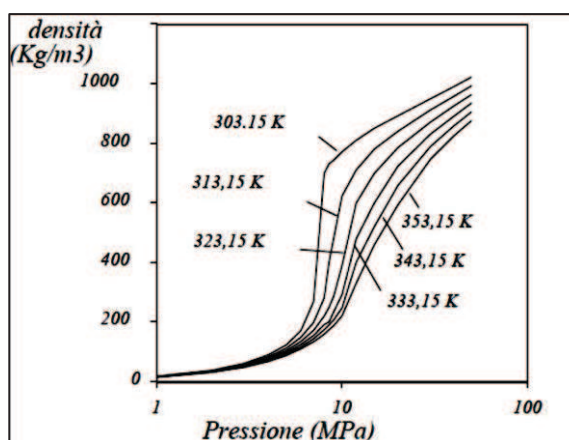


Fig. 2.6 - Densità della CO_2 in funzione della pressione, in prossimità del punto critico.

La conoscenza della solubilità non è comunque sufficiente a valutare la fattibilità dell'estrazione della sostanza con CO_2 supercritica da una matrice naturale, dove sono presenti più composti di solubilità confrontabile. Pur prescindendo dalla permeabilità della matrice naturale alla CO_2 , si deve considerare la selettività dell'estrazione, cioè la possibilità di estrarre la sostanza di interesse lasciando nella matrice la maggior parte dei composti indesiderati. La selettività di estrazione può essere modificata variando la polarità del solvente supercritico. Nel caso del diossido di carbonio, che è apolare, è possibile accrescere la polarità complessiva della fase supercritica dissolvendo in essa alcoli a basso peso molecolare o acqua.

2.4.2 Estrazione assistita da microonde

Le microonde sono radiazioni elettromagnetiche nella banda dello spettro elettromagnetico con lunghezza d'onda compresa tra le gamme superiori delle onde radio e la radiazione

infrarossa. Lo spettro delle microonde è definito solitamente nell'intervallo di frequenza compreso tra 1 GHz e 1000 GHz, ma altre definizioni includono frequenze minori. Tuttavia, la maggior parte delle applicazioni operano tra 1 e 40 GHz. L'uso di microonde con solventi trasparenti (es. esano) induce ad un aumento improvviso di temperatura all'interno della struttura cellulare, che contribuisce alla rottura delle pareti della cellula e conseguentemente il rapido rilascio dei costituenti presenti nella matrice solida. Inoltre, l'estrazione assistita da microonde (MAE, Microwave Assisted Extraction) permette l'uso di una quantità inferiore di solvente. Chemat et al. (2005) hanno confrontato un metodo di estrazione tradizionale con le microonde, a diversa potenza, le quale portano a estrarre un quantitativo maggiore di limonene (Figura 2.7).

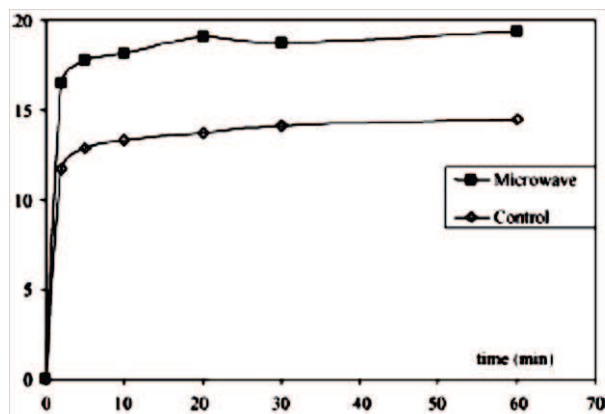


Fig. 2.7 - Confronto tra estrazione del limonene da matrici vegetali con microonde ed estrazione solido-liquido con Soxhlet (Chemat et al; 2005).

Studi recenti hanno evidenziato che abbinando l'idrodistillazione alle microonde è possibile ottenere rese maggiori. Si tratta del MAD (Microwave Accelerated Distillation), una combinazione di riscaldamento con microonde e distillazione. Questa tecnica, a differenza dell'idrodistillazione classica, possiede un tempo di estrazione molto più basso (30 minuti contro 4 ore) e delle rese in prodotto maggiori (MAD: 0.42%, HD: 0.39%).

2.4.3 Estrazione con solvente assistita da ultrasuoni

Gli ultrasuoni sono onde meccaniche sonore con frequenze superiori a quelle mediamente udibili da un orecchio umano (20 Hz-20000 Hz), largamente usate per migliorare l'efficienza dei processi estrattivi da matrici vegetali (Shirsath et al., 2012). La frequenza convenzionalmente utilizzata per discriminare onde sonore da onde ultrasoniche è fissata in

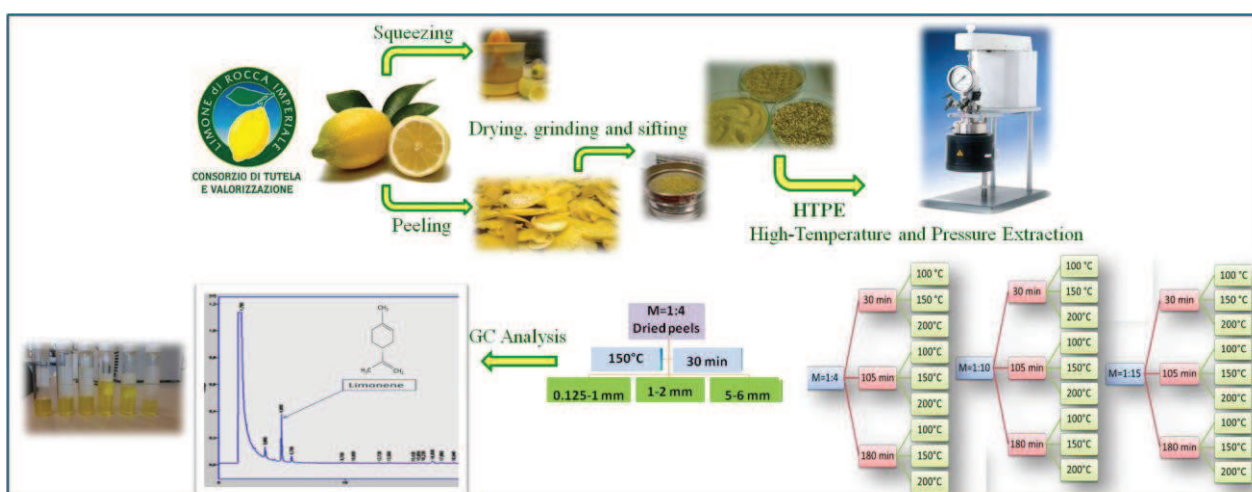
Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 2 – Metodi di estrazione del limonene

20 kHz. Queste frequenze sono normalmente generate per mezzo di materiali con determinate caratteristiche meccanico-elettriche, detti materiali piezoelettrici, come il quarzo o titanato di bario, in grado di generare una differenza di potenziale se compressi o stirati in senso trasversale, viceversa se applicata una differenza di potenziale ai loro estremi questi si comprimono o dilatano in senso trasversale. Quest'ultima caratteristica viene sfruttata proprio per generare gli ultrasuoni. In base al materiale scelto avremo, quindi, diverse frequenze di ultrasuoni, diverse propagazioni nei materiali e quindi diverse caratteristiche di potenza della macchina generatrice. Sono stati portati avanti studi sull'estrazione con solvente assistita da ultrasuoni del limonene dai semi dei carvi impiegando gli ultrasuoni (UAE, Ultrasound Assisted Extraction) (*Chemat et al., 2004*) ed è emerso che il solo trattamento di ultrasuoni risulta valido, in termini di resa in limonene, rispetto alla tecnica tradizionale (Soxhlet) solo per bassi tempi (10 min); ciò è dovuto al fatto che il limonene è un componente molto volatile per cui nel tempo si allontana facilmente anche dalla soluzione dell'estratto. Per tale motivo studi successivi si sono basati su tecniche combinate per raggiungere le condizioni di resa migliori.

Capitolo 3

Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

(C. G. Lopresto, F. Petrillo, A. A. Casazza, B. Aliakbarian, P. Perego, V. Calabrò, *A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction.* Separation and Purification Technology, 2014 → **Appendice C**)



3.1 Obiettivi del lavoro

Nonostante il gran numero di possibili tecniche di estrazione, non esiste un metodo standard per l'estrazione di composti bioattivi da matrici vegetali (*Sasidharan et al., 2011*) e la distillazione è ancora il principale metodo per ottenere oli essenziali su scala industriale. Tuttavia, l'uso di un solvente – e in particolare di esano – può portare all'estrazione di oli essenziali con proprietà diverse rispetto a quelli ottenuti mediante distillazione (*Bélanger et al., 1997; Pino et al., 1997; Pino et al., 1997; Pino et al., 1999; Gámiz-Gracia & Luque de Castro, 2000; Bailer et al., 2001; Schaneberg & Khan, 2002; Damjanovic et al., 2003; Sokkar, 2008; Monsálvez et al., 2010*). Poiché l'esano è il solvente maggiormente usato per estrarre oli da fonti vegetali, l'estrazione con esano di oli essenziali – e in particolare di d-limonene – da bucce di agrumi potrebbe essere un efficiente metodo in larga scala per tutte

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

quelle applicazioni che non richiedono alte qualità e purezza del prodotto estratto. Inoltre, Nguyen (2012) ha studiato quattro diversi solventi (esano, diclorometano, dietil etere ed etil acetato) e ha trovato che proprio l'esano era il solvente più efficiente nell'estrazione di d-limonene da bucce di arance nella classica estrazione solido-liquido. L'estrazione di oli essenziali, impiegando l'esano come solvente, è stata introdotta nel 1930 e non è stato evidenziato alcun rischio sulla salute umana se ingeriti alimenti che contengono piccolissime tracce di esano. Per tale motivo l'estrazione con esano di oli è stato definito un processo sicuro. Nella tabella 3.1 si riportano le specifiche accettabili di esano residuo in alimenti selezionati.

Tab. 3.1 - Limiti di concentrazione di esano ammissibili negli alimenti.

<i>Concentrazione ammissibile di esano</i>	<i>Alimenti</i>
10 mg/kg	Cibi che contengono prodotti proteici e farine prive di grassi
30 mg/kg	Prodotti di soia privi di grassi
25 mg/kg	Oli Essenziali
2.2% (wt.)	Estratto del luppolo

È stato stabilito, dunque, che per quantità inferiori a 25 mg di esano su un chilogrammo di oli essenziali l'alimento non presenta alcun rischio sulla salute umana.

Tuttavia, l'estrazione con esano di limonene da bucce di limone non è mai stata studiata in modo rigoroso. Perciò, l'obiettivo di questo lavoro è stato lo studio di un metodo non convenzionale per estrarre il limonene da bucce di limone ad alta pressione e alta temperatura (HPTE) in un reattore PARR 4560 (PARR Instrument Company, Moline, USA). È stato studiato l'effetto della temperatura, del tempo di estrazione e del rapporto matrice/solvente al fine di trovare le condizioni operative ottimali. È stato analizzato anche l'effetto della dimensione delle particelle e dell'umidità della matrice di partenza, dal momento che la resa e il contenuto degli oli essenziali varia significativamente in funzione dei pretrattamenti e dei metodi di essiccazione (Kamal *et al.*, 2011). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante un metodo tradizionale (estrazione Soxhlet con esano) e un altro metodo non convenzionale (estrazione con solvente preceduta da sonicazione). Infine, l'idrodistillazione in un sistema Clevenger è stata utilizzata per determinare il tenore totale di oli essenziali nelle bucce del frutto (Fehrat *et al.*, 2006).

3.2 High Pressure and Temperature Extraction (HPTE)

Il metodo HPTE è stato già adottato con successo per estrarre composti fenolici da residui della lavorazione dell'uva (*Casazza et al., 2010; Casazza et al. 2012; Sessa et al., 2013*), dell'olio d'oliva (*Aliakbarian et al., 2011*) e dalle foglie di *Agave americana* (L.) (*Ben Hamissa et al., 2012*). L'estrazione mediante liquido pressurizzato (PLE) è stata descritta da *Richter et al. (1996)* e suscita un grande interesse, perché l'alta pressione favorisce il processo estrattivo e reduce il tempo di estrazione e l'uso di solvente (*Kaufmann and Christen, 2002*). L'alta temperatura, invece, aumenta la solubilità e la velocità di diffusione e porta a una riduzione della viscosità e della tensione superficiale dei solventi, migliorando in tal modo la velocità di estrazione (*Azmir et al., 2013*).

Nel PARR (Figura 3.1) il solvente e la matrice vengono a contatto diretto all'interno della camera di estrazione, il cui volume cambia a seconda della tipologia di reattore di cui si dispone. La camera raggiunge la temperatura di estrazione mediante una piastra e questo aumento di temperatura in un ambiente inerte ottenuto mediante insufflazione di azoto, al fine di evitare l'ossidazione e la denaturazione del limonene estratto. Il sistema è sottoposto ad agitazione (200 rpm), la quale fa diminuire lo spessore dello strato limite, garantisce una maggiore omogeneità nella soluzione e migliora lo sfruttamento dell'area interfacciale prevenendo la sedimentazione del solido.



Fig. 3.1 - Reattore PARR 4560.

La performance dell'HPTE è influenzata da alcune importanti variabili, quali la temperatura, la granulometria, il tempo di estrazione e il rapporto matrice/solvente. Al diminuire delle

dimensioni delle particelle aumenta l'area interfacciale, si accorciano i percorsi diffusivi all'interno dei pori e aumenta la velocità di diffusione, ma aumentano anche le perdite di carico e le difficoltà di separazione solido-liquido a valle dell'estrazione. All'aumentare del tempo di contatto aumenta la quantità di soluto estratto, ma diminuisce la forza spingente. Tuttavia, tempi lunghi non implicano sempre maggiori rese, soprattutto se si ha a che fare con componenti particolarmente volatili e facilmente ossidabili, quali il limonene e altri componenti degli oli essenziali. Inoltre è possibile che all'interno della camera determinate condizioni di pressione e temperatura diano luogo a reazioni collaterali che alterano la composizione finale dell'estratto. Infine, per quanto riguarda il rapporto matrice/solvente, aumentando il quantitativo di solvente è possibile estrarre un quantitativo di soluto maggiore fin tanto che non si raggiunge la concentrazione di saturazione; a quel punto un aumento di questo rapporto non genera rese migliori nel principio attivo che si vuole estrarre.

3.3 Materia prima: bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

La materia prima è stata fornita dal laboratorio del centro ricerche ENEA Trisaia (Rotondella, PT) e sarà descritta nel par. 4.2 del successivo paragrafo in cui si descriverà il lavoro svolto proprio all'ENEA. Il campione di analisi è costituito da limoni "primo fiore" di Rocca imperiale di IGP raccolti nel periodo di dicembre 2012. Prima della pelatura i limoni sono stati sottoposti a lavaggi in flusso di acqua corrente e di acqua demineralizzata, per allontanare eventuali sporcizie. La pelatura è stata realizzata totalmente a mano, con un semplice coltello da cucina, permettendo così di decorticare gli agrumi asportando solo il flavedo e cercando di danneggiare il meno possibile le sacche oleifere contenenti gli oli essenziali, che sono caratterizzate da pareti molto sottili e fragili. Parte delle bucce fresche sono state poi sottoposte a idrodistillazione e a estrazione con solvente per valutare l'effetto dell'umidità in questo processo. Al fine di effettuare l'estrazione con solvente organico del limonene contenuto nelle bucce di limone, è necessario essiccare i campioni da caricare nell'estrattore. Dati di letteratura (*Mira et al, 1996*) riportano che la temperatura ottimale di essiccamento è di circa 323 K, un valore relativamente basso per evitare la decomposizione termica e la degradazione dei composti termolabili presenti negli oli. Le bucce di limone fresche vengono così introdotte in un essiccatore, investite longitudinalmente da aria a 323 K

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

per 10-12 ore, ottenendo una matrice con un contenuto basso di umidità, la cui attività è di circa il 3%, determinata attraverso l'utilizzo di un misuratore di attività (AQUALAB CX3).

Le bucce essiccate sono state ridotte nelle dimensioni desiderate mediante un frullatore elettrico BLENDOR, avendo la massima cura di evitare surriscaldamenti che potrebbero alterarne la composizione. Per avere una distribuzione quanto più possibile uniforme delle dimensioni delle bucce essiccate, queste sono state setacciate per mezzo di setacci meccanici (ENDECOTTS) disposti in serie, ognuno dei quali trattiene la frazione di solido i cui granuli hanno dimensione maggiori dei fori del setaccio, corrispondenti alla dimensione desiderata. Sono state così ottenute tre granulometrie: $125\mu\text{m}\div 1\text{mm}$, $1\text{mm}\div 2\text{mm}$ e con la lettera C il campione con $5\text{mm}\div 6\text{mm}$.

3.4 Definizione del piano sperimentale

3.4.1 HPTE

Lo studio dell'effetto del tempo di estrazione, della temperatura e del rapporto matrice/solvente sulla resa di estrazione viene condotto su un campione con la distribuzione granulometrica riportata nella seguente tabella.

Tab 3.2 - Distribuzione granulometrica del campione alimentato.

($125\mu\text{m}\div 1\text{mm}$)	33.5%
($1\text{mm}\div 2\text{mm}$)	66.5%

Al termine del tempo di estrazione prefissato il reattore è stato raffreddato rapidamente e la fase liquida e la fase solida sono state separate per centrifugazione a 7500 rpm per 10 min mediante una centrifuga ALC PK131 Centrifuges (Alberta, Canada).

La programmazione sperimentale delle prove HPTE si basa da ciò che è emerso dai dati di letteratura di altre tecniche di estrazione e sulle caratteristiche chimico-fisiche del solvente e del soluto; in particolare, si sceglie di iniziare da un tempo medio di estrazione tra le diverse tecniche suggerite dalla letteratura (ultrasuoni, microonde, Soxhlet ecc.), ossia 105 minuti, si sono effettuate estrazioni per tre diverse temperature e per tre differenti rapporti matrice/solvente. La scelta della temperatura si basa sulle caratteristiche del solvente utilizzato e su quelle del limonene; in particolare si sceglie, in prima istanza, un valore di temperatura che possa far evaporare l'esano, che ha un temperatura di ebollizione di 69 °C,

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

ma che non faccia evaporare il limonene che ha una temperatura di ebollizione di 178°C. Per tale motivo le prove vengono fatte a partire da 150°C per poi valutare la resa a temperature inferiori e superiori a questo valore (100°C e 200°C).

Per quanto riguarda il rapporto matrice/solvente, dalla letteratura, per estrazioni classiche a ricadere (percolazione), viene suggerito un rapporto pari a 1:4 (w/w); successivamente si aumenta il quantitativo di solvente (M=1:10 e M=1:15) per valutare se effettivamente si riesce ad estrarre più limonene oppure si raggiunge la concentrazione di saturazione.

Per gli stessi valori di temperatura e rapporto matrice/solvente sopra indicati, si effettuano le estrazioni per un tempo inferiore e un tempo superiore a 105 minuti, ossia rispettivamente a 30 minuti e a 180 minuti.

Di seguito si riporta uno schema con le prove di estrazione effettuate con reattore ad alta pressione ed alta temperatura (HPTE) su matrice secca per le diverse variabili impiegate (Figura 3.2).

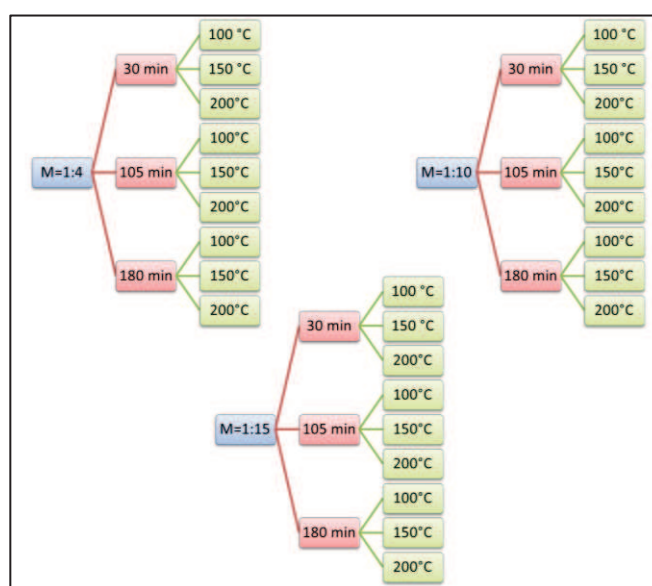


Fig. 3.2 Schema prove HPTE su matrice secca di dimensioni note.

Lasciando fissato il rapporto di alimentazione (M=1:4) e fissando anche le migliori condizioni di tempo e temperatura ricavate dallo studio preliminare di estrazione si è deciso di caricare nel reattore la matrice umida, ossia bucce di limone fresche finemente macinate, non considerando alcuna granulometria.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

Relativamente all'effetto delle dimensioni delle particelle, si procede con l'estrazione da matrice secca con tre diverse granulometrie per un determinato rapporto matrice/solvente ($M=1:4$) e per le condizioni di temperatura e tempo migliori.

3.4.2 Estrazione Soxhlet

Il vantaggio principale del sistema Soxhlet consiste nell'impiego di una minima quantità di solvente, grazie ad una sua continua purificazione e distillazione dopo ogni passaggio effettuato attraverso la matrice. Il problema è che si tenta di estrarre un componente volatile, quale il limonene, e questa metodica di estrazione facilita il suo allontanamento.

Anche per l'estrazione Soxhlet la dimensione della matrice gioca un ruolo fondamentale in termini di resa in limonene e si è deciso di lavorare con la granulometria più piccola ($125\mu\text{m}\div 1\text{mm}$). Per quanto concerne il rapporto matrice/solvente, si fa riferimento al rapporto fornito dalla letteratura e pari a 1:25, poiché quest'ultimo non rappresenta una variabile fondamentale per l'estrazione. Le prove sono state effettuate caricando il pallone a fondo tondo con 2 grammi di matrice essiccata e 50 grammi di esano. Il pallone viene collegato agli altri organi che costituiscono il Soxhlet e posto su una piastra riscaldante ad una temperatura di circa 100°C , in modo tale da assicurare l'evaporazione del solvente. Si opera con un tempo di estrazione pari a 4 ore dalla visione del fronte di condensazione all'interno del Soxhlet. Per cui il processo dura complessivamente più di 4 ore considerando il raggiungimento della temperatura e la successiva prima condensazione del solvente.

3.4.3 Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE)

L'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE, Ultrasound Assisted Extraction) consiste nella classica estrazione del limonene mediante percolazione su matrice immersa nel solvente e previamente trattata con ultrasuoni in un sonicatore (modello UTA 90).

Per questo tipo di estrazione è stato utilizzato un rapporto matrice/solvente pari a 1:4 con una granulometria $125\mu\text{m}\div 1\text{mm}$, nonostante per gli ultrasuoni la granulometria non sia importante ai fini della resa dell'estratto (Naviglio & Ferrara, 2008). Matrice e solvente sono stati caricati in un pallone posto nel bagno a ultrasuoni a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente il pallone è stato collegato al condensatore e posto su una piastra riscaldante

fino alla temperatura di ebollizione del solvente per 60 minuti. L'acqua di ricircolo che fluisce nel condensatore possiede una temperatura tale da ricondensare il solvente che ricade all'interno del pallone, secondo una classica percolazione (Figura 3.3).



Fig. 3.3 - Estrazione convenzionale mediante percolazione.

3.5 Analisi dei campioni

La valutazione della quantità di limonene estratto è stata fatta mediante un gas-cromatografo modello DANI GC 1000 DPC. Il programma di temperatura della colonna utilizzato nel metodo di rilevazione del limonene, comincia con una fase isoterma iniziale a 60°C della durata di 1 min, cui segue prima un gradiente lineare di 5°C/min fino a 175°C e poi un successivo gradiente lineare sempre di 5°C/min fino a 210°C; segue poi una fase isoterma di 7 min a 210°C, per una durata complessiva della corsa di 39 min. La temperatura della camera di iniezione deve essere tale da vaporizzare l'intera miscela di composti, quindi deve essere superiore alla temperatura di ebollizione del composto più altobollente. Di conseguenza, è stata impostata la temperatura dell'iniettore pari a 250°C. La scelta del gas di trasporto dipende in misura preponderante dal tipo di rivelatore utilizzato, ma va tenuto presente che l'efficienza aumenta utilizzando gas con peso molecolare elevato. In questo lavoro è stato impiegato come gas di trasporto azoto puro (N₂). La portata del gas eluente (carrier) ha influenza sull'efficienza della colonna, sui tempi di ritenzione e sulla risposta del rivelatore. In linea di massima il tempo di ritenzione è inversamente proporzionale alla velocità media del gas di trasporto. Il rivelatore produce segnali inversamente proporzionali al volume di gas che passa, quindi l'area del picco diminuisce con l'aumentare della portata. Il flusso dell'azoto è stato impostato fissando la pressione a 0.6 bar. Gli estratti ottenuti sono stati diluiti in esano (fattore di diluizione 1:10), pertanto nel calcolo della concentrazione iniziale

del campione, bisognerà tener conto di questo trattamento, sapendo che la densità dell'esano è pari a 0.658 g/cm^3 . Per quanto riguarda l'iniezione, è stata scelta la tecnica a split in cui è necessario fissare il rapporto di splittaggio (1:20), solo una parte del campione alimentato va in colonna per evitare la saturazione. Mediante una micro siringa da $10 \mu\text{l}$ si inietta $1 \mu\text{l}$ di campione opportunamente diluito. Un tipico cromatogramma ottenuto dall'analisi degli estratti effettuati in laboratorio è mostrato in Figura 3.4, dove in ordinate è riportata la risposta del rilevato in mV e in ascisse i tempi di uscita delle varie sostanze.

Per fare un'analisi quantitativa dei campioni estratti è stato necessario costruire una retta di taratura per individuare la concentrazione di limonene presente nell'estratto a partire da concentrazioni note di una soluzione limonene-esano.

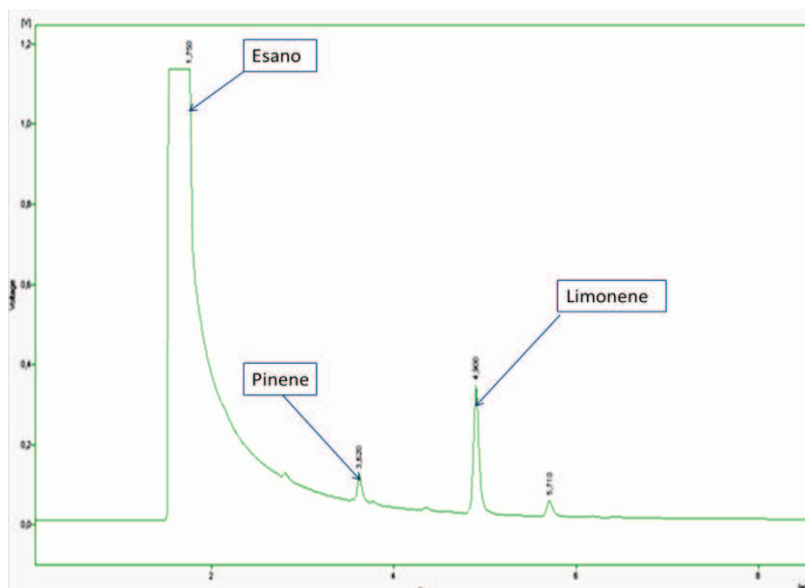


Fig. 3.4 - Esempio di una parte del cromatogramma dei campioni analizzati con DANI GC1000 DPC.

3.6 Risultati e discussione

3.6.1 HPTE

Al fine di far emergere le condizioni di tempo e temperatura di estrazione tali da consentire la resa in limonene più alta, i risultati sono stati suddivisi in base al rapporto matrice/solvente.

Fissando il rapporto matrice/solvente (M) pari a 1:4, sono stati variati tempo di estrazione e temperatura e la resa ottenuta in corrispondenza di ogni condizione è riportata nella seguente Figura 3.5.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

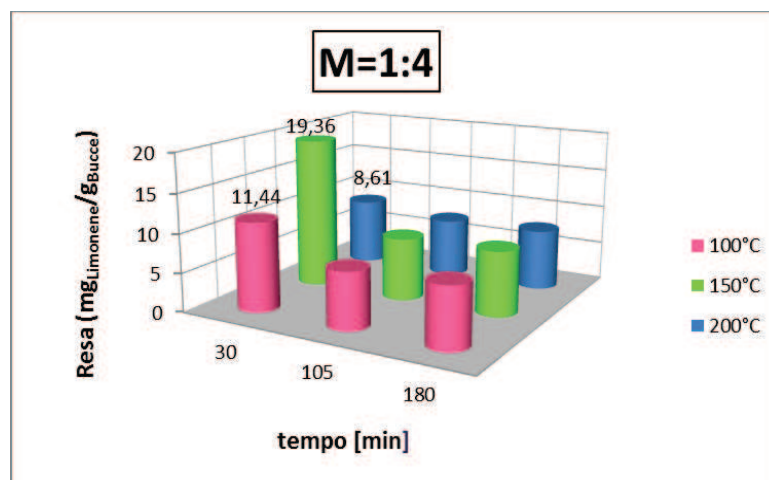


Fig. 3.5 - Resa in limonene al variare del tempo e della temperatura di estrazione per M=1:4.

Per M pari a 1:4 le condizioni operative ottimali corrispondono a un tempo di estrazione di 30 minuti e a una temperatura di 150°C. È evidente che il tempo incide significativamente sulla resa di estrazione e il limonene, essendo molto reattivo, lasciato libero per tempi più lunghi tende a dare differenti prodotti di degradazione. A tal proposito si potrebbe operare a tempi inferiori ai 30 minuti, ma il reattore impiegato non consente tale studio, in quanto per raggiungere la temperatura desiderata sono necessari 20 min di start-up.

Dalla figura si può inoltre notare come il tempo giochi un ruolo fondamentale per tutte e tre le temperature di estrazione, addirittura per tempi superiori ai 30 minuti la resa sembrerebbe non essere più influenzata dalla temperatura (un'analisi statistica dettagliata permetterà, in seguito, di confermare questo concetto).

Se da un lato le alte temperature degradano il prodotto, dall'altro aumentano l'efficienza estrattiva, aumentando il coefficiente di diffusione; contemporaneamente per l'impianto usato, ad un aumento di temperatura corrisponde un aumento di pressione che facilita la fuoriuscita del componente di interesse dalla matrice. Di seguito si riporta la Tabella 3.3 con i valori di pressione raggiunti per ogni prova a diversa temperatura e tempo di estrazione.

Tab. 3.3 - Pressione di esercizio per le prove HPTE a diversa temperatura di estrazione per M=1:4.

Pressione _{estrazione}	T=100°C	T=150°C	T=200°C
t=30 min	2 bar	6 bar	15 bar
t=105 min	3 bar	8 bar	17 bar
t=180 min	3 bar	8 bar	18 bar

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

Il valore di pressione evidenziato in verde indica le migliori condizioni in termini di resa dell'estratto. Il fatto che nella camera di estrazione si possono raggiungere pressioni leggermente più alte di quella atmosferica porta un vantaggio per tempi bassi di estrazione e per una temperatura di 150°C, poiché probabilmente tale pressione è in grado di rompere le tasche lisigene della matrice che contengono il componente di interesse, permettendo all'esano di solubilizzare quest'ultimo.

Analogamente al caso di M pari a 1:4, sono state condotte le prove sperimentali fissando M pari a 1:10, ottenendo i risultati riportati nella seguente figura.

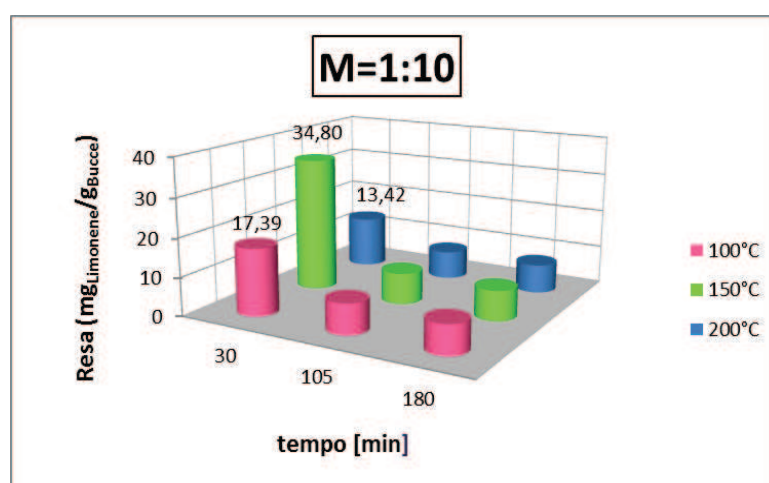


Fig. 3.6 Resa in limonene al variare del tempo e della temperatura di estrazione per M=1:10.

Anche in questo caso si ottengono le rese migliori a tempi brevi; per quanto concerne la temperatura, si può notare che, come atteso, i 150°C consentono l'estrazione di una quantità maggiore di limonene ma, a differenza del caso precedente (M=1:4), si ha un aumento della resa del 79.7%, perché si sta alimentando più solvente in grado di solubilizzare il componente di interesse. Dalla Tabella 3.4 si può notare l'incremento di pressione, che però non incide sull'aumento della resa finale dell'estratto rispetto al caso precedente.

Tab. 3.4 - Pressione di esercizio per le prove HPTE a diversa temperatura di estrazione per M=1:10.

Pressione _{estrazione}	T=100°C	T=150°C	T=200°C
t=30 min	2 bar	7 bar	16 bar
t=105 min	3 bar	9 bar	18 bar
t=180 min	3 bar	9 bar	18 bar

Infine, fissando M pari a 1:15 si ottengono i seguenti risultati mostrati in Figura 3.7.

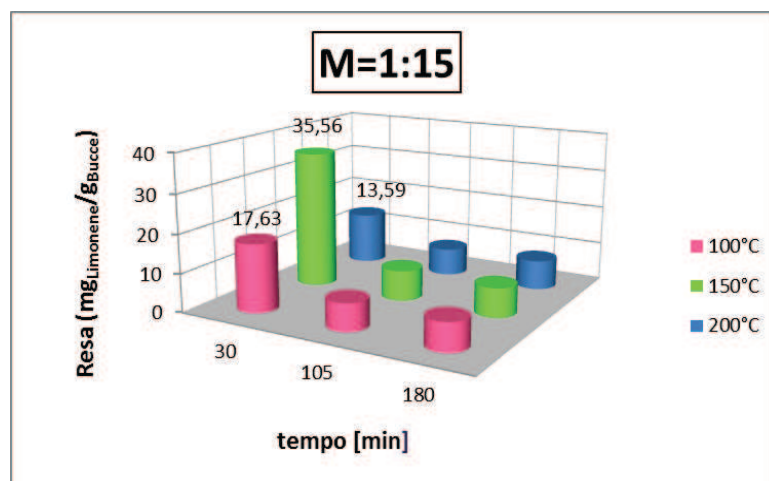


Fig. 3.7 Resa in limonene al variare del tempo e della temperatura di estrazione per M=1:15.

Come atteso, anche in questo caso la resa più alta si ottiene operando ad una temperatura di 150°C e per bassi tempi di estrazione.

Una prima valutazione porterebbe a scegliere M=1:15 come rapporto ottimale, ma ponendo l'attenzione sui costi del solvente e sull'effettiva differenza che c'è tra la resa a M=1:10 e M=1:15 per 150°C, la scelta ricade su un'altra condizione. Aumentando il rapporto M per 150°C si ha un aumento della resa di circa il 2%, e una percentuale così bassa suggerisce la possibilità di aver raggiunto una concentrazione di saturazione tra esano e limonene. Quindi, utilizzare un rapporto più alto di 1:10 significherebbe impiegare 5 grammi di esano in più per ogni grammo di matrice alimentata per recuperare una quantità di limonene molto più bassa rispetto a quello che si riesce a recuperare alimentando 10 grammi di esano per grammo di buccia secca.

Come evidenziato nei capitoli precedenti, l'umidità gioca un ruolo fondamentale nei processi di estrazione con solvente, poiché potrebbe ostacolare la diffusione del solvente all'interno della matrice e dell'estratto all'esterno della matrice. È stata rilevata un'umidità della matrice pari al 69%; tale percentuale è stata utilizzata per rendere il valore della resa finale dimensionalmente omogeneo con i dati di resa già indicati ($\text{mg}_{\text{limonene}}/\text{g}_{\text{buccia.secca}}$). Le prove HPTE su bucce umide sono state effettuate alla temperatura di 150°C e per un tempo di 30 minuti, condizioni risultate migliori dall'analisi degli estratti dalle bucce secche. I risultati

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

sono stati confrontati con le prove di estrazione HPTE effettuate su matrice secca alla stessa temperatura, stesso tempo di estrazione e stesso rapporto matrice/solvente, con l'obiettivo di valutare se la presenza di umidità altera il processo di estrazione in termini di resa finale del prodotto (Figura 3.8).

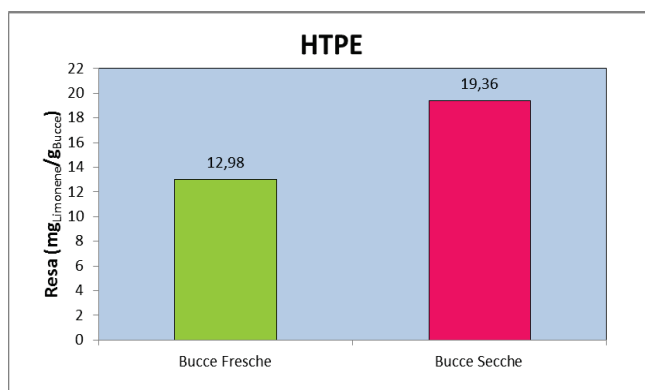


Fig. 3.8 - Effetto dell'umidità sulla resa finale dell'estratto ottenuto con HPTE.

È possibile notare come ci sia un aumento del 49% della resa finale se si opera il processo di estrazione su una matrice preventivamente essiccata. Nonostante la matrice essiccata subisca un trattamento termico che potrebbe aver denaturato parte del prodotto di interesse l'acqua presente nella matrice umida non consente di estrarre facilmente il limonene presente nelle bucce; per cui risulta vantaggioso lavorare con bucce essiccate piuttosto che estrarre direttamente dalla buccia di limone tal quale.

Per valutare l'effetto della granulometria sul metodo di estrazione non-convenzionale, HPTE, del limonene si sono utilizzate tre diverse distribuzioni granulometriche della matrice (0.125-1 mm, 1-2 mm, 5-6 mm); l'estrazione è stata portata avanti nelle condizioni di tempo e temperatura migliori (30 min, 150°C) e per un rapporto matrice/solvente pari a 1:4. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti nelle stesse condizioni di temperatura, tempo e rapporto M ma con la distribuzione granulometrica 125µm÷1mm (33.5%) + 1mm÷2mm (66.5%), come mostrato in Figura 3.9. È evidente che la resa di estrazione aumenta in modo regolare con la diminuzione delle dimensioni delle particelle.

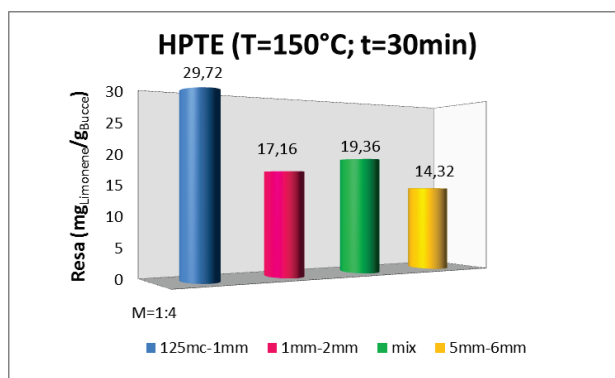


Fig. 3.9 - Confronto tra le rese in limonene per le diverse granulometrie.

3.6.2 Estrazione Soxhlet

Con lo scopo di confrontare le rese ottenute con HPTE con quelle ottenute con una metodica classica di estrazione, è stato impiegato un estrattore Soxhlet. Per questo metodo convenzionale di estrazione si è considerato un rapporto di alimentazione di 1:25 (w/w), alla temperatura di ebollizione del solvente e per un tempo di estrazione di 240 minuti. La resa finale è risultata pari a 9.47 mg_{limonene}/g_{bucce secche} e difficilmente può essere migliorata, dal momento che il Soxhlet non permette di agire su molte variabili. La temperatura di estrazione non può essere variata in quanto dipendente dal solvente impiegato (l'esano bolle a circa 70°C). Aumentare il tempo di estrazione non è conveniente dal punto di vista impiantistico; l'obiettivo è quello di estrarre il maggior quantitativo di limonene nel minor tempo possibile, poiché anche il tempo ha un "costo". I motivi appena descritti spingono ad abbandonare questo metodo convenzionale di estrazione e puntare su metodi di estrazione con solvente più veloci e con rese molto più elevate.

3.6.3 Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE)

Dalla letteratura è emerso come non sia possibile estrarre con la sola tecnica di ultrasuoni (Lagha et al.), per tale ragione si usa come abbinamento ad un metodo di estrazione convenzionale, quale la percolazione. La resa ottenuta con un rapporto matrice/solvente pari a 1:4 per un tempo totale pari a 90 minuti (30 minuti di sonicazione + 60 minuti di percolazione) su matrice con granulometria 0.125 mm – 1 mm, è stata pari a 33.47 mg_{limonene}/g_{bucce secche}, più alta di circa il 70% rispetto all'estrazione Soxhlet, nonostante un tempo di estrazione inferiore (150 minuti in meno).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

3.6.4 Confronto tra i diversi metodi di estrazione

In seguito alle informazioni ricevute dal laboratorio di chimica analitica dell'ENEA, si è visto che mediante idrodistillazione, effettuata con il processo Clevenger, è possibile allontanare dalla matrice tutti gli oli essenziali presenti. Sulla base di questo, gli oli ottenuti sono stati sottoposti ad analisi al gas-cromatografo con l'obiettivo di rilevare il quantitativo totale di limonene presente nelle bucce di limone. Gli oli ottenuti hanno rilevato una percentuale in limonene pari a 5.64%, ossia 56.4 milligrammi di limonene per grammo di buccia secca. Considerando tale valore come il quantitativo di limonene massimo presente nelle bucce è possibile individuare il recupero in limonene di ogni metodo di estrazione evidenziato in questo lavoro (Figura 3.10).

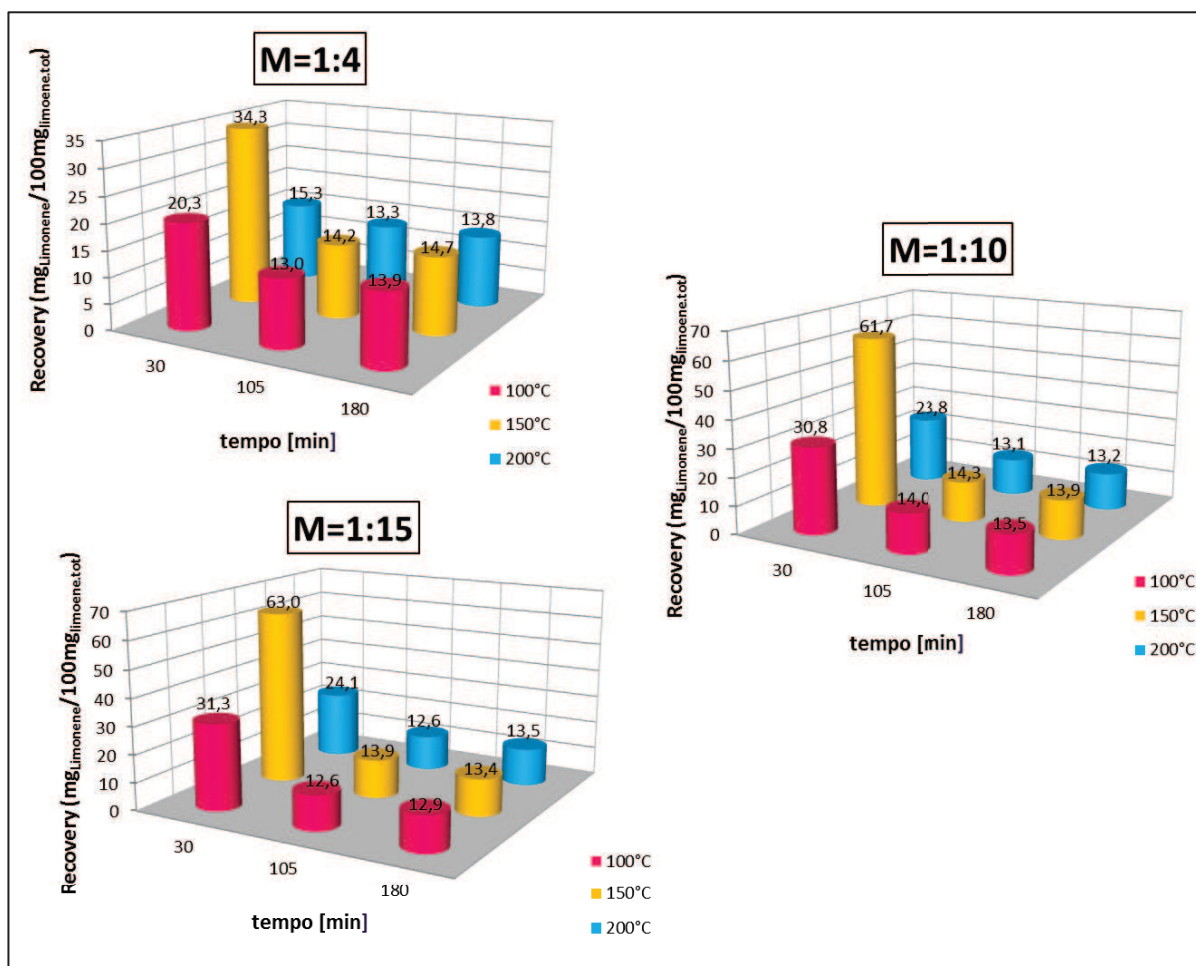


Fig. 3.10 - Recupero limonene estratto dalle bucce di limone mediante HPTE.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

Dai grafici riportati in Figura 3.10 si evidenzia un recupero di limone del 63% nelle migliori condizioni di tempo e temperatura (30 minuti, 150°C) e per un rapporto matrice/solvente pari 1:15. Per tempi maggiori di 30 minuti è possibile notare come non ci sia un recupero elevato, e quest'ultimo resta quasi costante oscillando tra il 13 e 14%.

Il lieve innalzamento della pressione all'interno della camera di estrazione è sufficiente a 150°C per raggiungere un recupero che supera il 60%.

Dalla Figura 3.11 si evidenzia come anche gli ultrasuoni, insieme all'HPTE, portano a recuperi di circa il 60%, contro il 16,8% di limonene recuperato con il Soxhlet.

Tutte le tecniche usate in questo lavoro sono state confrontate a parità di granulometria (0.125 mm – 1 mm), mentre il tempo e la temperatura hanno il valore che garantisce la performance migliore per le diverse tecniche (Figura 3.12).

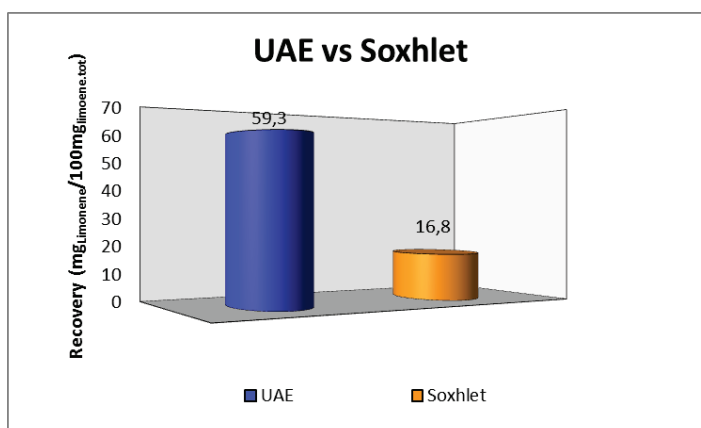


Fig. 3.11 - Recupero limonene estratto dalle bucce di limone mediante UAE e Soxhlet.

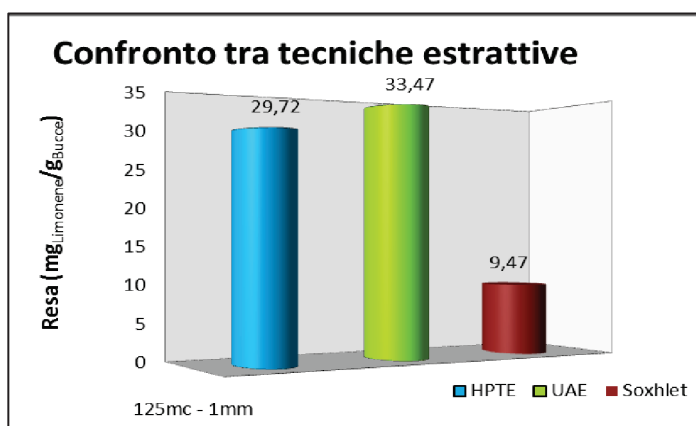


Fig. 3.12 - Confronto tra la resa di HPTE, Soxhlet e UAE.

Infine, il confronto in termini di recupero del limonene rispetto alla quantità totale presente nelle bucce di limone è mostrato in Figura 3.13.

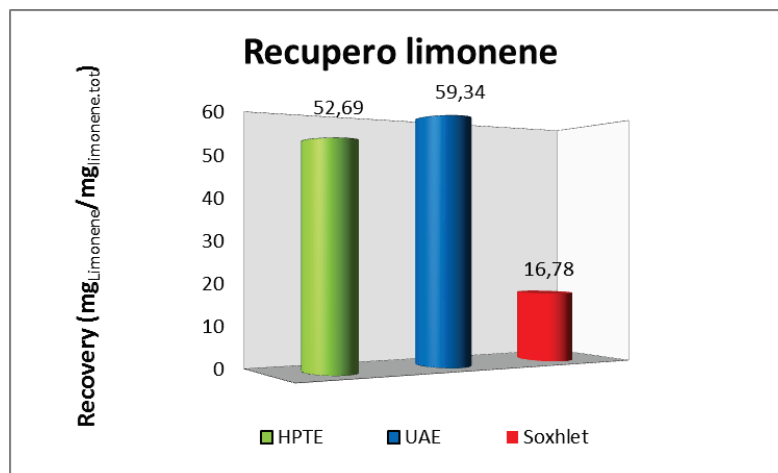


Fig. 3.13 - Confronto tra il recupero mediante HPTE, Soxhlet e UAE.

Confrontando le tecniche non convenzionali (HPTE e UAE) con la classica estrazione Soxhlet, è evidente una riduzione dei costi a vantaggio dei metodi non tradizionali, in termini sia di consumo di solvente, sia di tempo, sia di energia. L'energia richiesta è pari a 2.5 kWh per l'estrazione Soxhlet (1250 kWh/kg_{bucce secche}) – senza considerare la circolazione continua di acqua di raffreddamento – e 0.6 kWh (60 kWh/kg_{bucce secche}) per l'HPTE.

3.7 Analisi statistica

3.7.1 Modello ANOVA

L'analisi statistica ANOVA è stata eseguita per valutare i risultati sperimentali e individuare quale dei fattori coinvolti nel processo influenza maggiormente la variabile di risposta (resa in limonene) e in che misura. Nello specifico è stato eseguito il test F, con l'ausilio del software R. Si è ricorsi alla *multi-way ANOVA* per identificare i fattori che influenzano significativamente la resa in limonene, considerando un valore di probabilità $p \leq 0.05$ per individuare le differenze significative da un punto di vista statistico. I risultati hanno confermato che tutti e tre i fattori (tempo, temperatura e rapporto matrice/solvente M) e le loro combinazioni incidono in modo significativo sulla resa di estrazione, come mostrato in Tabella 3.5.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
 Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

Tab. 3.5. Three-way ANOVA (T=temperatura; t=tempo di estrazione; M=rapporto matrice/solvente).

Fonte di varianza	Gradi di libertà	Devianza	Varianza	F	p-value
T	2	6.0966	3.0483	2250	<0.0001
t	2	23.6817	11.8408	8741	<0.0001
M	2	1.4624	0.7312	539.8	<0.0001
T:t	4	10.3526	2.5881	1911	<0.0001
T:M	4	0.4581	0.1145	84.55	<0.0001
t:M	4	3.3836	0.8459	624.5	<0.0001
T:t:M	8	0.9985	0.1248	92.14	<0.0001
Totale	54	0.0731	0.0014		

È stata anche applicata la *one-factor ANOVA* per ciascun fattore, tenendo fissati gli altri due, e anche questa analisi ha confermato quanto trovato nei paragrafi precedenti. I risultati ottenuti tenendo fissati M e tempo di estrazione sono riportati in Tabella 3.6 e hanno confermato che la temperatura ha un effetto particolarmente significativo nei test condotti per un tempo di estrazione pari a 30 minuti per qualsiasi valore di M (p -value <0.0001) e per un tempo di 105 minuti a M=1:15 (p -value <0.05).

Tab. 3.6. F-value e p-value a rapporto matrice/solvente (M) e tempo di estrazione (t) fissati: effetto della temperatura (T) sulla resa in d-limonene.

M=1:4		
t (min)	F-value	p-value
30	239	<0.0001
105	1.482	0.3
180	5	0.053
M=1:10		
t (min)	F-value	p-value
30	5541	<0.0001
105	0.769	0.504
180	1.1	0.392
M=1:15		
t (min)	F-value	p-value
30	5155	<0.0001
105	6.0909	0.036
180	3	0.125

A temperatura e tempo di estrazione fissati, sono stati ottenuti i risultati riportati in Tabella 3.7, dove è evidente che la resa è significativamente influenzata dal rapporto M solo nei test condotti per 30 minuti a qualsiasi temperatura (p -value \leq 0.0001).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

Tab. 3.7. *F*-value e *p*-value a temperatura (T) e tempo di estrazione (t) fissati: effetto del rapporto matrice/solvente (M) sulla resa in d-limonene.

T=100°C		
t (min)	F-value	p-value
30	113.4	<0.0001
105	2.105	0.203
180	2.571	0.156
T=150°C		
t (min)	F-value	p-value
30	1682	<0.0001
105	0.0714	0.932
180	3.214	0.113
T=200°C		
t (min)	F-value	p-value
30	402.3	<0.0001
105	1.75	0.252
180	1.333	0.332

Infine, nella tabella 3.8 sono mostrati i risultati ottenuti a temperatura e M fissati che confermano che il tempo di estrazione influenza la resa a qualsiasi valore di temperatura e rapporto M (*p*-value ≤ 0.027).

Tab. 3.8. *F*-value e *p*-value a rapporto matrice/solvente (M) e temperatura (T) fissati: effetto del tempo di estrazione (t) sulla resa in d-limonene.

T=100°C		
M	F-value	p-value
1:4	33.71	0.0005
1:10	1552	<0.0001
1:15	1360	<0.0001
T=150°C		
Time (min)	F-value	p-value
30	598.4	<0.0001
105	6012	<0.0001
180	6012	<0.0001
T=200°C		
Time (min)	F-value	p-value
30	7	0.027
105	1206	<0.0001
180	1990	<0.0001

3.7.2 Piano fattoriale 3³

L'effetto del tempo di estrazione, della temperatura e pressione e del rapporto matrice/solvente M sulla resa in d-limonene è stato analizzato mediante un approccio

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

statistico applicato a un piano fattoriale a tre livelli (3^3), dal momento che per ciascuna delle tre variabili studiate sono stati testati tre livelli (Tabella 3.9).

Tab. 3.9. Livelli codificati e valori originali usati per esplorare il dominio sperimentale.

Fattori	Livelli		
	-1	0	+1
Rapporto matrice/solvente (M)	1:4	1:10	1:15
Temperatura (°C)	100	150	200
Tempo di estrazione (min)	30	105	180

Come variabile di risposta è stata considerata la resa di estrazione in termini di rapporto ponderale tra la quantità di limonene estratto e la quantità di bucce secche caricate come materia prima.

Sono stati calcolati e rappresentati in un grafico sia gli effetti principali (ME: Main Effects) che le interazioni (INT). La pendenza delle rette indica con quale entità un fattore influenza la variabile di risposta.

Facendo riferimento al modulo dell'algebra booleana, si attribuisce a ogni il livello un valore tra 0, 1 e 2. Per ogni fattore si calcola la media della variabile di risposta ad ogni livello raggiunto in modo da poter costruire i grafici riportati in Figura 3.14.

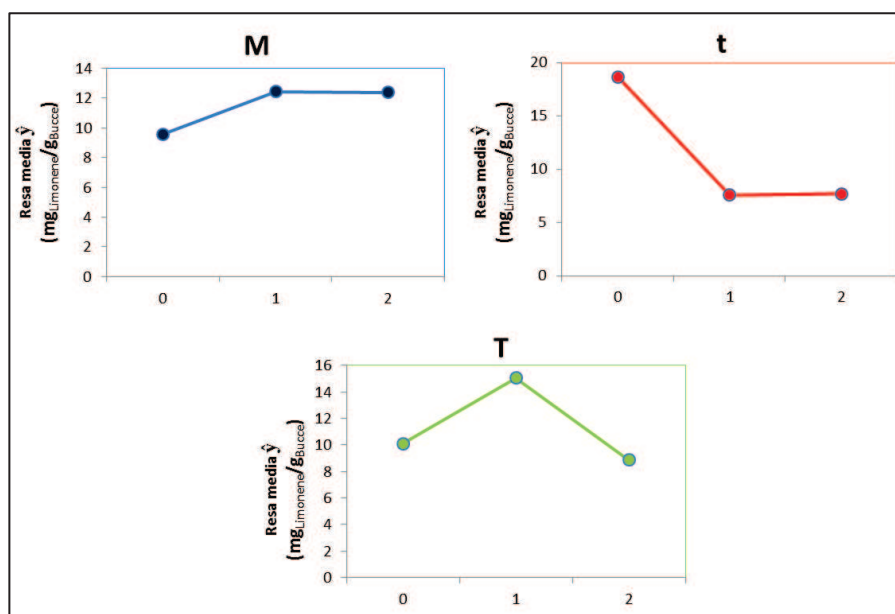


Fig. 3.14 - Studio del “main effect” dei fattori coinvolti nel processo.

I grafici in figura 3.14 mostrano il “main effect” di un fattore, ossia il suo effetto principale sulla variabile di risposta.

Esistono tre livelli per ogni fattore e quindi ci son tre punti da congiungere con due segmenti. Quando i due segmenti tendono ad avere la stessa pendenza fino a formare, quasi, un unico segmento, si ha un effetto lineare, altrimenti si ha globalmente un effetto quadratico. Nel caso in esame, si ha che il maggiore effetto è dato dal fattore tempo (ha la pendenza più alta per uno dei segmenti), a seguire diventa importante l'effetto della temperatura e infine quello del rapporto M; per quest'ultimo si ha una dipendenza blanda poiché i punti sono abbastanza vicini, ma è probabile che una combinazione di esso con il fattore temperatura e il fattore tempo potrebbe generare effetto sulla variabile di risposta.

3.7.3 Response Surface Methodology (RSM)

Per risolvere il problema di ottimizzazione si fa ricorso alla superficie di risposta, ossia si individua il modello statistico che descrive il processo al variare delle variabili indipendenti (tempo e temperatura). La massima resa (3.56%, $g_{\text{limonene}}/g_{\text{bucce secche}} \times 100$) è stata ottenuta quando l'estrazione è stata condotta a 150°C per 30 minuti con un rapporto matrice/solvente pari a 1:15.

Quindi, lo studio del sistema HPTE è stato completato con l'analisi della superficie di risposta e con il fitting dei risultati sperimentali con un'equazione polinomiale del secondo ordine:

$$Y(\%) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

dove Y è la variabile di risposta (resa % in d-limonene); b_0 è una costante; b_1, b_2, b_3 sono i termini lineari rappresentativi degli effetti principali che influenzano la risposta; b_{11}, b_{22}, b_{33} indicano gli effetti quadratici, b_{12}, b_{13}, b_{23} sono i termini di interazione; X_1, X_2, X_3 sono rispettivamente i valori codificati del rapporto matrice/solvente, della temperatura e del tempo di estrazione.

I coefficienti che garantiscono il miglior fitting tra l'equazione polinomiale scelta e i risultati sperimentali sono riportati di seguito:

$$Y(\%) = 1.235 - 0.062X_1 - 0.570X_2 - 0.140X_3 - 0.571X_1^2 + 0.581X_2^2 - 0.145X_3^2 + 0.091X_1X_2 + 0.008X_1X_3 + 0.239X_2X_3$$

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

Tale modello presenta un R^2 pari a 0.7236, cioè il 72.36% dei dati può essere spiegata mediante la superficie di risposta proposta. Inoltre, i valori di F pari a 4.946 e di p pari a 0.0022 dimostrano ulteriormente la significatività del modello.

Per poter visualizzare graficamente la superficie di risposta, si è fatto riferimento anche a 3 piani fattoriali 3^2 a valori fissati del rapporto.

Di seguito si riporta l'equazione del modello statistico del processo di estrazione HPTE per $M=1:4$ e la relativa superficie di risposta (Figura 3.15):

$$Resa \left(\frac{mg_{limonene}}{g_{buccia\ secca}} \right) = 0,0005 * T^2 - 0,0014 * t^2 + 0,0002 * T * t - 0,1722 * T + 0,3899 * t - 7,7787$$

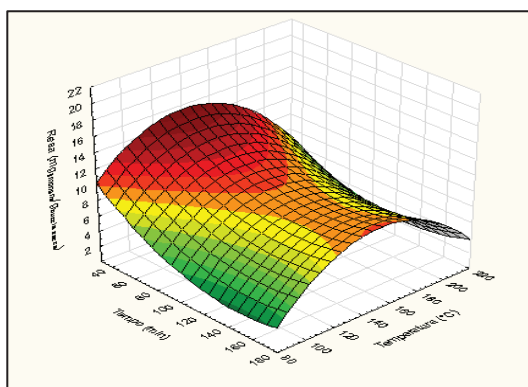


Fig. 3.15 - Superficie di risposta del modello statistico di estrazione HPTE per M=1:4.

Allo stesso modo è stata individuata dal programma statistico la superficie di risposta del modello per rapporti di alimentazione $M=1:10$ e $M=1:15$ (Figure 3.16 e 3.17) con relative equazioni del modello.

$$Resa \left(\frac{mg_{limonene}}{g_{buccia\ secca}} \right) = 0,0012 * T^2 - 0,0027 * t^2 + 0,0003 * T * t - 0,3932 * T + 0,7622 * t - 18,1199$$

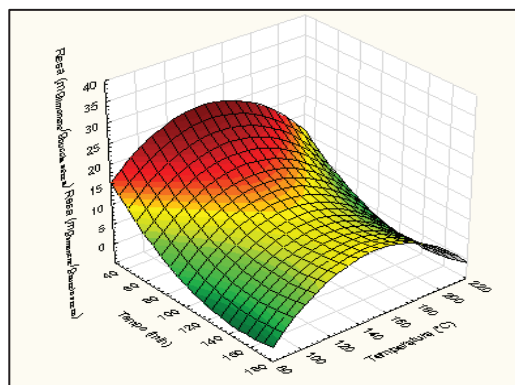


Fig. 3.16 - Superficie di risposta del modello statistico di estrazione HPTE per M=1:10.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
Capitolo 3 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante HPTE

$$Resa \left(\frac{mg \text{ limonene}}{g \text{ buccia secca}} \right) = 0,0013 * T^2 - 0,0028 * t^2 + 0,0003 * T * t - 0,423 * T + 0,7886 * t - 18,866$$

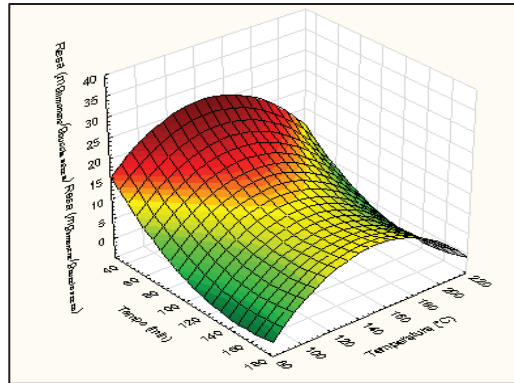


Fig. 3.17 - Superficie di risposta del modello statistico di estrazione HPTE per M=1:15.

Capitolo 4

Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

4.1 Obiettivi del lavoro

Pur se largamente diffuse, le tecniche di estrazione tradizionali spesso presentano degli inconvenienti come la degradazione chimica dei componenti ad opera del calore (distillazione ed estrazione con solventi a caldo) o per idrolisi (distillazione e macerazione acquosa), o la presenza indesiderata di residui di solvente nell'estratto come nel caso dell'estrazione con solventi. In tempi relativamente recenti, al fine di ridurre gli inconvenienti delle tecniche tradizionali e di ottimizzare gli aspetti legati ai costi energetici e all'impatto ambientale, sono state sviluppate numerose moderne tecniche estrattive tra cui quella che ricorre ai fluidi supercritici (Cap. 2, par. 2.4.1) e, in particolare, alla CO₂ supercritica. Nello specifico, l'estrazione supercritica di oli essenziali da piante ed erbe è stata ampiamente studiata negli ultimi 20 anni, come testimoniato dalle centinaia di pubblicazioni scientifiche a riguardo (*Kerola, 1995; Reverchon, 1997; Herrero et al., 2006; Reverchon & De Marco, 2006; Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007; Pereira & Meireles, 2010; Xu et al., 2011; Fornari et al., 2012*). Nonostante il maggiore costo operativo rispetto ai metodi tradizionali, l'estrazione supercritica garantisce estratti di maggiore qualità (*Díaz-Maroto et al., 2002; Carvalho et al., 2005; Vági et al., 2005; Glišić et al., 2007*). Tuttavia, gli studi sull'estrazione supercritica di oli essenziali da agrumi sono pochi e non recenti (*Calame & Steiner, 1982; Sugiyama & Saito, 1988; Poiana et al., 1998; Poiana et al., 1998; Sargenti & Lanças, 1998; Mira et al., 1999; Poiana et al., 1999; Berna et al., 2000; Atti-Santos et al., 2005*). Inoltre, nella maggior parte di essi si rivolge l'attenzione alla qualità degli estratti e in nessuno è considerata la modellazione matematica del processo. Pertanto, durante il dottorato si è deciso di studiare il processo di estrazione mediante CO₂ supercritica del D-limonene da bucce di

limone di Rocca Imperiale IGP, cercando di individuare le condizioni operative ottimali e considerando l'effetto di diverse variabili sulla resa di estrazione, quali lo stadio di maturazione del frutto, le dimensioni della matrice solida, la quantità di matrice caricata nell'estrattore, il pre-trattamento di essiccamento, il flusso di CO₂, la pressione e la temperatura. La fase sperimentale è stata condotta al Centro di Ricerche ENEA – TRISAIA (Rotondella, Italia). Infine, i risultati sono confrontati con quelli ottenuti mediante idrodistillazione e il processo di estrazione è stato modellato mediante il modello Sovová model, finora applicato esclusivamente all'estrazione di oli e oli essenziali da semi.

4.2 Limoni di Rocca Imperiale IGP: analisi preliminari

I frutti di limone, il cui nome scientifico è *Citrus limon* (L.) Burm. F, usati in questo studio appartengono a una mutazione spontanea della cultivar “Femminello comune”, prodotta a Rocca Imperiale (CS, Italia). Questa qualità è una delle sei coltivazioni di limone IGP italiane ed è resa unica dal particolare micro-clima locale e dalla produzione totalmente biologica. I frutti, di alta qualità, sono caratterizzati da un'alta resa in succo (più del 30%) e da un gran numero di cellule lisigene nel flavedo, contenenti una quantità di limonene superiore al 70% dei terpeni totali (*Disciplinare “Limone di Rocca Imperiale” IGP, Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, Italia, 2010*). La pianta selezionata produce frutti 4 volte all'anno, ma i frutti usati in questo lavoro sono stati raccolti nei mesi di Novembre 2012, Dicembre 2012 e Gennaio 2013. Tali frutti sono stati, innanzitutto, lavati, pelati e spremuti. In seguito è stato valutato l'effetto dello stadio di maturazione raggiunto al momento della raccolta, mediante la caratterizzazione del succo e degli estratti dalle bucce.

Per quanto riguarda il succo, è stata misurata l'acidità mediante titolazione con idrossido di sodio 0.1 M e fenolftaleina come indicatore.

Per quanto riguarda le bucce, invece, l'umidità dei campioni da sottoporre ad estrazione influenza l'estrazione con fluidi supercritici, per cui l'acqua deve essere rimossa o almeno controllata. Inoltre, per gli analiti insolubili in acqua come il D-limonene, l'acqua agisce da barriera e ostacola il trasferimento dell'analita nel fluido (*Lehotay, 1997*). Infine, la presenza di acqua può causare altre situazioni indesiderate come la formazione di ghiaccio nell'impianto a causa della rapida depressurizzazione attuata per recuperare i soluti, e




Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

l'idrolisi dei composti estratti. Naturalmente, l'essiccamento e il modo in cui esso è condotto può influenzare la qualità dell'estratto (Asekun *et al.*, 2007). Di solito, l'acqua viene rimossa sottoponendo il campione a un trattamento di freeze-drying o a essiccamento in aria (con o senza riscaldamento). In questo lavoro si è voluto analizzare l'importanza dell'eventuale perdita di composti volatili dopo l'essiccazione delle bucce in stufa a 50°C per 10 ore. L'attività delle bucce prima e dopo l'essiccazione è stata misurata mediante lo strumento AQUALAB CX3. Le bucce secche sono state poi macinate e setacciate con setacci Endecottes. Bisogna considerare il fatto che durante la macinazione si può avere una perdita di parte dei composti volatili per gli effetti termici intrinseci nel processo stesso di macinazione, tanto che è stato studiato l'effetto del raffreddamento in fase di macinazione (Meghwal & Goswami, 2010).

Infine, le bucce di limone fresche sono state sottoposte a idrodistillazione usando un sistema Clevenger con acqua a 100°C per 3 ore. L'olio essenziale è stato raccolto e la percentuale di D-limonene in esso è stata valutata mediante analisi al GC-FID.

Le dimensioni e la massa dei frutti, la percentuale di succo e di bucce secche rispetto all'intero frutto, il contenuto di acqua nelle bucce fresche e il contenuto di acido citrico nel succo sono riportati nella Tabella 4.1, mentre la percentuale di limonene nell'estratto mediante distillazione è mostrata in Figura 4.1, distinguendo i campioni in base al periodo di raccolta. L'attività delle bucce secche è stata pari al 3% in tutti i casi.

Tab. 4.1 - Caratterizzazione dei frutti e del succo.

Periodo di raccolta	Colore	Lunghezza media (mm)	Diametro medio (mm)	Massa media (g)	Succo (% w/w)	Bucce fresche (% w/w)	Contenuto di acqua nelle bucce fresche		Acidità del succo
							Attività (l)	H ₂ O (%)	(g acido citrico/l)
Novembre 2012	Verde- Giallo chiaro	80.4	61.7	134.3	36.9	15.5	0.337	79.8	56.1
									
Dicembre 2012	Verde chiaro- Giallo	/	/	/	37.6	14.8	0.411	77.1	57.7
									
Gennaio 2013	Giallo	94.3	67.8	179.1	31.0	15.0	0.414	76.6	56.8
									

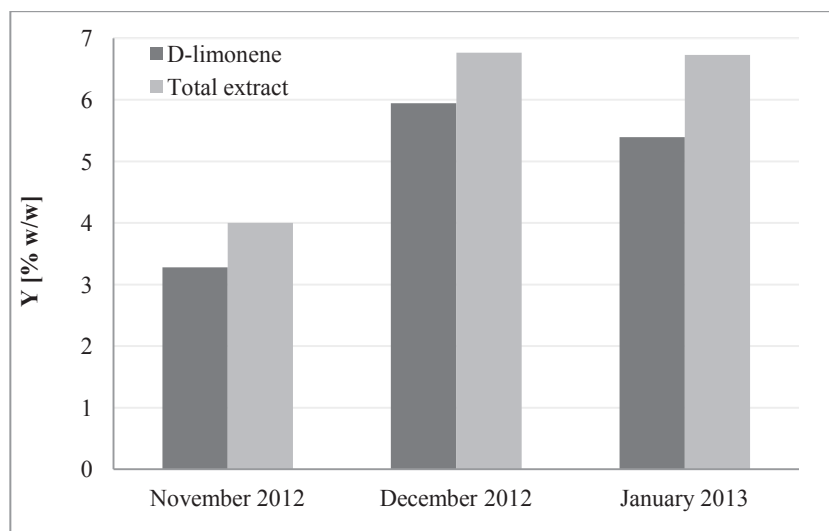


Fig. 4.1 - Percentuale dell'estratto totale e del D-limonene rispetto alla quantità di bucce fresche caricate, in seguito all'idrodistillazione di campioni raccolti in tre mesi diversi.

È evidente che il D-limonene è il composto più abbondante presente nell'estratto, pari all'82% a Novembre, all'88% a Dicembre e all'80% a Gennaio.

Da questi risultati preliminari emerge che lo stadio di maturazione influenza le caratteristiche del frutto e il massimo contenuto di succo, acido citrico, olio essenziale e D-limonene nell'estratto si raggiunge a dicembre, per cui può essere individuato questo mese come tempo balsamico del frutto. Questo è in linea con quanto atteso dalla letteratura relativamente all'influenza delle condizioni climatiche e del periodo di raccolta sulla composizione degli oli essenziali estratti (*Celiktas et al., 2007; Hussain et al., 2008; Pereira et al., 2008*).

4.3 Definizione del piano sperimentale

4.3.1 Effetto della pressione e della temperatura

Il potere solvente e la selettività della CO₂ supercritica può essere ottimizzata variando le condizioni operative di pressione e temperatura. In questo lavoro, l'influenza della pressione e della temperatura sulla resa di estrazione è stata valutata su bucce secche (dimensioni delle particelle 1-2 mm) di limoni raccolti a Dicembre 2012, dal momento che in questo mese si raggiunge il massimo contenuto di olio essenziale e D-limonene. Le prove di estrazione con CO₂ supercritica sono state eseguite nell'estrattore commerciale SPE-ED SFE 2 (Applied

Separations), modificato presso il Laboratorio UTRI-BIOTEC (ENEA) per avere un miglior controllo della temperatura e della pressione durante l'estrazione. I test sono stati eseguiti con una portata costante di CO₂ pari a 8 l/min per un tempo di estrazione totale di 40 minuti (10 minuti in condizioni statiche e 30 minuti in condizioni dinamiche), in un range di temperatura tra 35 e 50°C e di pressione tra 12.5 e 20 MPa. In letteratura (*Sovová et al., 2001; Raeissi & Peters, 2005*) si riporta che temperature moderate (35–50°C) e pressioni dell'ordine dei 9–12 MPa sono sufficienti a solubilizzare gli oli essenziali. La scelta della temperature di estrazione è limitata dalla temperature critica della CO₂ e dalla necessità di evitare la degradazione termica dei composti termolabili presenti negli oli essenziali. Per quanto riguarda la pressione, invece, la pressione è stata aumentata fino a 20 bar per favorire la rottura delle cellule vegetali e il rilascio degli oli essenziali.

4.3.2 Effetto delle dimensioni delle particelle

La dimensione delle particelle della matrice da sottoporre ad estrazione può influenzare in modo critico l'efficienza dell'estrazione supercritica (*Reverchon, 1996; del Valle & Uquiche, 2002*). Particelle più piccole presentano una maggiore superficie di contatto con il fluido e, pertanto, portano a una velocità di estrazione più alta. Inoltre, nelle particelle piccole la resistenza diffusionale intra-particellare è minore e la macinazione più spinta garantisce una maggiore rottura delle cellule, tale da rendere l'olio essenziale più "accessibile" alla CO₂ supercritica. Pertanto, ci si aspetta un aumento della resa di estrazione con il diminuire delle dimensioni delle particelle (*Louli et al., 2004; Ozkal et al., 2005; Yin et al., 2005; Salgin et al., 2006*). Tuttavia, se le particelle sono troppo piccole si può avere una compattazione del letto e la formazione di canali preferenziali che rendono l'estrazione non omogenea (*Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007*). Al fine di valutare l'effetto delle dimensioni delle particelle sulla resa di estrazione supercritica, in questo lavoro sono state prese in considerazione tre intervalli: 5 mm – 6 mm, 1 mm – 2 mm and 125 µm – 1 mm.

4.3.3 Effetto della portata di CO₂

Anche la portata della CO₂ circolante nella cella di estrazione, ha una forte influenza sulla resa. Minore è la portata, più profondamente il fluido penetra nella matrice. Tuttavia, le

resistenze al trasferimento di materia diminuiscono all'aumentare della portata di CO₂. Da un punto di vista ingegneristico, il meccanismo di estrazione con fluidi supercritici è caratterizzato da tre steps successivi: dissoluzione del soluto, diffusione intra-particellare e diffusione esterna. Nello stadio iniziale, la resistenza principale può essere legata alla diffusione esterna o alla dissoluzione del soluto e la portata di CO₂ supercritica può influenzare la resa di estrazione; con l'avanzare del processo, il fronte di dissoluzione si sposta gradualmente dalla superficie esterna al centro della particella, con un aumento della resistenza diffusionale interna: in questo stadio la portata di CO₂ supercritica non ha più alcuna influenza sulla resa di estrazione.

Nel lavoro qui presentato, l'effetto della portata è stato analizzato sulle bucce secche dei frutti raccolti a Gennaio 2013, con dimensioni comprese nell'intervallo 0.125 – 1 mm. Le prove sono state condotte nelle condizioni di pressione e temperatura ottimali e con portate di CO₂ pari a 5 l/min, 8 l/min e 10 l/min per 40 minuti (10 minuti in condizioni statiche e 30 minuti in condizioni dinamiche).

4.4 Analisi dei campioni

L'olio essenziale estratto è stato diluito in esano con un rapporto di diluizione pari a 1:15 e il contenuto di D-limonene è stato valutato mediante analisi gas-cromatografica in un sistema GC-FID modello CP 3800 (Varian), caratterizzato da un iniettore mod. 1177 e da una colonna capillare mod. VF-5ms FactorFour (Varian) di dimensioni 30m×0.25mm×0.25µm. Il programma di temperatura della colonna utilizzato nel metodo di rilevazione del limonene, comincia con una fase isoterma iniziale a 80°C della durata di 3 min, cui segue prima un gradiente lineare di 5°C/min fino a 140°C e poi un successivo gradiente lineare di 45°C/min fino a 275°C; segue poi una fase isoterma di 10 min a 275°C. La temperatura dell'iniettore è stata impostata pari a 280°C e come carrier si è scelto idrogeno puro (99.9995%) con una portata di 1.5 ml/min. Per quanto riguarda l'iniezione, è stata scelta la tecnica a split in cui è necessario fissare il rapporto di splittaggio (1:20), solo una parte del campione alimentato va in colonna per evitare la saturazione. Mediante una micro siringa da 10 µl si inietta 1 µl di campione opportunamente diluito. Per fare un'analisi quantitativa dei campioni estratti è stato

necessario costruire una retta di taratura per individuare la concentrazione di limonene presente nell'estratto a partire da concentrazioni note di una soluzione limonene-esano.

4.5 Risultati e discussione

4.5.1 Effetto della pressione e della temperatura

L'effetto della pressione e della temperatura sulla resa in D-limonene – calcolata come grammi di D-limonene per grammo di bucce secche (x100) – è mostrato in Figura 4.2.

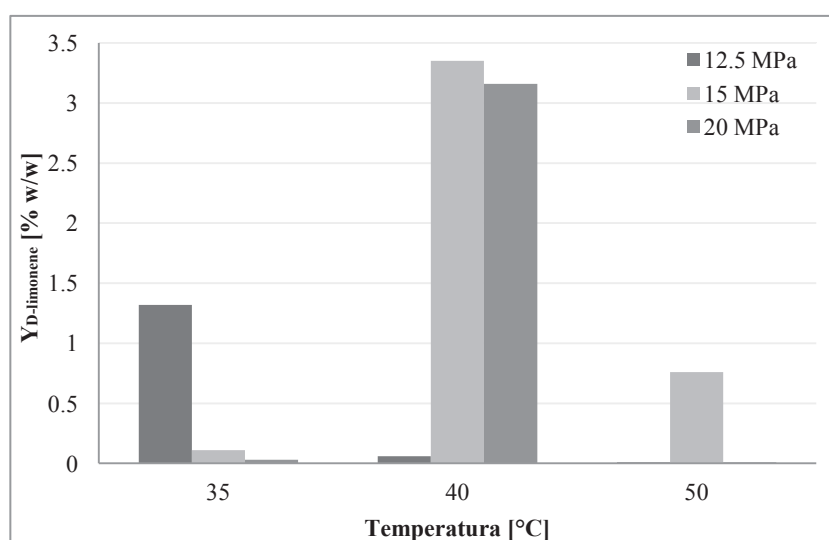


Fig. 4.2 - Effetto di pressione e temperatura sulla resa in D-limonene estratto mediante SFE.

Dai risultati in Figura 4.2 emerge che quando la pressione è bassa (12.5 MPa) si raggiunge il massimo della resa alla temperature minima (35°C), mentre quando la pressione è maggiore (15 MPa e 20 MPa) la resa aumenta da 35 a 40°C per poi diminuire da 40 a 50°C. Questo andamento può essere spiegato considerando l'effetto opposto che temperatura e pressione hanno sulla densità della CO₂, sulla viscosità della CO₂, sul coefficiente di diffusività (strettamente legato alla densità della CO₂) e sulla solubilità del D-limonene nella CO₂. Da un lato, un aumento della pressione porta a una diminuzione del coefficiente di diffusività, ma dall'altro lato porta a un aumento della densità della CO₂ con conseguente aumento del suo potere solvente, ma anche a un aumento della viscosità della CO₂ e della solubilità del D-limonene. Viceversa, un aumento della temperature porta a un aumento del coefficiente di

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

diffusività e a una diminuzione della densità della CO₂, della viscosità della CO₂ e della solubilità del D-limonene (Francisco & Sivik, 2002; Filho et al., 2003). È chiaro che entrano in gioco diversi fattori con effetti opposti e, di conseguenza, la resa può raggiungere un valore ottimale in corrispondenza di condizioni intermedie, come è avvenuto in questo lavoro.

Pertanto, la quantità di D-limonene estratto è massimizzata alla pressione di 15 MPa e alla temperatura di 40°C. In queste condizioni la densità della CO₂ supercritica è pari a 0.77 mg/l, come riportato in Figura 4.3.

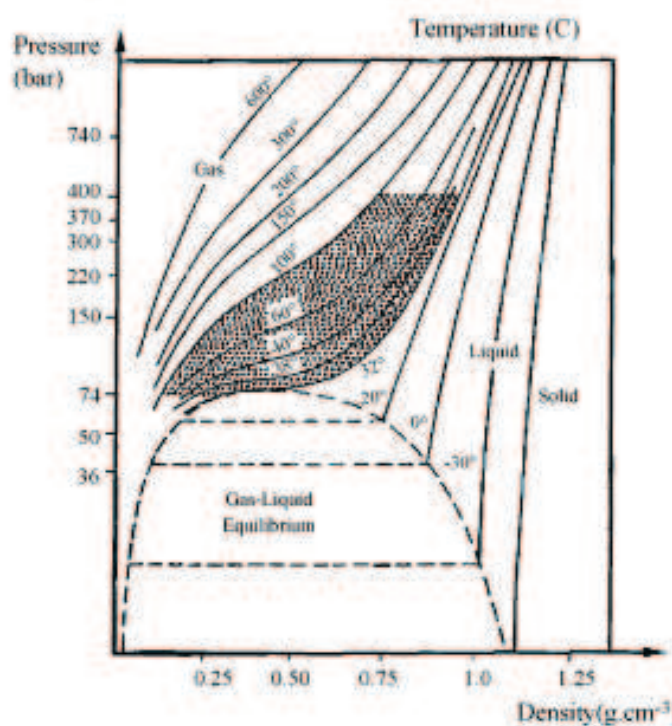


Fig. 4.3 - Diagramma pressione – densità per la CO₂ (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

4.5.2 Effetto delle dimensioni delle particelle e del grado di maturazione

Per ogni mese, è stato studiato l'effetto delle dimensioni delle particelle sulla resa in D-limonene nelle condizioni ottimali di pressione (15 MPa) e temperatura (40°C), con una portata di CO₂ di 8 l/min e per un tempo totale di estrazione di 40 minuti (10 minuti in condizioni statiche e 30 minuti in condizioni dinamiche). I risultati sono riportati in Figura 4.4. La resa in D-limonene diminuisce all'aumentare delle dimensioni delle particelle a causa dell'aumento dell'area superficiale. Lo stesso andamento è stato osservato per ciascun periodo

di raccolta dei frutti. Di conseguenza, la riduzione delle dimensioni delle particelle porta a una diminuzione delle resistenze al trasporto di materia interno e l'estrazione è controllata dalle condizioni di equilibrio tra le fasi, in accordo con quanto trovato in letteratura (*Aleksovski & Sovová, 2007*). Inoltre, i risultati in Figura 4.3 confermano quanto trovato con l'idrodistillazione: la resa massima in D-limonene raggiunge il suo massimo valore a partire dalle bucce dei frutti raccolti a Dicembre.

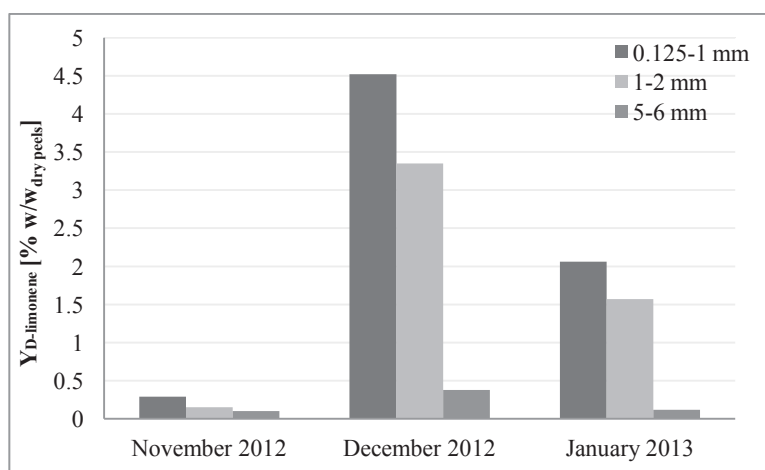


Fig. 4.4 - Effetto di pressione e temperatura sulla resa in D-limonene estratto mediante SFE.

4.5.3 Effetto della portata di CO₂ e selettività

I risultati in Figura 4.5 mostrano che la quantità di estratto aumenta all'aumentare della portata di CO₂, ma con una riduzione della selettività. Infatti, la resa in D-limonene aumenta quando la portata di CO₂ passa da 5 a 8 l/min e diminuisce quando passa da 8 a 10 l/min.

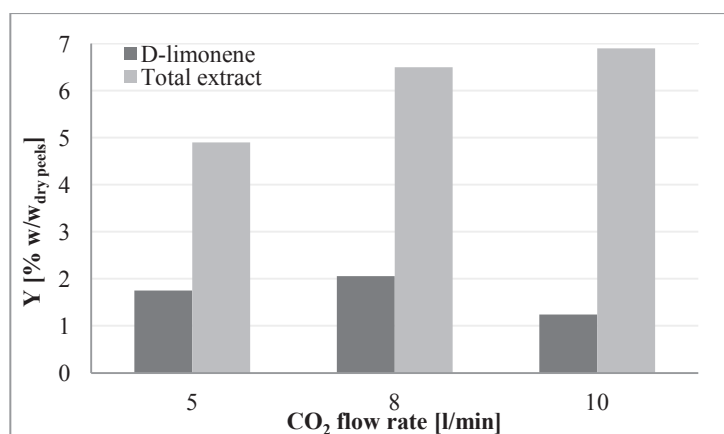


Fig. 4.5 - Effetto della portata di CO₂ sulla resa di estrazione totale e in D-limonene.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

Mentre l'idrodistillazione fornisce un estratto molto ricco in D-limonene (80% nei frutti raccolti a Gennaio), l'estrazione supercritical risulta – nelle condizioni studiate – meno selettiva e l'estratto ottenuto dai limoni raccolti a Gennaio conteneva solo il 35.71% (portata di CO₂ di 5 l/min), 31.69% (portata di CO₂ di 8 l/min) e 17.97% (portata di CO₂ di 10 l/min) di D-limonene. Purtroppo, la CO₂ mostra un'alta affinità non solo per i componenti degli oli essenziali, ma anche per molte altre classi di composti presenti nella matrice vegetale. Pertanto, se l'estrazione supercritical è condotta in un singolo stadio come nel nostro caso, gli estratti contengono altri composti come, ad esempio, le cere cuticolari. Infatti, la solubilità delle cere nella CO₂ è abbastanza simile a quella dei monoterpeni, per cui le cere vengono facilmente co-estratte quando si lavora a pressioni alte (Fornari *et al.*, 2012). Quindi, pressioni maggiori – sebbene portino a un aumento della velocità di estrazione – determinano una riduzione della selettività del solvente supercritico nei confronti dei composti più volatili. Di conseguenza, quando si lavora ad alte pressioni si procede solitamente con almeno due stadi di estrazione operanti in condizioni diverse per isolare il prodotto obiettivo.

4.5.4 Confronto tra estrazione supercritica e idrodistillazione ed effetto dei pre-trattamenti

In Figura 4.6 è mostrato il confronto tra la resa in D-limonene raggiunta mediante idrodistillazione di bucce fresche (senza alcun pre-trattamento termico o meccanico) e l'estrazione supercritica di bucce secche (dimensioni delle particelle 0.125-1 mm, temperatura 40°C, pressione 15 MPa, portata di CO₂ 8 l/min).

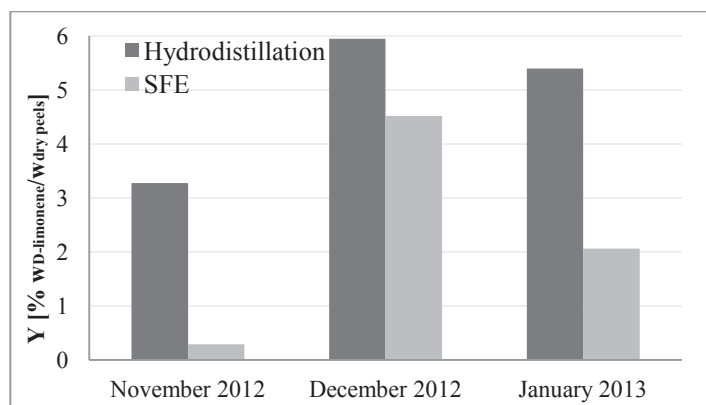


Fig. 4.6 - Confronto tra la resa in D-limonene raggiunta mediante idrodistillazione e quella raggiunta mediante SFE, a partire da frutti raccolti tra Novembre 2012 e Gennaio 2013.

L'idrodistillazione ha dato una resa in D-limonene da bucce fresche maggiore rispetto all'estrazione supercritica. Questa differenza non è imputabile solo al metodo di estrazione, perché le matrici di partenza nei due casi sono diverse. In particolare, la matrice sottoposta ad estrazione supercritica ha subito non solo un trattamento termico di essiccazione a 50°C, ma anche una macinazione e più tale macinazione è spinta maggiore è la perdita dei componenti più volatili. Inoltre, nel processo SFE si potrebbe avere una parziale perdita di composti volatili anche nello step di depressurizzazione a valle dell'estrazione vera e propria.

4.6 Curve di estrazione con CO₂ supercritica

Le curve di estrazione sono state analizzate a due diverse portate di CO₂ (5 l/min e 8 l/min) sulle bucce secche dei frutti raccolti a Gennaio 2013 e con dimensioni di 1-2 mm per 25 minuti (10 minuti in condizioni statiche e 15 minuti in condizioni dinamiche), come mostrato in Figura 4.7.

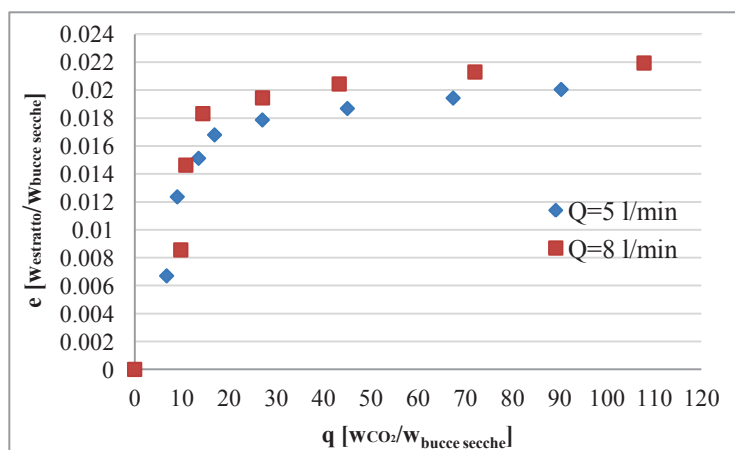


Fig. 4.7 - Curve di estrazione a due diversi valori di portata di CO₂ (5 l/min e 8 l/min) sulle bucce secche dei frutti raccolti a Gennaio 2013.

Le curve di estrazione sono state anche analizzate a diverse dimensioni delle particelle (0.125-1 mm; 1-2 mm; 5-6 mm) a partire dalle bucce dei frutti raccolti a Gennaio 2013. In questo caso la portata di CO₂ è stata posta pari a 5 l/min e l'estrazione è stata condotta per 25 minuti (10 minuti in condizioni statiche e 15 minuti in condizioni dinamiche). Gli andamenti sono mostrati in Figura 4.8.

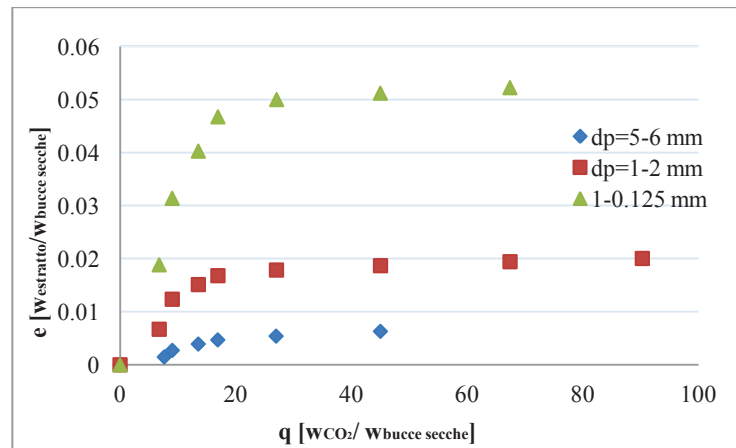


Fig. 4.8 - Curve di estrazione a tre diversi intervalli di dimensioni delle particelle (0.125-1 mm; 1-2 mm; 5-6 mm) sulle bucce secche dei frutti raccolti a Gennaio 2013.

4.7 Modellazione matematica dell'estrazione di limonene con CO₂ supercritica

4.7.1 Stato dell'arte della modellazione dell'estrazione supercritica di oli essenziali da matrici vegetali

Un modello matematico permette di generalizzare i risultati sperimentali, con lo scopo di capire i legami tra le variabili di ingresso al processo e la risposta ed essere in grado di prevedere tale risposta anche in condizioni operative diverse da quelle alle quali è stata condotta la sperimentazione. Inoltre, un modello matematico è utile nello scale-up di processi dalla scala di laboratorio a quella pilota o industriale. Tuttavia, un modello non deve essere solo uno strumento puramente matematico che esprime una funzionalità del tipo $y = f(x_i)$, ma dovrebbe riflettere le correlazioni fisiche intrinseche nel processo studiato. Infatti, I modelli matematici che non hanno alcuna corrispondenza fisica con i materiali e i processi studiati hanno una validità molto limitata, nonostante possano essere usati per il fitting di alcuni dati sperimentali (Reverchon, 2007).

L'estrazione supercritical degli oli essenziali da diverse matrici vegetali è stata modellata mediante vari modelli matematici basati su equazioni empiriche, sull'analogia tra i fenomeni di trasporto di calore e materia e sull'integrazione di bilanci di massa differenziali lungo la il letto di estrazione o sulla singola particella (Reverchon & De Marco, 2006; Diaz & Brignole, 2009; Oliveira et al., 2011): il modello di Sovová (Sovová, 1994; Sovová, 2005) per i semi di cumino (Sovová et al., 1994), pepe nero (Ferreira & Meireles, 2002), anice (Rodrigues et al.,

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

2003) e rosmarino (*Bensebia et al., 2009*); il modello a Sfera Singola (*Reverchon & Sesti Osséo, 1994*) per le foglie di basilico; il modello *shrinking-core* allo stato quasi stazionario (*Goto et al., 1996*) per lo zenzero (*Roy et al., 1996*) e i fiori di lavanda (*Akgün et al., 2000*); un modello basato sull'integrazione dei bilanci di materia lungo il letto di estrazione per le foglie di salvia (*Reverchon, 1996*); diversi modelli per i chiodi di garofano (*Reverchon & Marrone, 1997*) e i semi di finocchio (*Reverchon et al., 1999*); un modello basato su uno stadio di desorbimento seguito da un periodo controllato dalla resistenza interna al trasferimento di materia interno con o senza dispersione per la menta (*Reis-Vasco et al., 1999*); modelli empirici e basati su bilanci di materia per i semi di sedano (*Papamichail et al., 2000*); tre diversi modelli basati su una geometria piana per le foglioline di origano (*Gaspar et al., 2003*); il modello di Zizovic per le foglie delle piante appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae (*Zizovic et al., 2005*) e delle Asteraceae (*Zizovic et al., 2007*).

Pertanto, in seguito a un'attenta ricerca bibliografica, è risultato evidente che un approccio alla modellazione del processo di estrazione supercritica è stato tentato solo considerando semi o foglie come matrici vegetale di partenza. Inoltre, nessuno dei modelli sopra citati è stato validato sugli oli essenziali e, in particolare, sul D-limonene estratto da bucce di agrumi. Tra tutti i modelli indicati, si è deciso di valutare l'eventuale validità del modello di Sovová sull'estratto dalle bucce di limone di Rocca Imperiale IGP.

4.7.2 Modello di Sovová

Sovová (*Sovová, 1994; Sovová, 2005*) propose un modello generale da applicare all'estrazione di oli e oli essenziali da semi. Questo modello tiene in conto i pre-trattamenti subiti dalla matrice vegetale, come l'essiccamento o la macinazione, ed è basato sull'assunzione che il processo possa essere descritto come successione di due periodi: il primo è governato dall'equilibrio di fase (l'analita presente sulla superficie delle cellule rotte è solubilizzato rapidamente e il trasferimento di materia del solvente verso la matrice solida è lo stadio limitante) e il secondo dalla diffusione interna nelle particelle (viene estratto l'analita meno accessibile e la diffusione del soluto verso la fase fluida è lo stadio limitante). Pertanto, il processo di estrazione può essere diviso in tre steps:

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

1. velocità di estrazione costante (*constant extraction rate, CER*), in cui la superficie delle particelle è ricoperto di soluto facilmente accessibile proveniente dalle cellule rotte che lo contenevano;
2. velocità di estrazione decrescente (*falling extraction rate, FER*), in cui i fenomeni controllanti iniziano a cambiare;
3. diffusione limitante (*diffusion-controlled step, DC*), in cui viene estratto il soluto meno accessibile contenuto nelle cellule integre.

I bilanci di materia nella fase solida e in quella fluida portano alla curva di estrazione descritta dall'Equazione 1, dove $e(t)$ è la quantità di estratto in funzione dell'altezza del letto.

$$e(t) = x_0 - \frac{1}{H} \int_0^H x(z, t) dz \quad (1)$$

La quantità di estratto e può essere espresso in funzione del rapporto q (massa di CO₂/massa di matrice solida) e, in questo caso, i tre steps del modello di Sovová sono matematicamente descritti dalle Equazioni 2-4:

$$q < q_{CER} \quad e_{mod} = q y_r (1 - e^{-Z}) \quad (2)$$

$$q_{CER} \leq q < q_{FER} \quad e_{mod} = y_r [q - q_m e^{(Z_W - Z)}] \quad (3)$$

$$q \geq q_{FER} \quad e_{mod} = x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \left[1 + \left(e^{W \frac{x_0}{y_r} - 1} \right) e^{W(q_m - q) \frac{x_k}{x_0}} \right] \quad (4)$$

dove:

$$Z = \frac{k_f a_0 \rho_f}{\dot{q}(1-\varepsilon)\rho_s} ; \quad W = \frac{k_s a_0}{\dot{q}(1-\varepsilon)} ; \quad Z_W = Z \frac{y_r}{W x_0} \ln \frac{x_0 e^{W(q-q_m)-x_k}}{x_0 - x_k} ; \quad q_m = \frac{x_0 - x_k}{y_r Z} ; \quad q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) e^{\frac{W x_0}{y_r}}}{x_0}$$

Il significato dei diversi simboli è riportato di seguito:

q : rapporto massa_{CO₂}/massa_{bucce secche};

q_n : valore di q quando inizia l'estrazione;

q_m : valore di q necessario ad estrarre la parte accessibile di soluto che è disponibile sulla superficie esterna della particella;

y_r : solubilità del soluto nella CO₂ alla temperatura e Pressione del sistema;

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI
Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP
 Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

- x_0 : contenuto iniziale di soluto nella particella ($\text{massa}_{\text{soluto totale}}/\text{massa}_{\text{bucce}}$);
- x_k : frazione di soluto difficilmente accessibile nella particella ($\text{massa}_{\text{soluto meno access.}}/\text{massa}_{\text{bucce}}$);
- Z : parametro adimensionale che descrive il trasferimento di massa nella fase fluida;
- W : parametro adimensionale che descrive il trasferimento di massa nella fase fluida;
- Z_w : coordinata assiale adimensionale che separa la zona a rapida estrazione dalla zona a lenta estrazione;
- k_f : coefficiente di trasporto di massa nella fase supercritica [m/s];
- k_s : coefficiente di trasporto di massa nella fase solida [m/s];
- a_0 : area specifica interfacciale [m^2/m^3];
- ρ_s : densità del solido [kg/m^3];
- ρ_f : densità del solvente [kg/m^3];
- ε : grado di vuoto del letto;
- \dot{q} : velocità di flusso del solvente ($\text{massa}_{\text{CO}_2}/\text{massa}_{\text{bucce secche}} \cdot \text{s}$).

4.7.3 Validazione del modello di Sovová per l'estrazione supercritica da bucce di limone

La pressione a monte e a valle della cella di estrazione è stata monitorata nel tempo e si mantiene costante ad ogni granulometria studiate, per cui il sistema può essere considerato isobaro, verificando una delle ipotesi costitutive del modello di Sovová.

A questo punto sono stati identificati preliminarmente i seguenti parametri:

- x_0 è stato stimato dal valore ottenuto tramite idrodistillazione riportando i seguenti risultati (Tabella 4.2).

Tab. 4.2 – Valori di x_0 per i periodi di campionamento studiati.

Campionamento	x_0 [kg limonene/ kg bucce secche]
Novembre 2012	0.0269
Dicembre 2012	0.0564
Gennaio 2013	0.0524

- x_k e q_m sono comunemente stimati dalla curva di estrazione; il loro valore dipende fortemente dalle condizioni di estrazione e verranno, quindi, valutati per ogni curva;
- i coefficienti di trasporto della fase fluida k_f e della fase solida k_s vengono stimati dai dati sperimentali attraverso i parametri Z e W . Nel calcolo dei parametri bisogna tener conto che a_0 può essere stimata con l'Equazione 5:

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

$$a_0 = \frac{6(1-\varepsilon)}{d_p} \quad (5)$$

- la porosità ε può essere calcolata come: $\varepsilon = 1 - \rho_a/\rho_s$ dove ρ_a , densità apparente del letto di solido è essere ottenuta dal rapporto tra la massa alimentata e il volume dell'unità di estrazione. In Tabella 4.3 sono riportati i valori di ε per le diverse granulometrie usate:

Tab. 4.3 – Valori di ε per le diverse granulometrie analizzate.

d_p [mm]	ε
5-6	0.58
1-2	0.51
1-0.125	0.44

- la solubilità y_r è valutabile dai dati sperimentali, dalla curva di estrazione in funzione della massa di solvente fluuto o dalla pendenza della prima parte della curva del modello.

Si è proceduto allora alla rielaborazione dei dati sperimentali riportati in Figura 4.7 con il software *Table-Curve*, allo scopo di individuare i parametri delle equazioni del modello di Sovová (Equazioni 2-4) che garantiscono il miglior fitting con i dati sperimentali. Quindi, dall'interpolazione dei dati sperimentali in *Table-Curve* sono stati ricavati i parametri del modello sperimentale e, in particolare, visti i punti a disposizione, è stato possibile interpolare la prima parte della curva ($q < q_{CER}$) e la terza ($q_{CER} < q < q_{FER}$).

Confrontando i dati sperimentali con le previsioni del modello teorico emerge un ottimo accordo tra previsione teorica e dati sperimentali (Figura 4.9).

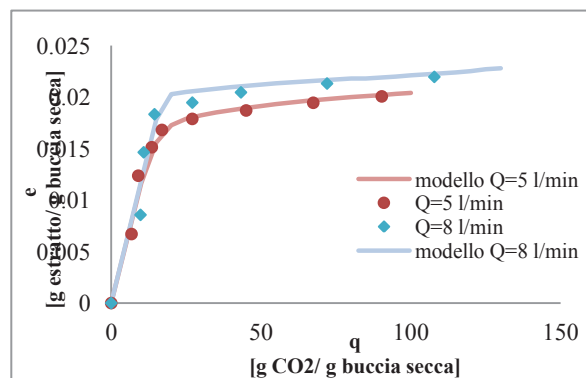


Fig. 4.9 - Confronto tra i dati sperimentali relativi al campionamento di Gennaio 2013 ($d_p=1-2$ mm) e il modello teorico di Sovová.

Nella prima parte della curva ($q < q_{CER}$, Equazione 2), i parametri sono y_r e Z , i cui valori sono riportati in Tabella 4.4. Al variare della portata di CO₂ cambia il coefficiente della fase fluida,

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Parte IB – Estrazione di limonene da bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

Capitolo 4 – Estrazione di limonene da bucce di limone mediante CO₂ supercritica

la cui dipendenza dalla portata è annidata all'interno del parametro Z . Si assume, quindi, una solubilità media (y_r) pari a 0.0693 ($g_{\text{estratto}}/g_{\text{CO}_2}$) (vedi Tabella 4.4) che è stata mantenuta costante per tutte le successive prove, mentre dal valore di Z è stato calcolato il prodotto $k_f \cdot a_0$ per entrambe le portate di CO₂ (Tabella 4.4). Da notare che il valore ricavato di y_r è in linea con i dati presenti in letteratura che, per l'estrazione con CO₂ supercritica dalle bucce di arance alle condizioni a 50°C e 150 bar, riporta un valore di y_r compreso tra 0.080 e 0.095 (Mira et al., 1998).

Tab. 4.4 - Parametri del modello di Sovová per $q < q_{\text{CER}}$ a due valori di portata di CO₂ (5 l/min e 8 l/min).

	Q [l/min]	Parametro	Valore	Dev. standard	R ²
$q < q_{\text{CER}}$	5	y_r	0.0689	$1.42 \cdot 10^{-7}$	0.96
		Z	0.0174	$3.64 \cdot 10^{-6}$	
		$k_f \cdot a_0$	$3.1 \cdot 10^{-5}$	/	
	8	y_r	0.0697	$2.40 \cdot 10^{-5}$	0.92
		Z	0.0176	$3.70 \cdot 10^{-7}$	
		$k_f \cdot a_0$	$3.9 \cdot 10^{-5}$	/	

Analogamente, sono stati interpolati i dati relativi alla terza parte del modello di Sovová ($q \geq q_{\text{FER}}$; Equazione 4) ed è stato ricavato il parametro W , da cui è stato calcolato il coefficiente della fase solida $k_s \cdot a_0$ (Tabella 4.5). Per ogni curva sono stati ricavati anche i valori di x_k e q_m direttamente dall'andamento sperimentale (Tabella 4.5).

Tab. 4.5 - Parametri del modello di Sovová per $q \geq q_{\text{FER}}$ a due valori di portata di CO₂ (5 l/min e 8 l/min).

	Q [l/min]	Parametro	Valore	Dev. standard	R ²
$q \geq q_{\text{FER}}$	5	W	0.024	$8.60 \cdot 10^{-5}$	0.92
		$k_s \cdot a_0$	0.0011	/	
		x_k	0.016	/	
		q_m	15	/	
	8	W	0.0155	$5.87 \cdot 10^{-5}$	0.90
		$k_s \cdot a_0$	0.0011	/	
		x_k	0.0205	/	
		q_m	24	/	

Il coefficiente di trasporto della fase fluida aumenta all'aumentare della portata, mentre quello della fase solida resta costante proprio perché la portata di CO₂ non influenza il meccanismo trasporto nella fase solida ma solo quello nella fase fluida.

BIBLIOGRAFIA

Introduzione

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review*, Journal of Food Engineering. 117(4) (2013) 426-437.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*, The Plant Journal. 54 (2008) 621-639.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., *Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production*, Journal of Applied Phycology. 21 (2009) 493-507.
- Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., Zhou, B.-C., *Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris*, Bioresource Technology. 99 (2008) 4717-4722.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor*, Biotechnology and Bioengineering. 102 (2009) 100-112.
- Roessler, P.G., *Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions*, Journal of Phycology. 26 (1990) 393-399.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Yoga Latha, L., *Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts*, Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 8(1) (2011) 1-10.
- Shifrin, N.S., Chilsom, S.W., *Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles*, Journal of Phycology. 17 (1981) 374-384.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S., Burris, N., *Lipid composition of the nitrogen starved green alga Neochloris oleoabundans*, Enzyme Microb. Technol. 5 (1983) 435-440.

Parte IA: Estrazione di lipidi da microalghe

- Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P.J., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T.A., Kleine, H.P., Knight, C., Nagy, M.A., Perry, D.A., Stefaniak, M., *Green Chemistry Tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organization*, Green Chemistry. 10 (2008) 31-36.

- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*, Applied Energy. 88 (2011) 3402-3410.
- Anastas, P., Eghbali, N., *Green Chemistry: Principles and Practice*, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 301-312.
- Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M., *Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry*, Acc. Chem. Res. 35 (2002) 686-698.
- Anastas, P.T., Warner, J.C., *Green chemistry: theory and practice*, Oxford: Oxford University Press (1998).
- Andrich, G., Nesti, U., Venturi, F., Zinnai, A., Fiorentini R., *Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalgae Nannochloropsis sp*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107 (2005) 381-386.
- Andrich, G., Zinnai, A., Nesti, U., Venturi, F., Fiorentini, R., *Supercritical fluid extraction of oil from microalga Spirulina (Arthrospira) platensis*, Acta Aliment. Hung. 35 (2006) 195-203.
- Araujo, G.S., Matos, L.J.B.L., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L., *Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method*, Ultrasonics Sonochemistry. 20(1) (2013) 95-98.
- Araujo, G.S., Matos, L.J.B.L., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A., Farias, W.R.L., *Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains*, Bioresource Technology. 102 (2011) 5248-5250.
- Aresta, M., Dibenedetto, A., Carone, M., Colonna, T., Fragale, C., *Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction*, Environ Chem Lett. 3 (2005) 136-139.
- Bai, M.-D., Cheng, C.-H., Wan, H.-M., Lin, Y.-H., *Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 42 (2011) 783-786.
- Balasubramanian, S., Allen, J.D., Kanitkar, K., Boldor, D., *Oil extraction from Scenedesmus obliquus using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization*, Bioresource Technology. 102(3) (2011) 3396-3403.
- Baneerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Baneerjee, U.C., *Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals*, Crit. Rev. Biotechnol. 22(3) (2002) 245-279.
- Barnard, T.M., Leadbeater, N.E., Boucher, M.B., Stencel, L.M., Wilhite, B.A., *Continuous-flow preparation of biodiesel using microwave heating*, Energy & Fuels. 21 (2007) 1777-1781.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Bibliografia

- Becker, E.W., *Micro-algae as a source of protein*, Biotechnology Advances. 25 (2007) 207-210.
- Becker, W., *Nutritional value of microalgae for aquaculture*. In: Handbook of Microalgal culture, Biotechnology and Applied Phycology. Ed. A. Richmond – Blackwell Science (2004) 380-391.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., *A rapid method of Total Lipid Extraction and Purification*, Can. J. Biochem. Physiol. 37 (1959) 911-917.
- Brennan, L., Owende, P., *Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 557-577.
- Briones, J.A., Mullins, J.C., Thies, M.C., *Solvent extraction of fath/acids from natural oils with liquid water at elevated temperatures and pressures*, JAOCS. 67(11) (1990) 852-857.
- Brown, T.M., Duan, P., Savage, P.E., *Hydrothermal liquefaction and gasification of Nannochloropsis sp.*, Energy Fuels. 24 (2010) 3639-3646.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenerry, C., *The vitamin content of microalgae used in aquaculture*, J. Appl. Phycol. 11 (1999) 247-255.
- Burja, A.M., Armenta, R.E., Radianingtyas, H., Barrow, C.J., *Evaluation of Fatty Acid Extraction Methods for Thraustochytrium sp. ONC-T18*, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 4795-4801.
- Caiazza, M., *Studio delle caratteristiche di crescita delle microalghe in impianti indoor e outdoor per la produzione di biomassa algale pregiata*, Tesi di dottorato, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.
- Cardoso, L.C., Serrano, C.M., Rodríguez Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E.J., Lubián, L.M., *Extraction of carotenoids and fatty acids from microalgae using supercritical technology*, American Journal of Analytical Chemistry. 3 (2012) 877-883.
- Cartens, M., Molina Grima, E., Medina, A.R., Gimenez, A.C., Gonzalez, J.I., *Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga Phaeodactylum tricorutum*, J. Am. Oil Chem. Soc. 73 (1996) 1025-1031.
- Cheng, C.-H., Du, T.-B., Pi, H.-C., Jang, S.-M., Lin, Y.-H., Lee, H.-T., *Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂*, Bioresource Technology. 102 (2011) 10151-10153.
- Cheung, P.C.K., Leung, A.Y.H., Ang, P.O.A., *Comparison of Supercritical Carbon Dioxide and Soxhlet Extraction of Lipids from a Brown Seaweed, Sargassum hemiphyllum (Turn.) C. Ag.*, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4228-4232.
- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae*, Biotechnology Advances. 25 (2007) 294-306.

- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*, Trends In Biotechnology. 26(3) (2008) 126-131.
- Clark, J.H., *Green chemistry: challenges and opportunities*, Green Chemistry. 1 (1999) 1-8.
- Clark, J.H., Tavener, S.J., *Alternative solvents: Shades of green*, Organic Process Research & Development. 11 (2007) 149-155.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., *Effect of temperature and nitrogen on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production*, Chemical Engineering and Processing: Process intensification. 48(6) (2009) 1146-1151.
- Cooney, M., Young, G., Nagle, N., *Extraction of bio-oils from microalgae*, Separation & Purification Reviews. 38 (2009) 291-325.
- Couto, R.M., Simões, P.C., Reis, A., Lopes Da Silva, T., Martins V.H., Sánchez-Vicente, Y., *Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga Cryptocodinium cohnii*, Eng. Life Sci. 10(2) (2010) 158-164.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., *Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves*, Ultrasonics Sonochemistry. 15 (2008) 898-902.
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*, Water Research. 37(18) (2003) 4311-4330.
- Dejoye C., Vian M.A., Lumia, G., Bouscarle, C., Charton, F., Chemat, F., *Combined extraction processes of lipid from Chlorella vulgaris microalgae: microwave prior to supercritical carbon dioxide extraction*, International Journal of Molecular Sciences. 12 (2011) 9332-9341.
- Demirbas, A., *Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: a solution to pollution problems*, Applied Energy. 88(10) (2011) 3541-3547.
- Demirbas, M.F., *Biofuels from algae for sustainable development*, Applied Energy. 88 (2011) 3473-3480.
- Demirbas, A., Demirbas, M.F., *Importance of algae oil as a source of biodiesel*, Energy Conversion and Management. 52 (2011) 163-170.
- Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C.S., Li, Q.X., *Pressurized fluid extraction of carotenoids from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina kavalactones from Piper methysticum*, Anal. Chim. Acta. 501 (2004) 175-181.
- Dong, T., Wang, J., Miao, C., Zheng, Y., Chen, S., *Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content*, Bioresource Technology. 136 (2013) 8-15.

- Draget, K.I., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G., *Alginates from Algae*, Biopolymers Online. 6 (2005).
- Dunn, P.J., *The importance of Green Chemistry in process research and development*. Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 1452-1461.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Barrett, S.M., *Biochemical-composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty-acids*, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 161 (1992) 115-134.
- Durmaz, Y., *Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation*, Aquaculture. 272 (2007) 717-722.
- Ehimen, E.A, Sun, Z., Carrington, G.C., *Use of ultrasound and co-solvents to improve the in-situ transesterification of microalgae biomass*, Procedia Environmental Sciences. 15 (2012) 47-55.
- Ehimen, E.A, Sun, Z.F., Carrington, C.G., *Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids*, Fuel. 89(3) (2010) 677-684.
- Erickson, D.R., *Overview of modern soybean processing and link between processes*, in Practical handbook of soybean processing and utilization, ed. Champaign, IL: AOCS Press and United Soybean Board (1995) 56-64.
- Fajardo, A.R., Cerdan, L.E., Medina, A.R., Fernandez, F.G.A., *Lipid extraction from the microalga Phaeodactylum tricornutum*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109 (2007) 120-126.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley G.H., *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*, Journal of Biological Chemistry. 226 (1957) 497-509.
- Freyburger, G., Heape, A., Gin, H., Boisseau, M., Cassagne, C., *Decrease of lipid extractibility by chloroform-methanol upon addition of water to human erythrocytes*, Anal. Biochem. 171 (1988) 213-216.
- Garcia-Ayuso, L.E., Luque de Castro, M.D., *Employing focused microwaves to counteract conventional Soxhlet extraction drawbacks*, Trends in Analytical Chemistry. 20 (2001) 28-34.
- Gerde, J.A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, D., Wang, T., *Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment*, Bioresource Technology. 125 (2012) 175-181.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., *Comparison of ultrasound and thermal pre-treatment of Scenedesmus biomass on methane production*, Bioresource Technology. 110 (2012) 610-616.
- Gonzalez Prieto, L.E., Sorichetti, P.A., Romano, S.D., *Electric properties of biodiesel in the range from 20 Hz to 20 MHz. Comparison with diesel fossil fuel*, Int. J. Hydrogen Energy. 33 (2008) 3531-3537.

- Greque de Morais, M., Vieira Costa, J.A., *Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide*, Energy Conversion and Management. 48(7) (2007) 2169-2173.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., *Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production*, Journal of Applied Phycology. 21 (2009) 493-507.
- Gudin, C., Thepenier, C., *Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae*, Adv. Biotechnol Process. 6 (1986) 73-110.
- Guil-Guerrero, J.L., Belarbi, E.I.H., Reboloso-Fuentes, M.M., *Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga Porphyridium cruentum*, Bioseparation. 9 (2000) 299-306.
- Haas, M.J., Wagner, K., *Simplifying biodiesel production: the direct or in situ transesterification of algal biomass*, European Journal of Lipid Science and Technology. 113(10) (2011) 1219-1229.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., *Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review*, Biotechnology Advances. 30 (2012) 709-732.
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., *Microalgal cell disruption for biofuel development*, Applied Energy. 91(1) (2012) 116-121.
- Hansen, C.M., Appendix A: Table A.1. *Hansen solubility parameters: a user's handbook*. 2nd edition, Boca Raton, Florida: CRC Press (2007).
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 1037-1047.
- Hejazi, M.A., Holwerda, E., Wijffels, R.H., *Milking microalga Dunaliella salina for β -carotene production in two-phase bioreactors*. Biotechnol Bioeng. 85 (2004) 475-481.
- Herrero, M., Cifuentes, C., Ibáñez, E., *Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae. A review*, Food Chemistry. 98 (2006) 136-148.
- Herrero, M., Ibáñez, E., Senorans, J., Cifuentes, A., *Pressurized liquid extracts from Spirulina platensis microalga – Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography*, Journal of Chromatography A. 1047 (2004) 195-203.
- Herrero, M., Jaime, L., Martín-Alvarez, P.J., Cifuentes, C., Ibáñez, E., *Optimization of the extraction of Antioxidants from Dunaliella salina Microalga by pressurized liquids*, J. Agric. Food Chem. 54(15) (2006) 5597-5603.
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Lee, D.-J., Chang, J.-S., *Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – A review*, Biotechnology Advances. 29 (2011) 189-198.

- Horváth, I.T., Anastas, P.T., *Innovations and Green Chemistry*, Chemical Reviews. 107(6) (2007) 2169-2173.
- Hu, J., Du, Z., Tang, Z., Min, E., *Study on the Solvent Power of a New Green Solvent: Biodiesel*, Ind. Eng. Chem. Res. 43 (2004) 7928-7938.
- Huang, H., Yuan, X., Pei, X., *An Economic Analysis of microalgae oil extraction*, Biotechnology Advances. 20 (2012) 1-13.
- Huang, H., Yuan, X., Zeng, G., Wang, J., Li, H., Zhou, C., Pei, X., You, Q., Chen, L., *Thermochemical liquefaction characteristics of microalgae in sub- and supercritical ethanol*, Fuel Processing Technology. 92 (2011) 147-153.
- Iqbal, J., Theegala, C., *Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent*, Algal Research. 2 (2013) 34-42.
- Iqbal, J., Theegala, C., *Optimizing a continuous flow lipid extraction system (CFLES) used for extracting microalgal lipids*, GCB Bioenergy. 44 (2012) 1-11.
- Iverson, S.J., Lang, S.L.C., Cooper, M.H., *Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue*, Lipids. 36 (2001) 1283-1287.
- Jaime, L., Mendiola, J.A., Herrero, M., Rivas, C.S., Santoyo, S., Senorans, F.J., Cifuentes, A., Ibanez, E., *Separation and characterization of antioxidants from Spirulina platensis microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD*, J. Sep. Sci. 28 (2005) 2111-2119.
- Kanda, H., Li, P., Yoshimura, T., Okada, S., *Wet extraction of hydrocarbons from Botryococcus braunii by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane*, Fuel. 105 (2013) 535-539.
- Kim, Y.-H., Park, S., Kim, M.H., Choi, Y.-K., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Kim, H., Kim, H.-S., Song, K.-J., Lee, S.H., *Ultrasound-assisted extraction of lipids from Chlorella vulgaris using [Bmim] [MeSO4]*, Biomass and Bioenergy. 56 (2013) 99-103.
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., Hasegawa T., *Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from Chlorella vulgaris*. J Chem Technol Biotechnol. 84 (2009) 657-661.
- Knothe, G., Steidley, K.R., *Fatty acid alkyl esters as solvents: evaluation of the Kauri-Butanol Value. Comparison to Hydrocarbons, Dimethyl Diesters, and Other Oxygenates*, Ind. Eng. Chem. Res. 50 (2011) 4177-4182.
- Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., Gedanken, A., *Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of Nannochloropsis by microwave and ultrasound radiation*, Bioresource Technology. 102(5) (2011) 4265-4269.

- Krichnavaruk, S., Shotipruk, A., Goto, M., Pavasant, P., *Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from Haematococcus Pluvialis with vegetable oils as co-solvent*, Bioresource Technology. 99 (2008) 5556-5560.
- Kumar, K., Dasgupta, C.N., Nayak, B., Lindblad, P., Das, D., *Development of suitable photoreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria*, Bioresource Technology. 102 (2011) 4945-4953.
- Kumar, K., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F.X., van Langenhove, H., *Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions*, Trends in Biotechnology. 28(7) (2010) 371-380.
- Lam, M.K., Lee K.T., *Accelerating transesterification reaction with biodiesel as co-solvent: A case study for solid acid sulfated tin oxide catalyst*, Fuel. 89 (2010) 3866-3870.
- Lardon, L., Helias, A., Sialve, B., Stayer, J.P., Bernard, O., *Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae*, Environmental Science & Technology. 43 (2009) 6475-6481.
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., *Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements*, Biomass and Bioenergy. 46 (2012) 89-101.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., *Comparison of several method for effective lipid extraction from microalgae*, Bioresource Technology. 101 (2010) S75-S77.
- Lewis, T., Nichols, P.D., McMeekin, T.A., *Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid producing microheterotrophs*, J. Microbiol. Methods. 43 (2000) 107-116.
- Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E., *Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future*, Analytica Chimica Acta. 369 (1998) 110.
- Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D., *Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment – Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds*, Journal of Chromatography A. 1034 (2004) 237-242.
- Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M., Montero, O., *Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from Nannochloropsis gaditana*, J. Food Eng. 66 (2005) 245-251.
- Macnaughton, S.J., Jenkinsa, T.L., Wimpeea, M.H., Cormiera, M.R., White, D.C., *Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction*, Journal of Microbiological Methods. 31 (1997) 19-27.

- Manley, J.B., Anastas, P.T., Cue Jr., B.W., *Frontiers in Green Chemistry: meeting the grand challenges for sustainability in R&D and manufacturing*, Journal of Cleaner Production. 16 (2008) 743-750.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., Karube, I., *Antioxidants from carbon dioxide fixing Chlorella sorokiniana*, Journal of Applied Phycology. 12 (2000) 263-267.
- McMillan, J.R., Watson, I.A., Ali, M., Jaafar, W., *Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment*, Applied Energy. 103 (2013) 128-134.
- Mead, J.M., Alfin-Slater, R.B., Howton, D.R., Popjak, G., *Lipids Chemistry, Biochemistry, and Nutrition*, Plenum Press: New York 34 (1986) 5-23.
- Medina, A.R., Molina Grima, E., Gimenez, A.G., Ibanez, M.J., *Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids*, Biotechnology Advances. 16(3) (1998) 517-80.
- Mendes, R.L., Coelho, J.P., Fernandes, H.L., *Applications of Supercritical CO₂ Extraction to Microalgae and Plants*, J. Chem. Tech. Biotechnol. 62 (1995) 53-59.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavre, A.F., *Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae*, Inorg. Chim. Acta. 356 (2003) 328-334.
- Mercer, P., Armenta, R.E., *Developments in oil extraction from microalgae*, European Journal of Lipid Science and Technology. 113(5) (2011) 539–547.
- Minowa, T., Yokoyama, S., Kishimoto, M., Okakurat, T., *Oil production from algal cells of Dunaliella tertiolecta by direct thermochemical liquefaction*, Fuel. 74(12) (1995) 1735-1738.
- Mohn, F.H., *Experiences and strategies in the recovery of biomass in mass culture of microalgae*, in Shelef G., Soeder C.J. (eds), Algal biomass, Amsterdam: Elsevier (1980) 547-571.
- Mojaat, M., Foucault, A., Pruvost, J., Legrand, J., *Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of β -carotene from Dunaliella salina*, J. Biotechnol. 133 (2008) 433-441.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Fernandez, F.G.A., Medina, A.R., Chisti, Y., *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*, Biotechnology Advances. 20 (2003) 491-515.
- Molina Grima, E., Medina A.R., Giménez Giménez, A., Sánchez Pérez, J.A., García Sánchez, J.L., *Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass*, Journal of the American Oil Chemists' Society. 71(9) (1994) 955-959.
- Montes D'Oca, M.G., Viêgas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J.A., Primel, E.G., Abreu, P.C., *Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts*

- and direct transesterification of the Chlorella pyrenoidosa*, Biomass and Bioenergy. 35(4) (2011) 1533-1538.
- Moseley, J.D., Woodman, E.K., *Energy efficiency of microwave- and conventionally heated reactors compared at meso scale for organic reactions*, Energy & Fuels. 23 (2009) 5438-5447.
- Murthy, G.S., *Overview and Assessment of Algal Biofuels Production Technologies*, in Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes, Elsevier Press (2011) 415-437.
- Nelson, W.M., *Green solvents for Chemistry: perspectives and practice*, Oxford University Press, 2003.
- Pawliszyn, J., *Kinetic model of supercritical fluid extraction*, J. Chromatogr. Sci. 31 (1993) 31-37.
- Pereira Neto, A.M., Sotana de Souza, R.A., Leon-Nino, A.D., D'arc Aparecida da Costa, J., Sbrolini Tiburcio, R., Abreu Nunes, T., Sellare de Mello, T.C., Takashi Kanemoto, F., Prado Saldanha-Corrêa, F.M., Flores Giancesella, S.M., *Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method*, Renewable Energy. 55 (2013) 525-531.
- Pienkos, P.T., Darzins, A., *The promise and challenges of microalgal-derived biofuels*, Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 3 (2009) 431-440.
- Prabakaran, K., Ravindran, A.D., *A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae*, Letters in Applied Microbiology. 53(2) (2011) 150-154.
- Pragya, N., Pandey, K.K., Sahoo, P.K., *A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 24 (2013) 159-171.
- Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D., *Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: a convincing alternative for total fat isolation from bakery products*, Talanta. 65 (2005) 98-103.
- Pulz, O., Gross, W., *Valuable products from biotechnology of microalgae*, Applied Microbiology and Biotechnology. 65(6) (2004) 635-648.
- Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, V.S., *Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction*, Industrial & Engineering Chemistry Research. 49(6) (2010) 2979-2985.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., *Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production*, Applied Energy. 103 (2013) 444-467.
- Reichardt, C., *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, VCH Publishers: New York. 34, (1988) 54-64.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Bibliografia

- Richter, B.E., Jone, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., *Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation*, Anal Chem. 68 (1996) 1033-1039.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor*, Biotechnology and Bioengineering. 102 (2009) 100-112.
- Rodriguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Cifuentes, A., *Pressurized Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Phormidium Species*, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 3517-3523.
- Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E.-H., García Sánchez, J.L., López Alonso, D., *Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acids analyses*, Biotechnology Techniques. 12(9) (1998) 689-691.
- Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., *Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review*, Journal of Food Engineering. 95 (2009) 240-253.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kamat, M.Y., *Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from Spirulina platensis ARM 740 using response surface methodology*, Journal of Food Engineering. 84 (2008) 321-326.
- Salehpour, S., Dube, M.A., Murph, M., *Solution polymerization of styrene using biodiesel as a solvent: effect of biodiesel feedstock*, The Canadian Journal of Chemical Engineering. 87 (2009) 129-135.
- Samarasinghe, N., Fernando, S., Lacey, R., Brock Faulkner, W., *Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction*, Renewable Energy. 48 (2012) 300-308.
- Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y., Yokoyama, S.-Y., *CO₂ Fixation and Oil Production Through Microalga*, Energy Convers. Manage. 36 (1995) 729-731.
- Schäfer, K., *Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material*, Analytica Chimica Acta. 358 (1998) 69-77.
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*, Bioenergy Research. 1 (2008) 20-43.
- Schoefs, B., *Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis*, Trends in Food Science & Technology. 13(11) (2002) 361-371.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from algae*, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Report NREL/TP 580-24190 (1998).

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Bibliografia

- Sheldon, R.A., *Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art*, Green Chemistry. 7 (2005) 267-278.
- Shen, Y., Pei, Z., Yuan, W., Mao, E., *Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield*, Int. J. Agric. Biol. Eng. 2(1) (2009) 51-57.
- Sherman, J., Chin, B., Huibers, P.D.T., Garcia-Valls, R., Hatton, T.A., *Solvent replacement for green processing*, Environmental Health Perspectives. 106, Supplement 1 (1998) 253-271.
- Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Kaleem, I., Chun, L., Tong, J., *Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae Dunaliella tertiolecta cake*, Energy. 35 (2010) 5406-5411.
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C.R., *Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae*, Bioresource Technology. 101 (2010) 5892-5896.
- Singh, J., Gu, S., *Commercialization potential of microalgae for biofuels production*. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 2596-2610
- Singh, S., Kate, B.N., Banerjee, U.C., *Bioactive compounds from Cyanobacteria and Microalgae: an overview*, Critical Reviews in Biotechnology. 25(3) (2005) 73-95.
- Sorichetti, P.A., Romano, S.D., *Physico-chemical and electrical properties for the production and characterization of Biodiesel*, Phys & Chem of Liquids. 43(1) (2005) 37-48.
- Spear, S.K., Griffin, S.T., Granger, K.S., Huddleston, J.G., Rogers, R.D., *Renewable plant-based soybean oil methyl esters as alternatives to organic solvents*, Green Chem. 9 (2007) 1008-1015.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., *Commercial applications of microalgae*, Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(2) (2006) 87-96.
- Sun, A., Davis, R., Starbuck, M., Ben-Amotz, A., Pate, R., Pienkos, P.T., *Comparative cost analysis of algal oil production for biofuels*, Energy. 36 (2011) 5169-5179.
- Tang, H., Chen, M., Garcia, M.E.D., Abunasser, N., Simon Ng, K.Y., Salley, S.O., *Culture of microalgae Chlorella minutissima for biodiesel deefstock production*, Biotechnology and Bioengineering. 108(10) (2011) 2280-2287.
- Terigar, B.G., Balasubramanian, S., Sabliov, C.M., Lima, M., Boldor, D., *Soybean and rice bran oil extraction in a continuous microwave system: rom laboratory- to pilot-scale*, J. Food Engineering. 104 (2011) 208-217.
- Thurmond, W., *Algae 2020*, Biofuels Markets, Business Models, Strategies, Players and Commercialization Outlook, Emerging Markets Online Consulting Services, Houston TX, USA (2009).

- Tredici, M. R., *Colture massive di alghe: calamità o risorsa?*, da una lettura tenuta in occasione della giornata di studio dedicata a: “Coltura massiva delle microalghe: il contributo della scuola fiorentina” - Accademia dei Georgofili, Firenze, 30/11/2006.
- Valderrama, J.O., Perrut, M., Majewski, W., *Extraction of Astaxantine and Phycocyanine from microalgae with Supercritical Carbon Dioxide*, J. Chem. Eng. Data. 48 (2003) 827-830.
- Valdez, P.J., Dickinson, J.G., Savage, P.E., *Characterization of product fractions from hydrothermal liquefaction of Nannochloropsis sp. and the influence of solvents*, Energy & Fuels. 25 (2011) 3235-3243.
- Varfolomeev, S.D., Wasserman, L.A., *Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines*, Applied Biochemistry and Microbiology. 47(9) (2011) 789-807.
- Vijayaraghavan, K., Hemanathan, K., *Biodiesel production from freshwater algae*, Energy Fuels. 23 (2009) 5448-5453.
- Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., Chemat, F., *New microwave-integrated Soxhlet extraction, an advantageous tool for the extraction of lipids from food products*, Journal of Chromatography A. 1174 (2007) 138-144.
- Wahlen, B.D., Willis, R.M., Seefeldt, L.C., *Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures*, Bioresource Technology. 102(3) (2011) 2724-2730.
- Wan, M., Wang, R., Xia, J., Rosenberg, J.N., Nie, Z., Kobayashi, N., Oyler, G.A., Betenbaugh, M.J., *Physiological evaluation of a new Chlorella sorokiniana isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures*, Biotechnology and Bioengineering. 109(8) (2012) 1958-1964.
- Wang, C., Chen, L., Rakesh, B., Qin, Y., Lv, R., *Technologies for extracting lipids from oleaginous microorganisms for biodiesel production*, Front. Energy. 6(3) (2012) 266-274.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., *CO₂ bio-mitigation using microalgae*, Applied Microbiology and Biotechnology. 79(5) (2008) 707-718.
- Wang, G., Wang, T., *Lipid and biomass distribution and recovery from two microalgae by aqueous and alcohol processing*, J. Am. Oil Chem. Soc. 89 (2012) 335-345.
- Wang, L., Weller, C.L., *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*, Trends in Food Science & Technology. 17 (2006) 300-312.
- Warner, J.C., Cannon, A.S., Dye, K.M., *Green Chemistry*, Environmental Impact Assessment Review. 24 (2004) 775-799.
- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H., *Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris*, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 40 (2009) 13-20.

- Xu, L., Brilman, D.W.F., Withag, J.A.M., Brem, G., Kersten, S., *Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis*, *Bioresource Technology*. 102 (2011) 5113-5122.
- Xu, R., Mi, Y., *Simplifying the process of microalgal biodiesel production through in situ transesterification*, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 88(1) (2011) 91-99.
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., Dou, C., *Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164(7) (2011) 1215-1224.

Parte IB: Estrazione di limonene dalle bucce di limone di Rocca Imperiale IGP

- Akgün, M., Akgün, N.A., Dinçer, S., *Extraction and modeling of lavender flower essential oil using supercritical carbon dioxide*, *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 473-477.
- Aleksovski, S.A., Sovová, H., *Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L.*, *J. Supercrit. Fluids*. 40 (2007) 239-245.
- Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., *Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor*, *Food Chem.* 128 (2011) 704-710.
- Asekun, O.T., Grierson, D.S., Afolayan, A.J., *Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis**, *Food Chem.* 101 (2007) 995-998.
- Atti-Santos, A.C., Rossato, M., Serafini, L.A., Cassel, E., Moyna, P., *Extraction of Essential Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide*, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48 (2005) 155-160.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., et al., *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*, *J. Food Eng.* 117 (2013) 426-436.
- Bailer, J., Aichinger, T., Hackl, G., de Hueber, K., Dachler, M., *Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway*, *Ind. Crops Prod.* 14 (2001) 229-239.
- Bélanger, A., Dextraze, L., Isnardi, M.J., Chalchat, J.C., Garry, R.P., Collin, G., *Chemical Composition of Essential Oil and Headspace of the Quebec "Myrique baumier" Wax Myrtle (*Myrica gale* L.). Influence of Extraction Process*, *J. Essent. Oil Res.* 9 (1997) 657-662.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Bibliografia

- Ben Hamissa, A.M., Seffen, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., Converti, A., *Phenolics extraction from Agave americana (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor*, Food Bioprod. Process. 90 (2012) 17-21.
- Bensebia, O., Barth, D., Bensebia, B., Dahmani, A., *Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling*, J. Supercrit. Fluids. 49 (2009) 161-166.
- Berna, A., Tárrega, A., Blasco, M., Subirats, S., *Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed*, J. Supercrit. Fluids. 18 (2000) 227-237.
- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F., *A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity*, J. Food Eng. 90 (2009) 409-413.
- Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review*, Int. J. Food Microbiol. 94 (2004) 223-253.
- Calame, J.P., Steiner, R., *CO₂ Extraction in the Flavour and Perfumery Industries*, Chem. Ind. 19 (1982) 399-402.
- Carvalho Jr, R.N., Moura, L.S., Rosa, P.T.V., Meireles, M.A.A., *Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity*, J. Supercrit. Fluids. 35 (2005) 197-204.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P., *Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques*, J. Food Eng. 100 (2010) 50-55.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Sannita, E., Perego, P., *High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins*, Int. J. Food Sci. Technol. 47 (2012) 399-405.
- Celiktas, O.Y., Bedir, E., Sukan, F.V., *In vitro antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide*, Food Chem. 101 (2007) 1457-1464.
- Chemat, S., Aït-Amar, H., Lagha, A., Esveld, D.C., *Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds*, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 44(12) (2005) 1320-1326.
- Chemat, S., Lagha, A., Aït-Amar, H., Bartels, P.V., Chemat, F., *Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds*, Flavour and Fragrance Journal. 19(3) (2004) 188-195.
- Crowell, P.L., *Monoterpenes in breast cancer chemoprevention*, Breast Cancer Res. Treat. 46 (1997) 191-197.
- Crowell, P.L., *Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes*, The Journal of Nutrition. 129(3) (1999) 775S-778S.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Bibliografia

- Crowell, P.L., Ayoubi, A.S., Burke, Y.D., *Antitumorogenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer*, *Diet. Phytochem. Cancer Prev. Treat. - Adv. Exp. Med. Biol.* 401 (1996) 131-136.
- Crowell, P.L., Gould, M.N., *Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene*, *Crit. Rev. Oncog.* 5 (1994) 1-22.
- Crowell, P.L., Lin, S., Vedejs, E., Gould, M.N., *Identification of Metabolites of the Antitumor Agent d-Limonene Capable of Inhibiting Protein Isoprenylation and Cell Growth*, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 31(3) (1992) 205-212.
- Damjanovic, B.M., Skala, D., Petrovic-Djakov, D., Baras, J., *A Comparison Between the Oil, Hexane Extract and Supercritical Carbon Dioxide Extract of Juniperus communis L.*, *J. Essent. Oil Res.* 15 (2003) 90-92.
- del Valle, J.M., Uquiche, E.L., *Particle size effects on supercritical CO₂ extraction of oil-containing seeds*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 1261-1266.
- Diaz, M.S., Brignole, E.A., *Modeling and optimization of supercritical fluid processes*, *J. Supercrit. Fluids.* 47 (2009) 611-618.
- Diaz, S., Espinosa, S., Brignole, E.A., *Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids. Optimal process and solvent cycle design*, *J. Supercrit. Fluids.* 35 (2005) 49-61.
- Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D., *Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction*, *J. Chromatogr. A.* 947 (2002) 23-29.
- Disciplinare “Limone di Rocca Imperiale” IGP, Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Italia, <http://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2052> (2010).
- Edris, A.E., *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review*, *Phyther. Res.* 323 (2007) 308-323.
- Elegbede, J.A., Elson, C.E., Tanner, M.A., Qureshi, A., Gould, M.N., *Regression of Rat Primary Mammary Tumors following Dietary d-Limonene*, *Journal of the National Cancer Institute.* 76(2) (1986) 323-325.
- Elson, C.E., Maltzman, T.H., Boston, J.L., Tanner, M.A., Gould, M.N., *Anti-carcinogenic activity of D-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis*, *Carcinogenesis.* 9 (1988) 331-332.
- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F., *Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation*, *Flavour Fragr. J.* 22 (2007) 494-504.

- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., Chemat, F., *An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel*, J. Chromatogr. A. 1112 (2006) 121-126.
- Ferreira, S.R.S., Meireles, M.A.A., *Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum L.*) essential oil*, J. Food Eng. 54 (2002) 263-269.
- Filho, C.A., Silva, C.M., Quadri, M.B., Macedo, E.A., *Tracer diffusion coefficients of citral and D-limonene in supercritical carbon dioxide*, Fluid Phase Equilib. 204 (2003) 65-73.
- Fisher, K., Phillips, C., *Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?*, Trends Food Sci. Technol. 19 (2008) 156–164.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M.R., Reglero, G., *Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction*, J. Chromatogr. A. 1250 (2012) 34-48.
- Francisco, J. da C., Sivik, B., *Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide*, J. Supercrit. Fluids. 23 (2002) 11-19.
- Gámiz-Gracia, L., Luque de Castro, M.D., *Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques*, Talanta. 51 (2000) 1179-1185.
- Gaspar, F., Lu, T., Santos, R., Al-Duri, B., *Modelling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide*, J. Supercrit. Fluids. 25 (2003) 247-260.
- Glišić, S.B., Mišić, D.R., Stemenić, M.D., Zizovic, I.T., Ašanin, R.M., Skala, D.U., *Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity*, Food Chem. 105 (2007) 346-352.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., García-Viguera, C., *Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health*, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 327-345.
- Goto, M., Roy, B.C., Hirose, T., *Shrinking-core leaching model for supercritical-fluid extraction*, J. Supercrit. Fluids. 9 (1996) 128-133.
- Gould, M.N., *Prevention and therapy of mammary cancer by monoterpenes*, Journal of Cellular Biochemistry. 59 (1995) 139-144.
- Gould, M.N., *Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes*, Environmental Health Perspectives. 105 (1997) 977-979.
- Gould, M.N., Moore, C.J., Zhang, R., Wang, B., Kennan, W.S., Haag, J.D., *Limonene Chemoprevention of mammary carcinoma induction following direct in situ transfer of V-Ha-Ras*, Cancer Research. 54(13) (1994) 3540-3543.

Parte I – PROCESSI ESTRATTIVI

Bibliografia

- Haag, J.D., Lindstrom, M.J., Gould, M.N., *Limonene-induced regression of mammary carcinomas*, *Cancer Res.* 52 (1992) 4021-4026.
- Hardcastle, I., Rowlands, M., Mohan, M., Nutley, B., Jarman, M., *Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene*, *Biochemical Pharmacology.* 57(7) (1999) 801-809.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E., *Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review*, *Food Chem.* 98 (2006) 136–148.
- Hohl, R.J., *Monoterpenes as regulators of malignant cell proliferation*, *Diet. Phytochem. Cancer Prev. Treat. - Adv. Exp. Med. Biol.* 401 (1996) 137-146.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R., *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations*, *Food Chem.* 108 (2008) 986-995.
- Ibrahim, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkala, K., Holopainen, J.K., *Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests*, *Agric. Food Sci. Finl.* 10 (2001) 243-259.
- Kamal, G.M., Anwar, F., Hussain, A.I., Sarri, N., Ashraf, M.Y., *Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels*, *Int. Food Res. J.* 18 (2011) 1275-1282.
- Kaufmann, B., Christen, P., *Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction*, *Phytochemical Analysis.* 13(2) (2002) 105-113.
- Kerrola, K., *Literature review: Isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide*, *Food Rev. Int.* 11 (1995) 547-573.
- Kimball, A.D., *Citrus Processing: A Complete Guide*. Chapman & Hall Food Science Book, 1999.
- Lehotay, S.J., *Supercritical fluid extraction of pesticides in foods*, *J. Chromatogr. A.* 785 (1997) 289-312.
- Louli, V., Folas, G., Voutsas, E., Magoulas, K., *Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂*, *J. Supercrit. Fluids.* 30 (2004) 163-174.
- Maltzman, T.H., Hurt, L.M., Elson, C.E., Tanner, M.A., Gould, M.N., *The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by D-limonene and orange oil*, *Carcinogenesis.* 10 (1989) 781-783.
- Mamma, D., Christakopoulos, P., *Biotransformation of Citrus by-products into value added products*, *Waste and Biomass Valorization* (2013).

- Masango, P., *Cleaner production of essential oils by steam distillation*, Journal of Cleaner Production. 13(8) (2005) 833-839.
- Meghwal, M., Goswami, T.K., *Cryogenic grinding of spices is a novel approach whereas ambient grinding needs improvement*, Cont. J. Food Sci. Technol. 4 (2010) 24-37.
- Miller, J.A., Thompson, P.A., Hakim, I.A., Lopez, A.M., Thomson, C.A., Chew, W., *Safety and feasibility of topical application of limonene as massage oil to the breast*, J Cancer Ther. 3 (2012) 1-12.
- Miller, J.A., Thompson, P.A., Hakim, I.A., Sherry Chow H-H, Thomson, C.A., *d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment*, Oncology Reviews. 5(1) (2011) 31-42.
- Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S., *Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition*, J. Supercrit. Fluids. 14 (1999) 95-104.
- Mira, B., Blasco, M., Subirats, S., Berna, A., *Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel*, Journal of Supercritical Fluids. 9(4) (1996) 238-243.
- Monsálvez, M., Zapata, N., Vargas, M., Berti, M., Bittner, M., Hernández, V., *Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of Drimys winteri bark against Take-All disease*, Ind. Crops Prod. 31 (2010) 239-244.
- Murali, R., Karthikeyan, A., Saravanan, R., *Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats*, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 112 (2013) 175-181.
- Murali, R., Saravanan, R., *Antidiabetic effect of D-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats*, Biomed. Prev. Nutr. 2 (2012) 269-275.
- Naviglio, D., Ferrara, L., *Tecniche estrattive solido-liquido*, Teoria e Pratica, Aracne, Roma (2008).
- Nguyen, H., *Biogas production from solvent pretreated orange peel*, Master of Science Thesis in the Master's Program MPISC, Department of Chemical and Biological Engineering Division of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Goteborg (Sweden), 2012.
- Oliveira, E.L.G., Silvestre, A.J.D., Silva, C.M., *Review of kinetic models for supercritical fluid extraction*, Chem. Eng. Res. Des. 89 (2011) 1104-1117.
- Ozkal, S.G., Yener, M.E., Bayındirli, L., *Mass transfer modeling of apricot kernel oil extraction with supercritical carbon dioxide*, J. Supercrit. Fluids. 35 (2005) 119-127.
- Papamichail, I., Louli, V., Magoulas, K., *Supercritical fluid extraction of celery seed oil*, J. Supercrit. Fluids. 18 (2000) 213-226.

- Pereira, C.G., Gualtieri, I.P., Maia, N.B., Meireles, M.A.A., *Supercritical extraction to obtain vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) extracts from roots cultivated hydroponically*, J. Agric. Sci. Technol. 2 (2008) 44-50.
- Pereira, C.G., Meireles, M.A.A., *Supercritical Fluid Extraction of bioactive compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives*, Food Bioprocess Technol. 3 (2010) 340-372.
- Pino, J.A., Garcia, J., Martinez, M.A., *Solvent Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown Leaf*, J. Essent. Oil Res. 9 (1997) 341-343.
- Pino, J.A., Garcia, J., Martinez, M.A., *Solvent Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Pimenta dioica* Merrill. Leaf*, J. Essent. Oil Res. 9 (1997) 689-691.
- Pino, J.A., Garcia, J., Martinez, M.A., *Comparison of solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of spearmint leaf*, J. Essent. Oil Res. 11 (1999) 191-193.
- Poiana, M., Fresa, R., Mincione, B., *Supercritical carbon dioxide extraction of bergamot peels. Extraction kinetics of oil and its components*, Flavour Fragr. J. 14 (1999) 358-366.
- Poiana, M., Sicari, V., Mincione, B., *A comparison between the chemical composition of the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Citrus medica* cv. Diamante*, J. Essent. Oil Res. 10 (1998) 145-152.
- Poiana, M., Sicari, V., Mincione, B., *Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of grapefruit flavedo*, Flavour Fragr. J. 13 (1998) 125-130.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S., *Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis*, J. Chromatogr. A. 1163 (2007) 2-24.
- Raessi, S., Peters, C.J., *Experimental determination of high-pressure phase equilibria of the ternary system carbon dioxide+limonene+linalool*, J. Supercrit. Fluids. 35 (2005) 10-17.
- Reverchon, E., *Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil*, AIChE J. 42 (1996) 1765-1771.
- Reverchon, E., *Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products*, J. Supercrit. Fluids. 10 (1997) 1-37.
- Reverchon, E., Daghero, J., Marrone, C., Mattea, M., Poletto, M., *Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: Experiments and Mathematical Modeling*, Ind. Eng. Chem. Res. 38 (1999) 3069-3075.
- Reverchon, E., De Marco, I., *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*, J. Supercrit. Fluids. 38 (2006) 146-166.
- Reverchon, E., Marrone, C., *Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling*, Chem. Eng. Sci. 52 (1997) 3421-3428.

- Reverchon, E., Schiraldi, A., Fantozzi, P., *Fluidi Supercritici: Applicazioni AgroAlimentari*. Rome: CNR RAISA (1993) .
- Reverchon, E., Sesti Osséo, L., *Supercritical CO₂ extraction of basil oil: Characterization of products and process modeling*, J. Supercrit. Fluids. 7 (1994) 185-190.
- Reis-Vasco, E.M.C., Coelho, J.A.P., Palavra, A.M.F., *Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation*, Flavour Fragr. J. 14 (1999) 156-160.
- Rezzoug, S.A., Maache-Rezzoug, Z., Mazoyer, J., Jeannin, M., Allaf, K., *Effect of instantaneous controlled pressure drop process on the hydration capacity of scleroglucan: optimisation of operating conditions by response surface methodology*, Carbohydr. Polym. 42 (2000) 73-84.
- Rodrigues, V.M., Rosa, P.T.V., Marques, M.O.M., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A., *Supercritical extraction of essential oil from aniseed (Pimpinella anisum L) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data*, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1518-1523.
- Roy, B.C., Goto, M., Hirose, T., *Extraction of ginger oil with Supercritical Carbon Dioxide: Experiments and Modeling*, Ind. Eng. Chem. Res. 35 (1996) 607-612.
- Sahraoui, N., Vian, M.A., El Maataoui, M., Boutekdjiret, C., Chemat, F., *Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD)*, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 12 (2011) 163-170.
- Salgın, U., Döker, O., Çalimli, A., *Extraction of sunflower oil with supercritical CO₂: Experiments and modeling*, J. Supercrit. Fluids. 38 (2006) 326-331.
- Sargenti, S.R., Lanças, F.M., *Influence of the Extraction Mode and Temperature in the Supercritical Fluid Extraction of Tangor murcote (Blanco) X Citrus sinensis (Osbeck)*, J. Microcolumn Sep. 10 (1998) 213-223.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, L.Y., *Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts*, African J. Tradit. Complement. Altern. Med. 8 (2011) 1-10.
- Schaneberg, B.T., Khan, I.A., *Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC*, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 1345-1349.
- Sessa, M., Casazza, A.A., Perego, P., Tsao, R., Ferrari, G., Donsi, F., *Exploitation of polyphenolic extracts from grape marc as natural antioxidants by encapsulation in lipid-based nanodelivery Systems*, Food Bioprocess Technol. 6 (2012) 2609-2620.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R., *Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – A review of current status*, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 53 (2012) 10-23.

- Sokkar, N.M., *Investigations of Essential Oil and N-Hexane Extract of Elletaria cardamomum Seed*, J. Essent. Oil Bear. Plants. 11 (2008) 365-375.
- Sovová, H., *Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation*, J. Supercrit. Fluids. 33 (2005) 35-52.
- Sovová, H., *Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ - I. Modelling of extraction curves*, Chem. Eng. Sci. 49 (1994) 409-414.
- Sovová, H., Komers, R., Kučera, J., Jež, J., *Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil*, Chem. Eng. Res. Des. 49 (1994) 2499-2505.
- Sovová, H., Stateva, R.P., Galushko, A.A., *Essential oils from seeds: solubility of limonene in supercritical CO₂ and how it is affected by fatty oil*, J. Supercrit. Fluids. 20 (2001) 113-129.
- Sugiyama, K., Saito, M., *Simple microscale supercritical fluid extraction system and its application to gas chromatography-mass spectrometry of lemon peel oil*, J. Chromatogr. 442 (1988) 121-131.
- Sun, J., *D-Limonene: Safety and Clinical Applications*, Altern. Med. Rev. 12 (2007) 259–264.
- Thoppil, R.J., Bishayee, A., *Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer*, World J. Hepatol. 3 (2011) 228-249.
- Vági, E., Simándi, B., Suhajda, Á., Héthelyi, É., *Essential oil composition and antimicrobial activity of Origanum majorana L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide*, Food Res. Int. 38 (2005) 51-57.
- Vinatoru, M., *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*, Ultrason. Sonochem. 8 (2001) 303-313.
- Virost, V., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F., *Green procedure with a green solvent for fats and oils determination. Microwave integrated soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation*, J. Chromatogr. A. 1196 (2008) 147-152.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., *Antibacterial activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils*, J. Food Saf. 28 (2008) 567-576.
- Wang, L., Weller, C.L., *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*, Trends Food Sci. Technol. 17 (2006) 300-312.
- Xu, L., Zhan, X., Zhaowu, Z., Chen, R., Li, H., Wang, S., *Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils*, African J. Pharm. Pharmacol. 5 (2011) 1196-1211.
- Yamauchi, Y., Sato, M., *Fractionation of lemon-peel oil by semi-preparative supercritical fluid chromatography*, Journal of Chromatography. 550 (1990) 237-246.

Yin, J.-Z., Wang, A.-Q., Wei, W., Liu, Y., Shi, W.-H., *Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil*, Sep. Purif. Technol. 43 (2005) 163-167.

Zizovic, I., Stamenić, M., Orlović, A., Skala, D., *Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization*, Chem. Eng. Sci. 60 (2005) 6747-6756.

Zizovic, I., Stamenić, M., Orlović, A., Skala, D., *Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale*, J. Supercrit. Fluids. 39 (2007) 338-346.

PARTE II

Processi di bioconversione

Introduzione

Con il progresso inarrestabile degli ultimi secolo il fabbisogno energetico è cresciuto esponenzialmente e continua ad aumentare di anno in anno, ma il ridursi delle riserve di petrolio e il suo massiccio consumo (10^5 volte più veloce della sua formazione in natura [Netravali & Chabba, 2003]) ha portato a un aumento dei prezzi su tutto il mercato internazionale. La dipendenza dalle fonti fossili può essere superata solo incentivando lo sviluppo di tecnologie alternative per la produzione di energia. Inoltre, una fra le maggiori cause dei problemi ambientali odierni che interessano l'intero pianeta è l'emissione di gas serra. Secondo la definizione presente nel glossario dell'IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, <http://www.ipcc.ch/>), i gas serra sono “gas presenti in atmosfera, di origine naturale o antropica, trasparenti alla radiazione solare in entrata sulla Terra ma capaci di trattenere, in maniera consistente, la radiazione infrarossa emessa dalla superficie terrestre, dall'atmosfera e dalle nuvole”; questo processo è la causa principale del riscaldamento globale. I principali gas serra nell'atmosfera terrestre sono il vapore acqueo, l'anidride carbonica, il metano e il biossido di azoto. Oltre a questi gas di origine sia naturale sia antropica, esiste un'ampia gamma di gas di origine esclusivamente antropica, come gli alocarburi (tra i quali i più conosciuti sono i clorofluorocarburi) e altre molecole contenenti cloro e fluoro, le cui emissioni sono regolamentate dal Protocollo di Montreal. Secondo l'EEA (*European Environment Agency*, http://www.eea.europa.eu/publications/eea_report_2009_9) le fonti antropogeniche maggiormente responsabili dell'emissione dei gas serra nell'Unione Europea sono i settori della fornitura/utilizzo di energia, dei trasporti e dell'agricoltura; nella Figura I.1 sono rappresentate le emissioni in termini di CO₂ equivalente.

Dai dati dell'ESRL (*Earth System Research Laboratory*, <http://www.esrl.noaa.gov/>), è evidente che dalla rivoluzione industriale l'utilizzo di combustibili fossili ha contribuito all'aumento della concentrazione dell'anidride carbonica in atmosfera da 280 ppm a 390 ppm, soprattutto a causa della combustione di carbone, petrolio e gas naturale.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Introduzione

Il problema delle emissioni di gas serra aumenta notevolmente se si considera la crescita di nuovi paesi emergenti come India e Cina, con un conseguente maggiore consumo di fonti fossili per la produzione di energia.

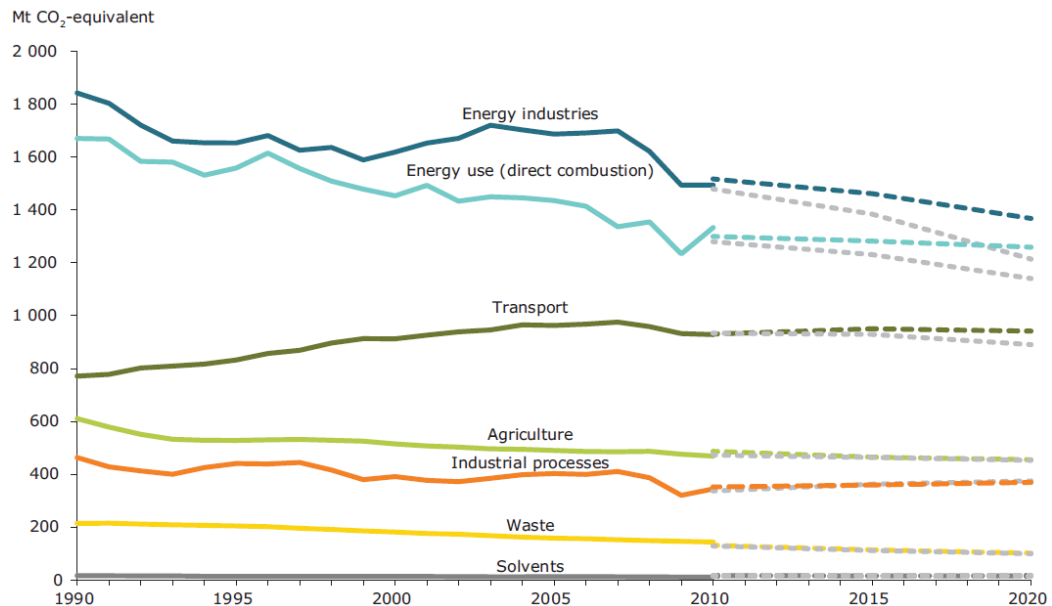


Fig. I.1 - Andamento e proiezione delle emissioni dei gas serra in termini di CO₂ equivalente per diversi settori; dati forniti dall'European Environment Agency (http://www.eea.europa.eu/publications/eea_report_2009_9).

Il riscaldamento globale è un processo che influisce negativamente su diversi aspetti della vita umana e dell'ambiente. Inoltre, secondo il lavoro di *Ormerod et al.* (2002), gli oceani assorbono circa un terzo dell'anidride carbonica emessa ogni anno dalle attività umane e, all'aumentare della sua quantità in atmosfera, anche la quantità sciolta aumenta, rendendo il pH dell'acqua sempre più acido. Questa diminuzione del pH potrebbe causare un rapido danneggiamento delle barriere coralline e una perdita di biodiversità nell'ecosistema marino, con gravi implicazioni per la vita negli oceani e di conseguenza sulla terra.

Per contrastare questi problemi, è necessario agire su più fronti; una delle possibili soluzioni consiste nell'individuazione di fonti rinnovabili di energia pulita, che permetterebbe anche di risolvere il problema legato alla riduzione delle riserve del petrolio e alle crescenti difficoltà nella sua estrazione e trasformazione (*Singh & Gu, 2010*). Trovare fonti di energia pulita e rinnovabile diventa, quindi, una delle maggiori sfide per l'uomo, con ripercussioni nel medio-lungo termine sullo sviluppo economico, sulla stabilità globale, sulla prosperità e qualità della

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Introduzione

vita umana. Finora sono state studiate e implementate diverse opzioni con più o meno successo, come l'utilizzo di energia solare (sia termica sia fotovoltaica), idroelettrica, geotermica ed eolica e i biocarburanti, la cui produzione potrebbe offrire nuove opportunità di diversificazione del reddito, promuovere l'occupazione nelle aree rurali, sviluppare una completa sostituzione dei combustibili fossili a lungo termine e ridurre le emissioni dei gas serra. I biocarburanti più comuni sono il biodiesel e il bioetanolo, che possono sostituire rispettivamente diesel e benzina nei veicoli con modifiche motoristiche piccole o nulle. Tali carburanti vengono prodotti principalmente da biomassa o da fonti di energia rinnovabile e, confrontandoli con i combustibili fossili, producono emissioni inferiori a parità di potenza generata. Per queste ragioni essi sono considerati come una valida alternativa, almeno finché altre opzioni più difficili da realizzare, come ad esempio l'impiego dell'idrogeno, non saranno disponibili.

Benché i biocarburanti siano in generale più costosi dei combustibili fossili, nella Figura I.2 è evidente come la loro produzione continui ad aumentare in tutti i paesi del mondo, anche per effetto degli incentivi statali, anche se nel 2012 solo il 7.8% dei 15 TW di energia consumati ogni anno nel mondo deriva da fonti rinnovabili (*Jones & Mayfield, 2012*).

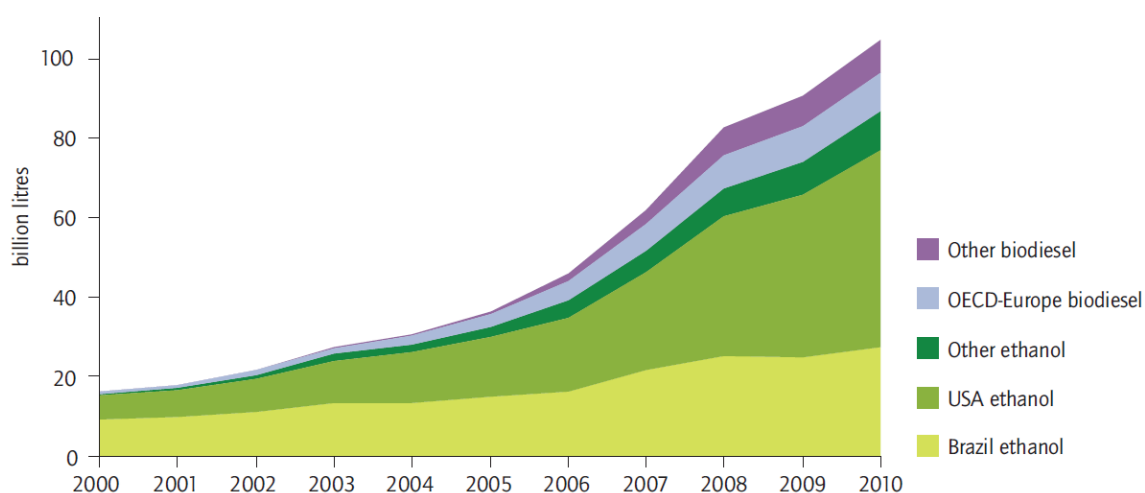


Figura I.2. Produzione globale di biocarburanti. Risultati presentati in IEA 2010
(http://www.iea.org/papers/2011/biofuels_roadmap.pdf).

Tuttavia, la produzione dei biocarburanti di prima generazione – da zuccheri, amidi e oli derivanti dalle colture alimentari quali mais, soia, palma e canna da zucchero – presenta delle limitazioni; ad esempio, nella produzione del biodiesel, il mercato potenziale richiede una quantità di materia prima largamente superiore a quella disponibile. Infatti, secondo la RFA

(*Renewable Fuel Agency, 2008*), le piantagioni intensive e l'aumento delle terre coltivate potrebbe portare a una competizione con i terreni destinati a uso agricolo e a una perdita di biodiversità dovuta all'aumento della deforestazione e allo sfruttamento di aree di importanza ecologica. Un altro aspetto da considerare è la competizione che si potrebbe creare nell'approvvigionamento della materia prima, considerandola parte comune in diversi processi di trasformazione. La concorrenza con l'olio vegetale rappresenta una delle cause principali del costo elevato del biodiesel, ma il problema principale della prima generazione di biocombustibili è rappresentato, in ogni caso, dal fatto che essi sono in tenace competizione con l'industria alimentare (*Singh et al., 2011; Rawat et al., 2013*). A causa di queste criticità, la ricerca si è orientata verso prodotti non edibili, ricavati da scarti o da coltivazioni di terreni di scarso interesse agro-forestale: i biocarburanti di seconda generazione (*Carriquiry et al., 2011*). I residui ligno-cellulosici sono destinati essenzialmente alla produzione di etanolo (*Huang et al., 2009; Jones & Mayfiels, 2012*) e la cellulosa è la materia prima processata in impianti biochimici in cui è resa biodegradabile per i microrganismi coinvolti nel processo di fermentazione degli zuccheri e in impianti termochimici in cui esplosioni di vapore trasformano la biomassa in liquido e gas da combustione. Fanno parte dei biocarburanti di seconda generazione anche tutti quelli derivati da materie prime di scarto – non necessariamente ligno-cellulosiche – non commestibili e quindi non in competizione con l'industria alimentare, come ad esempio, olio non edibile (jojoba, jatropha), olio di frittura esausto, lubrificanti e grassi impiegati per ottenere biodiesel. Il problema è che la quantità disponibile di tali materiali risulta comunque insufficiente per soddisfare la domanda di biodiesel (*Ahmad et al., 2011*). La terza generazione di biocarburanti prevede la scelta e selezione di specie in grado di aumentare la resa energetica di coltivazioni dedicate, non in concorrenza con le coltivazioni agricole perché realizzate non in terreni agricoli o distese forestali, ma in terreni marginali come quelli desertici o addirittura il mare (*Satyanarayana et al., 2011*). Tra queste ci sono le colture algali intensive per fini energetici, di mare o di acqua dolce. In particolare, la ricerca ruota intorno allo studio di colture di microalghe ad alto tenore lipidico e zuccherino, da cui ottenere rispettivamente biodiesel e bioetanolo (*Chisti, 2008; Jones & Mayfield, 2012; Lam & Lee, 2012*), oltre che biogas e bioidrogeno (Figura I.3).

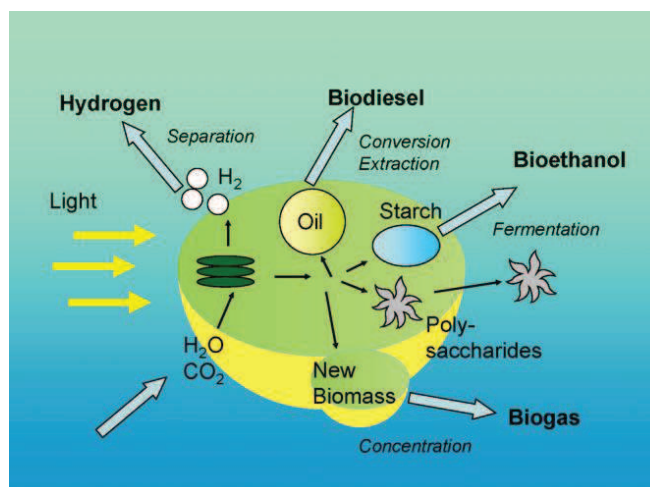


Fig. I.3 - Biocombustibili ottenibili dalle microalghe (Posten & Schaub, 2009).

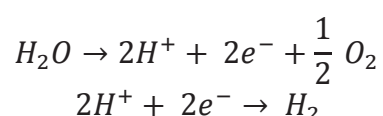
Lo sfruttamento delle microalghe anche perché la loro coltivazione non è direttamente collegata al consumo umano e che la loro produzione richiede poco spazio e non è a carattere stagionale, per cui può essere garantita un'alta produttività durante tutto l'anno. Tuttavia, nonostante i grossi sforzi della comunità scientifica su questo argomento con centinaia di articoli scientifici soprattutto negli ultimi anni (Hossain et al., 2008; Li Q. et al., 2008; Li Y. et al., 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Meng et al., 2009; Vijayaraghavan & Hemanathan, 2009; Kumar et al., 2010; Scott et al., 2010; Ahmad et al., 2011; Demirbas, 2011; Demirbas & Demirbas, 2011; Malcata, 2011; Vieira Costa & Greque de Morais, 2011; Amaro et al., 2012; Jones & Mayfield, 2012; Suali & Sarbatly, 2012; Borowitzka & Moheimani, 2013; Rawat et al., 2013), la produzione di biocombustibili da microalghe è ancora in una fase embrionale e sono ancora pochi gli impianti in scala prototipale o industriale nel mondo (Singh & Gu, 2010); lo sviluppo e il perfezionamento dei processi tecnologici necessita di investimenti consistenti in ricerca e sviluppo e l'adozione di politiche e strategie corrette per regolare e supportare tutte le fasi della produzione, dalla coltivazione delle materie prime alla distribuzione e al consumo finale.

Tale ricerca si inserisce perfettamente nel progetto PON01_02061 descritto nell'Allegato. In particolare, dopo aver affrontato lo studio della crescita delle microalghe nei fotobioreattori, la loro raccolta e separazione dal terreno di coltura e l'estrazione dei lipidi (Parte IA), è necessario approfondire gli aspetti legati alla conversione vera e propria dei lipidi e della biomassa residua per ottenere i biocombustibili. Come evidenziato in Figura I.4, la

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Introduzione

conversione può avvenire per via biochimica o per via termochimica (Amin, 2009; Brennan & Owende, 2010). Mediante i processi biochimici, è possibile ottenere bioetanolo, biogas e biodiesel. In particolare, il bioetanolo è il prodotto della fermentazione eterotrofica dell'amido prodotto dalle alghe mediante la fotosintesi e portata avanti in condizioni anaerobiche e in assenza di luce. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è indicato come iniziatore della fermentazione, che porta alla produzione di etanolo e altri alcoli e che può essere attuata senza il preventivo essiccamento della biomassa, anche se la separazione tra l'alcol prodotto e l'acqua può risultare più onerosa. In seguito a un processo di digestione anaerobica, invece, è possibile produrre un gas (il biogas appunto) a base di metano (55-75%) e biossido di carbonio (25-45%). Inoltre, le microalghe sono in grado di produrre idrogeno (Jones & Mayfield, 2012) a partire dall'acqua mediante un processo foto-biologico attraverso l'utilizzo della luce solare che può essere espresso attraverso le seguenti reazioni (la prima in condizioni aerobiche e la seconda in condizioni anaerobiche):



Infine, il biodiesel si ottiene mediante transesterificazione con alcol degli oli ricchi in trigliceridi estratti dalle microalghe. I processi di conversione biochimica possono essere integrati tra loro per aumentare il potenziale economico del sistema. Ad esempio, la CO₂ prodotta nel processo di fermentazione e in quello di digestione anaerobica potrebbe essere riciclata per la crescita delle microalghe, mentre la biomassa residua dopo la fermentazione a bioetanolo o dopo l'estrazione di lipidi destinati al biodiesel andrebbe incontro a un processo di digestione anaerobica per la produzione di metano (Harun et al., 2010).

Per quanto riguarda, invece, le conversioni termochimiche, la biomassa può essere convertita in:

- gas di sintesi (syngas, cioè una miscela di CO, CH₄, CO₂ e H₂) mediante gassificazione in aria, ossigeno e/o vapore ad alta temperatura (800-900°C) oppure a temperatura minore (400°C) con un catalizzatore metallico;
- carburante liquido mediante liquefazione con acqua in condizioni supercritiche (circa 300°C e 10 MPa) con sali alcalini (Na₂CO₃);
- biocarburante liquido, residuo carbonioso (*biochar*, che ha mercato come fertilizzante per terreni) e gas, eseguendo una combustione a 500°C in assenza di aria (pirolisi) (Du et al.,

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Introduzione

2011). Infine, si può bruciare direttamente la biomassa in presenza di aria (combustione) convertendola in gas caldi da usare per produrre energia elettrica.

Nel lavoro affrontato durante il dottorato sono stati studiati due processi di conversione biochimica: la transesterificazione degli oli e la digestione anaerobica della biomassa residua. In particolare, nella parte IIA di questa tesi è stato affrontato lo studio della transesterificazione dei trigliceridi in generale e di quelli di origine microalgale nello specifico. Inoltre, è stata condotta una sperimentazione approfondita sulla reazione catalizzata da enzimi, alternativa a quella tradizionale basica. Essendo prevista una lunga fase progettuale e di revisione/ottimizzazione, non è stato possibile produrre quantità consistenti di microalghe nell'impianto prototipale per quasi tutta la durata del dottorato e i lipidi estratti in scala di laboratorio sono stati sempre dell'ordine dei milligrammi o al massimo dei grammi, insufficienti per lo studio che si è voluto condurre. Di conseguenza, per ragioni di natura essenzialmente "quantitativa", la sperimentazione è stata realizzata a partire da oli di origine vegetale, nell'ottica di sfruttare i risultati per i filoni di ricerca legati all'ottenimento di biodiesel sia da oli microalgali sia da oli di frittura esausti.

Nella parte IIB, invece, è stata studiata la digestione anaerobica di microalghe e la co-digestione con altre biomasse di scarto, tra le quali il pastazzo di agrumi residuo dopo la lavorazione degli agrumi e dopo l'estrazione del limonene descritta nella Parte IB.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Introduzione

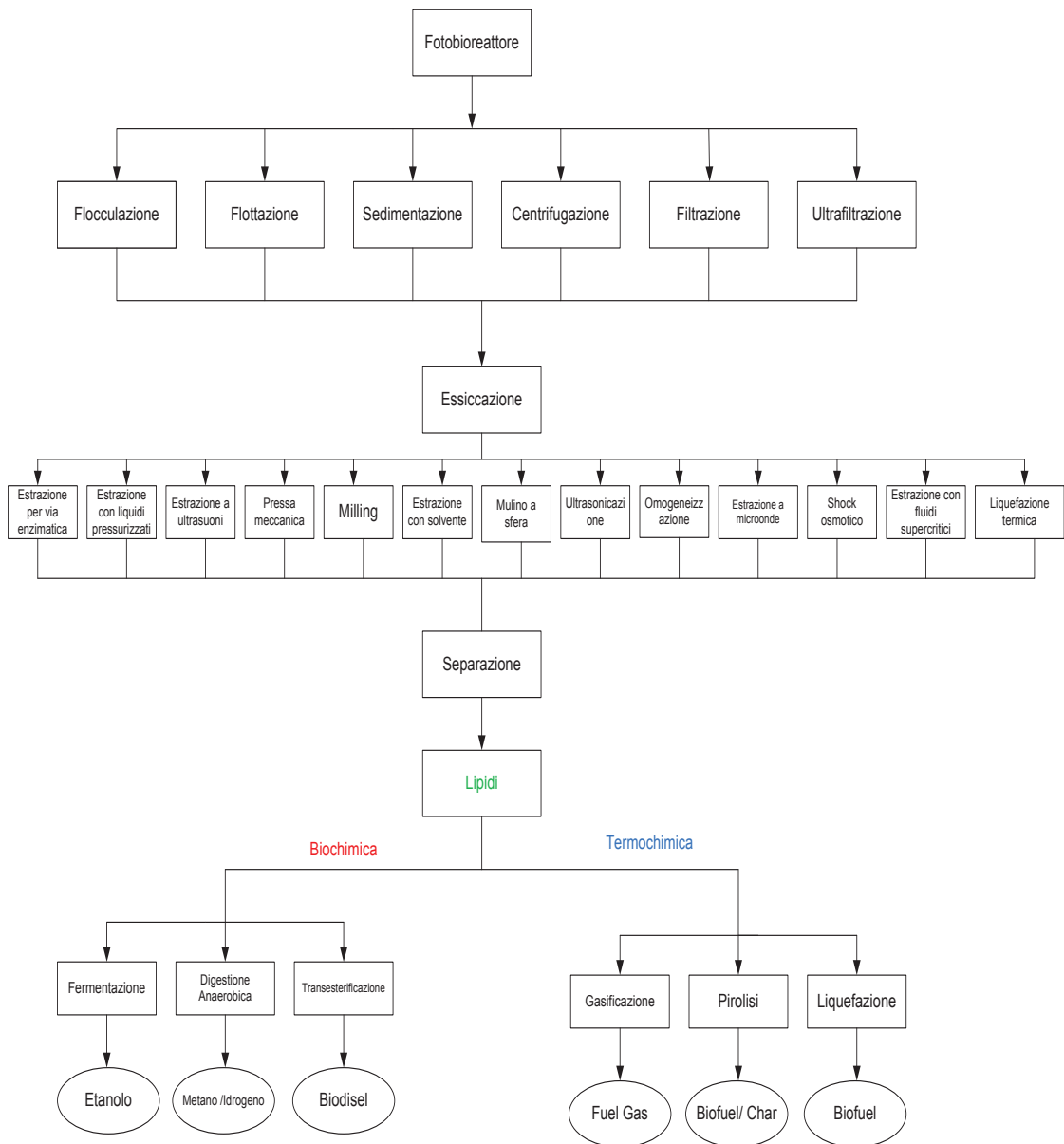


Figura I.4 - Schema a blocchi di un processo di produzione di biocarburanti a partire dalla coltura delle alghe con indicati i possibili metodi operativi per ogni fase.

Parte IIA

**PRODUZIONE DI BIODIESEL MEDIANTE
TRANSESTERIFICAZIONE DI TRIGLICERIDI**

Capitolo 1

Il biodiesel: stato dell'arte

1.1 Cos'è il biodiesel?

1.1.1 Caratteristiche del biodiesel come combustibile

L'intuizione di usare un olio vegetale come combustibile alternativo a quello di origine fossile fu di Rudolf Diesel, il quale in un discorso del 1912 disse: «[...] *l'uso di oli vegetali per il combustibile dei motori può sembrare insignificante oggi, ma tali oli possono diventare, nel corso del tempo, importanti quanto i derivati dal petrolio e dal carbone dei nostri giorni*». La ricerca sugli oli vegetali da usare come combustibili si intensificò in periodi di bisogno energetico quali la I e la II Guerra Mondiale e la crisi degli anni '70. In realtà, pur essendo un buon combustibile con un potere calorifico pari a circa il 90% di quello del diesel, l'olio vegetale non forniva prestazioni soddisfacenti a causa della sua bassa volatilità e alta viscosità e portava, in seguito alla combustione, alla formazione di depositi carboniosi sul sistema di iniezione con conseguente deterioramento delle guarnizioni dei pistoni. Si è, quindi, lavorato nella direzione di abbassare la viscosità degli oli/grassi di origine vegetale o animale al fine di renderli carburanti adatti per i motori diesel.

Il biodiesel è un biocombustibile che dal punto di vista chimico si presenta come una miscela di esteri alchilici (solitamente esteri metilici, FAME) con lunghe catene di acidi grassi, ottenuta a partire da fonti biologiche quali oli vegetali e grassi animali (*Vasudevan & Briggs, 2008*). Esso rappresenta un'ottima alternativa al combustibile fossile (*Demirbas, 2007*), perché non è infiammabile, né tossico e a differenza del diesel prodotto a partire dal petrolio, la sua combustione produce una minore quantità di monossido di carbonio, diossido di zolfo, idrocarburi incombusti e particolato (*Agarwal & Das, 2001*). Inoltre, il biodiesel ha un'alta biodegradabilità, perché la catena lineare di carbonio, con atomi di ossigeno alle estremità che

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

lo caratterizza è più facilmente attaccabile dai batteri che in natura degradano oli e grassi, rispetto al gasolio che è povero di ossigeno ed è costituito da una miscela complessa di idrocarburi con numerosi legami doppi, catene ramificate, anelli ecc. Il rovescio della medaglia della biodegradabilità del metil estere è ovviamente la minor stabilità che crea problemi nello stoccaggio del prodotto tal quale e delle miscele biodiesel/gasolio.

Tuttavia, la maggiore barriera alla sua commercializzazione è il costo superiore rispetto a quello del diesel fossile, dovuto essenzialmente al fatto che più del 95% delle fonti utilizzate per la produzione del biodiesel provengono dagli oli commestibili di elevata qualità. Anche l'impiego di oli non commestibili non risulta esente da problemi; la maggior parte di questi oli, infatti, contiene un'elevata quantità di acidi grassi liberi e ciò potrebbe aumentare i livelli di complessità dei processi produttivi richiedendo, ad esempio, di alternare diversi approcci oppure aggiungere ulteriori step, che aumentano il costo di produzione e riducono la resa al di sotto degli standard. I grassi animali, invece, contengono maggiormente acidi grassi saturi e di solito esistono in forma solida a temperatura ambiente, il che può causare problemi nel processo di produzione. Perciò materie prime più economiche come olio esausto (*Zhang et al., 2003; Kansedo et al., 2009*) presentano un elevato potenziale per produrre biodiesel a basso costo competitivo, dal punto di vista del prezzo, con il diesel.

Dal punto di vista ingegneristico il biodiesel presenta una migliore lubrificazione del motore rispetto al diesel, determinando una sensibile riduzione dei costi di manutenzione e allungandone la vita. La scelta oculata dell'olio (la composizione in acidi grassi), dell'alcol e della tecnologia di processo consentono di produrre biodiesel di qualità, capace di migliorare significativamente le performances ingegneristiche e ambientali.

1.1.2 Gli oli vegetali di partenza

Il biodiesel può essere ottenuto da un grandissimo numero di oli (*Demirbas, 2009*): basti pensare che sulla terra ci sono oltre 4000 specie vegetali da cui si può estrarre l'olio (*Santori et al., 2012*), come ad esempio quelle riportate in Tabella 1.1 in ordine crescente della loro resa per ettaro. L'olio vegetale è una miscela di acidi grassi liberi, glicerolo, monogliceridi, digliceridi, trigliceridi, glicerolo, fosfatidi, lipoproteine, glicolipidi, cere, terpeni ed altri composti. Tra tutti, i più importanti, per percentuale in peso, sono gli acidi grassi liberi e il glicerolo. Ogni olio si distingue da un altro secondo il tipo e la distribuzione percentuale di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

tali molecole. In Tabella 1.2 vengono riportate le caratteristiche chimico-fisiche di alcuni oli utilizzati per la produzione del biodiesel.

Tab. 1.1 - Resa annuale di olio per ettaro coltivato [kg/ha].

Crop	Crop	Crop	Crop	Crop	Crop
Maize	145	Pumpkin	449	Opium	978
Lupine	195	Mustard	481	Rape	1000
Hibiscus	230	Camelina	490	Olive	1019
Calendula	256	Sesame	585	Ricin	1188
Cotton	273	Safflower	655	Jojoba	1528
Hemp	305	Rice	696	Jatropha	1590
Soy	375	Walnut	790	Avocado	2217
Coffee	386	Sunflower	800	Coconut	2260
Flax	402	Cocoa	863	Palm	5000
Hazelnut	405	Peanuts	890		

Tab. 1.2 - Alimentazioni per la produzione del biodiesel e loro proprietà fisico-chimiche.

Type of oil	Species	Main chemical composition (fatty acid composition wt.%)	Density (g/cm ³)	Flash point (°C)	Kinematic viscosity (cst, at 40 °C)	Acid value (mg KOH/g)	Heating value (MJ/kg)	
<i>Vegetable oil</i>								
Edible oil	Soybean	C16:0, C18:1, C18:2	0.91	254	32.9	0.2	39.6	
	Rapessed	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.91	246	35.1	2.92	39.7	
	Sunflower	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.92	274	32.6	-	39.6	
	Palm	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.92	267	39.6 ^a	0.1	-	
	Peanut	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:0, C22:0	0.90	271	22.72	3	39.8	
	Corn	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3	0.91	277	34.9 ^a	-	39.5	
	Camelina	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1, C20:3	0.91	-	-	0.76	42.2	
	Canola	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3	-	-	38.2	0.4	-	
	Cotton	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.91	234	18.2	-	39.5	
	Pumpkin	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.92	>230	35.6	0.55	39	
Non-edible oil	Jatropha curcas	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2	0.92	225	29.4	28	38.5	
	Pongamia pinnata	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3	0.91	205	27.8	5.06	34	
	Sea mango	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.92	-	29.6	0.24	40.86	
	Palanga	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.90	221	72.0	44	39.25	
	Tallow	C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2	0.92	-	-	-	40.05	
	Nile tilapia	C16:0, C18:1, C20:5, C22:6, other acids	0.91	-	32.1 ^b	2.81	-	
	Poultry	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3	0.90	-	-	-	39.4	
	Others	Used cooking oil	Depends on fresh cooking oil	0.90	-	44.7	2.5	-

^a Kinematic viscosity at 38 °C, mm²/s.

^b Kinematic viscosity at 37 °C, mm²/s.

L'olio proveniente dalle colture vegetali contiene circa il 90-98% di **acilgliceroli**, una classe di lipidi saponificabili formati da una molecola di glicerolo e da 1 fino a 3 molecole di acidi grassi. Essi derivano dalla naturale esterificazione degli acidi grassi col glicerolo per sostituzione dei gruppi ossidrilici e sono, perciò, caratterizzati da un gruppo acilico (RCO). Vengono classificati in monoacilgliceroli (monogliceridi), diacilgliceroli (digliceridi) e

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

triacilgliceroli (trigliceridi), a seconda del numero di gruppi ossidrilici sostituiti, come si può osservare in Figura 1.1. La catena acilica rappresenta circa l'85-88% del peso totale di un trigliceride, a seconda del tipo di grasso, e possono essere suddivisi in acidi grassi saturi e insaturi. Gli acilgliceroli sono molecole apolari insolubili in acqua, ma facilmente solubili nei solventi organici. I gliceridi che contengono lo stesso acido grasso nelle posizioni sostituite sono detti semplici (es. trioleina, dioleina, tristearina), mentre quelli con diversi acidi grassi sono detti misti.

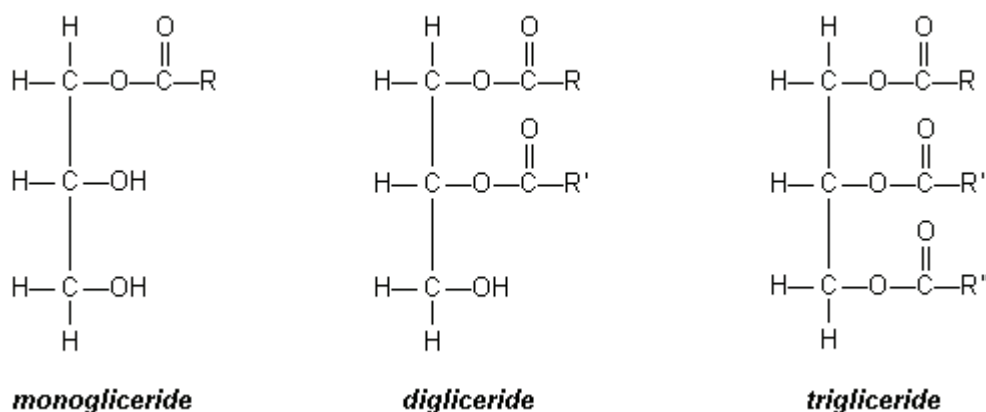


Fig. 1.1 - Formule di struttura di un monogliceride, digliceride e trigliceride

Gli **acidi grassi** sono formati da una catena di atomi di carbonio (C) legati tra loro con un legame singolo (acidi grassi saturi), doppio o triplo (acidi grassi insaturi). Le valenze libere sono legate ad atomi di idrogeno (H), mentre il primo atomo di carbonio costituisce un gruppo carbossilico (COOH). Il numero di atomi di carbonio e di doppi legami è rappresentato dalla espressione "n:n", quindi, ad esempio, l'acido oleico può essere indicato come 18:1 perché è formato da 18 atomi di carbonio e da un unico doppio legame. Gli acidi grassi in un olio possono essere liberi (free fatty acids o FFA) o legati sotto forma di acilgliceroli; i primi sono presenti in percentuale minima nell'olio vegetale, mentre è più facile osservarli nelle forme esterificate, legate cioè ad una molecola di glicerolo per formare mono-, di- e trigliceridi.

Gli oli vegetali contengono, in genere, acidi grassi con un numero di atomi di carbonio che vanno da 12 (C12) a 22 (C22), come mostrato in Tabella 1.3. Alcuni di questi, pur contenendo lo stesso numero di atomi di carbonio possono presentare una o più insaturazioni (doppi legami carbonio-carbonio). L'acido stearico, ad esempio, non contiene doppi legami (C18) in quanto saturo, mentre l'acido oleico ne contiene uno ed il linoleico due. All'aumentare del

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

numero di insaturazioni la molecola diventa più instabile e quindi più facilmente degradabile dal calore o dalla luce. Difatti gli acidi grassi insaturi hanno punti di fusione più bassi di quelli saturi, tanto che a temperatura ambiente quelli insaturi sono oleosi mentre quelli saturi cerosi. La presenza prevalente di un acido rispetto ad altri determina la variazione di parametri quali la viscosità, il punto di congelamento, il flash point o punto di infiammabilità, ecc.

Tab. 1.3 - Classificazione degli acidi grassi.

Saturi	Mono-insaturi	Di-insaturi	Tri-insaturi
Ac. caprilico (8:0)	-	-	-
Ac. caprico (10:0)	-	-	-
Ac. laurico (12:0)	-	-	-
Ac. miristico (14:0)	Ac. miristoleico (14:1)	-	-
Ac. palmitico (16:0)	Ac. palmitoleico (16:1)	-	-
Ac. stearico (18:0)	Ac. oleico (18:1)	Ac. linoleico (18:2)	Ac. linolenico (18:3)
Ac. arachidico (20:0)	Ac. gadoleico (20:1)	Ac. erucico (22:1)	-
Ac. beenico (22:0)	-	-	-
Ac. lignocerico (24:1)	-	-	-

Gli oli più interessanti per la trasformazione in biodiesel sono quelli ad alto contenuto di acido oleico e linoleico (per la facilità di combustione e la buona stabilità ossidativa) e con il minor contenuto di acidi a lunga catena di atomi di carbonio; questi ultimi presentano un punto di congelamento troppo elevato. Seguendo queste due semplici indicazioni, dalla Tabella 1.4, si evince che solo poche specie oleose soddisfano questi requisiti.

Tab. 1.4 - Composizione in acidi grassi di oli diversi (Tyson, 2001).

Acido grasso	C8	C10	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C 18:2	C 18:3	C20+C22	C20:1+C22:1
Grassi animali	—	—	—	1	25 — 30	2 — 3	12 — 16	41 — 51	4 — 22	—	—	2 — 3
noce di cocco	5 — 9	4 — 10	44 — 51	13 — 18	7 — 10	2 — 5	1 — 4	5 — 8	1 — 3	—	—	—
palma kernal	2 — 4	3 — 7	45 — 52	14 — 19	6 — 9	—	1 — 3	10 — 18	1 — 2	—	1 — 2	—
palma kernal	—	—	—	1 — 6	32 — 47	0 — 1	1 — 6	40 — 52	2 — 11	—	—	—
cartamo	—	—	—	—	5,2	—	2,2	76,3	16,2	—	—	—
arachide	—	—	—	0,5	6 — 11	1 — 2	3 — 6	39 — 66	17 — 38	—	5 — 10	—
cotone	—	—	—	0 — 3	17 — 23	—	1 — 3	23 — 41	34 — 55	—	—	2 — 3
mais	—	—	—	0 — 2	8 — 10	1 — 2	1 — 4	30 — 50	34 — 56	—	—	0 — 2
girasole	—	—	—	—	6	—	4,2	18,7	69,3	0,3	5 — 10	—
soia	—	—	—	0,3	7 — 11	0 — 1	3 — 6	22 — 34	50 — 60	2 — 10	—	—
colza	—	—	—	—	2 — 5	0,2	1 — 2	10 — 15	10 — 20	5 — 10	—	50 — 60
lino	—	—	—	0,2	5 — 9	—	0 — 1	9 — 29	8 — 29	45 — 67	—	—
senape	—	—	—	—	3	—	1,5	15 — 60	12	5 — 10	—	10 — 60

In particolare, girasole, soia, mais, cotone, arachide e cartamo presentano composizioni ottimali; da notare, la composizione dei grassi animali che vede concentrati su C16 e C18

saturo e monoinsaturo oltre il 95% degli acidi, per cui la produzione di oli a partire dai grassi animali è un ottimo percorso di riciclo.

Come già affermato, sono le proprietà degli oli a determinare quali varietà di semi oleosi siano più inclini ad essere trasformati in biodiesel, poiché, dal punto di vista chimico, gli oli sono equivalenti, in quanto contengono tutti circa 9 derivati di acidi grassi. È piuttosto la loro composizione o ripartizione degli acidi grassi a determinare fortemente le proprietà tecnologiche. Nella Tabella 1.5, gli oli più comuni sono stati caratterizzati e confrontati con i rispettivi esteri metilici e il diesel fossile. In essa viene riportato il *numero di cetano* che indica il comportamento all'accensione e quindi influenza l'avviamento a freddo, la combustione e la rumorosità del motore.

Tab. 1.5 - Caratteristiche di oli ed esteri confrontati con il diesel fossile.

PROPRIETA'	DIESEL	OLIO DI GIRASOLE	ESTERE METILICO DI GIRASOLE	OLIO DI SEMI DI LINO	ESTERE METILICO DI LINO	OLIO DI COLZA	ESTERE METILICO DI COLZA
Densità specifica [g/cc]	0,835	0,924	0,88	0,932	0,896	0,916	0,88
Numero di cetano	> 45	33	45 - 51			44-51	52 - 56
Viscosità [cSt] a	20 °C	5,1	65,8	50,5	8,4	77,8	7,5
	50 °C	2,6	34,9	4,22		25,7	3,8
Zolfo [%]	0,29	0,01	0,01	0,35	0,24	0,0001	0,002

1.2 Come si ottiene il biodiesel?

Gli oli vegetali, se adoperati direttamente nei motori diesel, a lungo termine, producono seri danni quali sporco degli iniettori, depositi carboniosi, gelificazione degli oli lubrificanti che sono riconducibili all'alta viscosità (10-20 volte rispetto al diesel), alla bassa volatilità e alla presenza di idrocarburi insaturi (altamente reattivi). In particolare l'alta viscosità è un fattore che influenza molto le prestazioni perché nel motore diesel il primo stadio della combustione è il processo di atomizzazione del carburante. Per ovviare a tali problemi, e rendere gli oli vegetali carburanti adatti per i motori diesel, sono state sviluppate quattro diverse tecniche: miscelazione con diesel fossile, pirolisi, microemulsioni, transesterificazione (Demirbas, 2009; Leung et al., 2010; Zhang et al., 2010). Tra questi il metodo maggiormente utilizzato per convertire gli oli di origine animale o vegetale in biodiesel è la transesterificazione.

1.2.1 La miscelazione

La miscelazione con diesel fossile è una possibilità già molto praticata; tipicamente le miscele usate arrivano fino al 20% in volume di oli vegetali; è stato infatti constatato che, miscele fino al 20% possono essere utilizzate in motori diesel con problemi solo nel lungo periodo. Un vantaggio della miscelazione rispetto all'uso diretto di oli è quello di abbassare la temperatura di gelificazione. Tuttavia, la miscelazione non elimina i problemi legati all'uso diretto di oli vegetali, come l'alta viscosità, la bassa volatilità, i depositi carboniosi, e inoltre si possono verificare reazioni di polimerizzazione e ossidazione, ma li riduce proporzionalmente alla percentuale del petro-diesel.

1.2.2 La pirolisi

La pirolisi è un trattamento chimico che consiste nel convertire una sostanza in un'altra tramite cracking termico, causato dall'applicazione di energia termica in presenza d'azoto; il suo utilizzo sugli oli ed i grassi è stato investigato da più di cento anni, specialmente in quei Paesi carenti di giacimenti di petrolio (*Ma & Hanna, 1999*). Essa produce composti di diverse classi quali alcani, alcheni, alcadieni, aromatici e acidi carbossilici e la distribuzione delle composizioni dipende dal tipo di olio da cui si parte. Anche se si ottiene una viscosità più bassa e un più alto numero di cetano, comparato rispetto all'olio vegetale, i valori delle ceneri, del carbone residuo e la temperatura di scorrimento rendono il carburante ottenuto inaccettabile (*Fukuda et al., 2001*). Inoltre, essendo i prodotti ottenuti chimicamente simili alla benzina e al gasolio, la rimozione dell'ossigeno conseguente al trattamento termico elimina anche i benefici ambientali derivanti dall'uso di un carburante ossigenato (*Billaud et al., 1995*). Infine essa è anche molto costosa.

1.2.3 Le microemulsioni

Le microemulsioni sono utilizzate per risolvere il problema dell'alta viscosità dell'olio. Esse sono dispersioni, più o meno stabili, di microstrutture di fluidi (fase dispersa) con dimensioni che vanno da 1 a 150 nm, in un altro fluido non miscibile (fase disperdente). La fase disperdente è rappresentata da etanolo, butanolo o metanolo. Questo sistema consente di ridurre l'alta viscosità e i problemi relativi ai depositi di carbonio. Migliora la performance

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

ma non è sufficiente a risolvere efficacemente questi inconvenienti, in quanto tuttavia vi è la presenza di depositi carboniosi pesanti, irregolarità nell'iniettore, combustione incompleta ed un incremento nella viscosità dell'olio lubrificante.

1.2.4 La transesterificazione

La transesterificazione o alcolisi degli oli è la reazione tra i trigliceridi e un alcol per ottenere esteri alchilici e glicerolo, secondo la reazione complessiva mostrata in Figura 1.2.

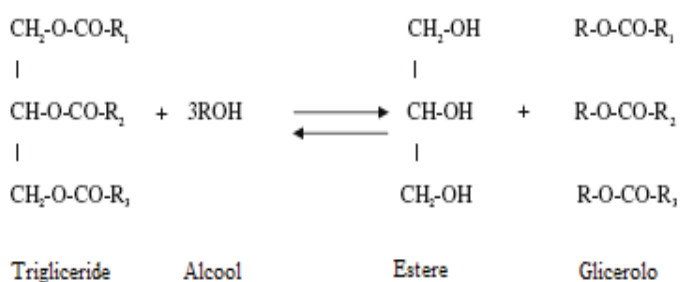


Fig. 1.2 - Reazione di transesterificazione di una molecola di trigliceride.

dove R₁, R₂, R₃ sono acidi grassi a catena lunga (generalmente acido palmitico, stearico, oleico, linoleico e linolenico). Questa reazione riduce la viscosità rispetto all'olio di partenza, poiché allontanando dalla miscela dei prodotti il glicerolo rimangono gli esteri lineari che hanno sicuramente delle viscosità inferiori rispetto ai trigliceridi. In tal modo, si migliora l'atomizzazione del combustibile e conseguentemente le sue caratteristiche di combustione. Andando nel dettaglio, la reazione di transesterificazione complessiva può essere rappresentata con uno schema di reazioni reversibili in serie-parallelo (Figura 1.3): il trigliceride è convertito dapprima in digliceride, poi in monogliceride e, infine, in glicerolo, con la liberazione di una mole di estere di acidi grassi in ogni step.

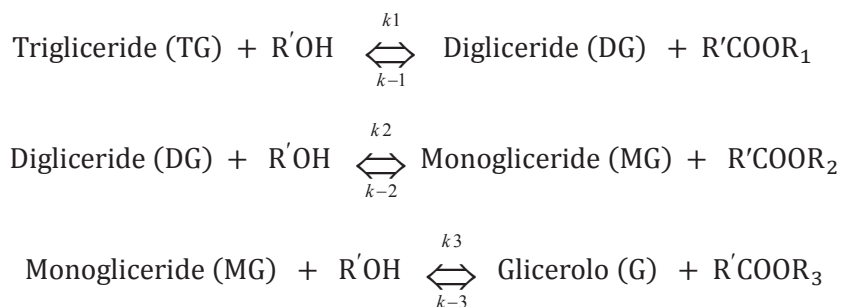


Fig. 1.3 - Reazioni in serie-parallelo che avvengono nel corso della transesterificazione.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

Poiché l'olio è composto da trigliceridi formati da acidi diversi, le composizioni degli esteri prodotti varieranno in base agli oli di partenza e naturalmente queste miscele avranno diverse caratteristiche meccaniche e chimiche e quindi saranno più o meno favoriti come biodiesel (Tabella 1.6). Gli oli utilizzati variano a seconda della disponibilità di una specifica coltura rispetto ad un'altra; ad esempio in America si parte primariamente da olio di semi di soia, mentre in Europa da olio di semi di colza o di girasole.

Tab. 1.6 - Proprietà chimico-fisiche del biodiesel ottenuto da differenti fonti di olio e rispettive rese.

Feedstock	Kinematic viscosity (cst, at 40 °C)	Density (g/cm ³)	Saponification number	Iodine value	Acid value (mg KOH/g)	Cetane number	Heating value (MJ/kg)	Production conditions ¹			Yield (%)	
								T (°C)	P (min)	M C (wt.%)		
Soybean	4.08	0.885	201	138.7	0.15	52	40	65	90	1:12	CaO 8 (2.03% H ₂ O in methanol)	>95
Rapeseed	4.3–5.83	0.88–0.888	–	–	0.25–0.45	49–50	45	65	120	1:6	KOH 1	95–96
Sunflower	4.9	0.88	200	142.7	0.24	49	45.3	60	120	1:6	NaOH 1	97.1
Palm	4.42	0.86–0.9	207	60.07	0.08	62	34	Room	584	1:11	KF/ZnO 5.52	89.23
Peanut	4.42	0.883	200	67.45	–	54	40.1	60	120	1:6	NaOH 0.5	89
Corn	3.39	0.88–0.89	202	120.3	–	58–59	45	80	60	1:9	KOH 2	85–96
Camelina	6.12–7 ^a	0.882–0.888	–	152–157	0.08–0.52	–	–	Room	60	1:6	KOH 1.5	97.9
Canola	3.53	0.88–0.9	182	103.8	–	56	45	60	60	1:9	KOH 1	80–95
Cotton	4.07	0.875	204	104.7	0.16	54	45	65	90	1:6	NaOH 0.75	96.9
Pumpkin	4.41	0.8837	202	115	0.48	–	38	65	60	1:6	NaOH 1	97.5
Jatropha curcas	4.78	0.8636	202	108.4	0.496	61–63	40–42	60	120	1:06	NaOH 1	98
Pongamina pinnata	4.8	0.883	–	–	0.62	60–61	42	65	180	1:6	KOH 1	97–98
Sea mango	–	–	–	–	–	–	–	180	180	1:8	Sulfated zirconiz alumina 6	83.8
Palanga	3.99	0.869	–	–	–	–	41	66	4	1:12 ^b	C ₆ H ₅ CH ₃ + H ₃ PO ₄ 5 + 5, H ₂ SO ₄ 6.5; KOH 9 (three step)	85
Tallow	–	0.856	244.5	126	0.65	59	–	60	1440	1:30	H ₂ SO ₄ 2.5	98.28
Nile tilapia	–	–	–	88.1	1.4	51	–	30	90	1:9	KOH 2 (ultrasound)	98.2
Poultry	–	0.867	251.23	130	0.25	61	–	50	1440	1:30	H ₂ SO ₄ 1.25	99.72
Used cooking oil	4	–	–	–	0.15	–	–	60	20	1:7	NaOH 1.1	94.6

¹ T = reaction temperature (°C); P = transesterification reaction period (min); M = molecular ratio of oil/methanol; C = amount of catalyst (wt.%).

^a Kinematic viscosity at 20 °C.

^b Volumetric ratio of oil/methanol.

Solitamente gli alcoli utilizzati sono metanolo, etanolo, propanolo e butanolo. Metanolo ed etanolo sono usati più frequentemente e in particolare il metanolo a causa del suo basso costo e i vantaggi chimici e fisici dovuti alla polarità e alla catena più corta. A causa della reversibilità della reazione, si predilige spingere l'equilibrio verso i prodotti operando in netto eccesso di alcol o si può separare la glicerina mentre si forma (Calabrò et al., 2009; De Paola et al., 2009; Ricca et al., 2009). Inoltre, per aumentare la velocità di reazione è presente un catalizzatore che può essere basico, acido o enzimatico.

1.3 Catalisi della reazione di transesterificazione

1.3.1 Catalisi basica

La reazione catalizzata da basi (NaOH, KOH e alcossidi) procede circa 4000 volte più velocemente di quella catalizzata da acidi, a parità di quantità di catalizzatore utilizzato, per cui si presta maggiormente per applicazioni industriali ed è il metodo con cui attualmente si produce biodiesel. Il rapporto molare olio/alcol può variare da 1:1 a 1:6, mentre il range di temperatura comprende valori tra 25 e 120°C. Questo tipo di catalisi risulta essere più efficiente e meno corrosiva rispetto a quella acida, ma allo stesso tempo presenta dei limiti tecnologici legati alla “sensibilità” del processo nei confronti della purezza dei reagenti e alla presenza di acqua nell’olio di partenza. Infatti, in presenza di acqua, una parte del reagente (in particolare degli acidi grassi liberi FFA), può essere consumata per l’ottenimento di saponi invece che dei prodotti desiderati, portando così alla formazione di un’emulsione che a valle del processo rende più difficile e costoso il recupero e la purificazione del composto obiettivo (*Shimada et al., 2002; Marchetti et al., 2007*). Inoltre, l’acqua, proveniente dagli oli o dai grassi oppure formata durante la reazione di saponificazione, ritarda la reazione di transesterificazione attraverso la reazione di idrolisi dei trigliceridi per produrre digliceridi e FFA, secondo la reazione mostrata in Figura 1.4.



Fig. 1.4 - Reazione indesiderata di idrolisi di un trigliceride durante la transesterificazione basica.

1.3.2 Catalisi acida

Gli acidi grassi liberi possono reagire con l’alcol per formare gli esteri (biodiesel) attraverso la reazione di esterificazione acido-catalizzata. Questa reazione (Figura 1.5) è molto utile per maneggiare oli o grassi con alto contenuto di acidi grassi liberi (*Marchetti et al., 2007*) secondo il meccanismo di reazione mostrato in Figura 1.6.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

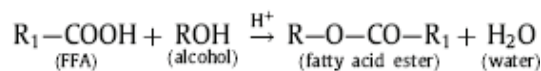


Fig. 1.5 - Reazione di transesterificazione con catalisi acida.

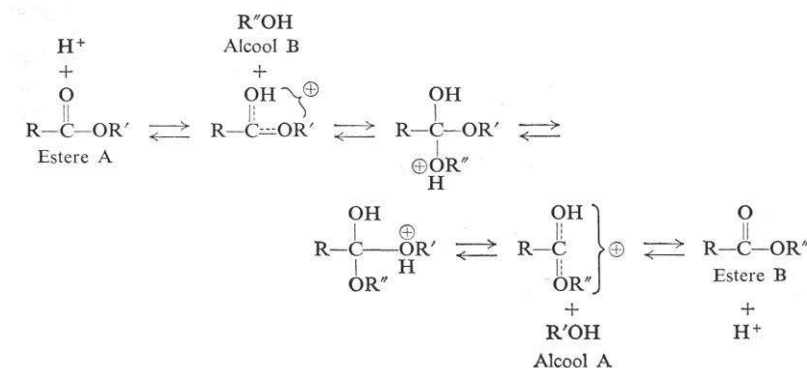


Fig. 1.6 - Meccanismo di reazione della transesterificazione catalizzata da acidi.

A causa della bassa velocità di reazione e dell'alto rapporto molare alcol:olio richiesto pari a 30:1, l'esterificazione acido-catalizzata non ha guadagnato la stessa attenzione del processo basico. Infatti, la reazione acido-catalizzata richiede un tempo e una temperatura di reazione superiore (55-80°C) rispetto alla reazione base-catalizzata, anche se risulta molto più efficace quando la quantità di acidi grassi liberi nell'olio supera l'1%. Studi effettuati su un'analisi di tipo economico hanno dimostrato che la catalisi acida, essendo costituita da un unico passaggio, è più economica rispetto al processo basico, che richiede un ulteriore step per convertire gli acidi grassi liberi in esteri alchilici, evitando così la reazione di saponificazione. In uno studio condotto sulla transesterificazione acido-catalizzata dell'olio di semi di soia, Canakci et al. (1999) hanno trovato che la resa in esteri aumenta all'aumentare del rapporto molare metanolo/olio adoperato e con la quantità di catalizzatore. Inoltre, la reazione di transesterificazione è inibita dalla presenza di acqua nella fase oleosa, per cui è necessario operare con elevati rapporti molarli metanolo:olio per portare a completamento la reazione. Studi dettagliati sulla cinetica di reazione della transesterificazione catalizzata da acidi di oli di frittura non sono stati ancora effettuati. I risultati di tali studi sono necessari per quantificare gli effetti di alcuni fattori importanti che influenzano la resa e la purezza del biodiesel, e per ottenere opportuni modelli cinetici finalizzati a una migliore comprensione del meccanismo di transesterificazione. Gli acidi più utilizzati per la transesterificazione sono l'acido solforico, l'acido fosforico, l'acido cloridrico e gli acidi solfonici organici.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

1.3.2 Catalisi enzimatica

Nella catalisi enzimatica le lipasi, sia extracellulari che intracellulari, catalizzano le reazioni di idrolisi del glicerolo, di alcolisi e di acidolisi, ma anche di transesterificazione ed esterificazione (Marchetti *et al.*, 2007). Nei vari processi in cui tali enzimi sono utilizzati si rispettano i parametri attesi di biocompatibilità, biodegradabilità e impatto ambientale. I più importanti vantaggi presentati dalla transesterificazione enzimatica rispetto alla catalisi acida o basica possono essere così schematizzati (De Paola *et al.*, 2009):

- ✓ possibilità di raggiungere apprezzabili conversioni a basse temperature;
- ✓ piccole quantità di acqua nell'ambiente di reazione sono ammissibili e in alcuni casi necessarie;
- ✓ la resa in esteri è piuttosto alta;
- ✓ non è necessario purificare gli esteri prodotti
- ✓ l'immobilizzazione delle lipasi, la loro rigenerazione e il loro riutilizzo garantiscono una migliore stabilità termica e meccanica.

Tuttavia, l'elevato costo dell'enzima rispetto ai catalizzatori acidi o alcalini costituisce ancora il principale svantaggio del processo di transesterificazione enzimatica. La catalisi enzimatica sarà comunque affrontata in modo approfondito e dettagliato nel successivo Capitolo 2.

Si possono sommariamente confrontare le diverse tecnologie per la produzione di biodiesel nella seguente Tabella 1.7 (Marchetti *et al.*, 2007):

Tabella 1.7 - Confronto tra diverse tecnologie di produzione del biodiesel.

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

1.4 Il biodiesel dagli oli di frittura esausti

La produzione di biodiesel è ancora oggi frenata dall'alto costo, che rende questo biocombustibile non competitivo con il petro-diesel. Tale costo di produzione può essere visto come 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) ed, infine, tasse (locali e nazionali) (*Haas et al., 2006*). Fra le voci appena elencate, il costo che incide maggiormente sul prezzo del biodiesel nel mercato globale risulta essere quello delle materie prime, stimato pari a circa il 70% del costo totale di produzione (*Lam et al., 2009*), come mostrato nella Figura 1.7.

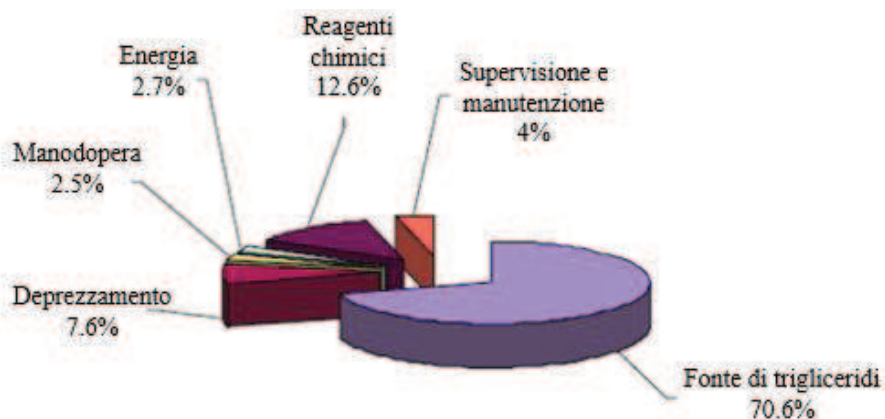


Fig. 1.7 - Distribuzione percentuale dei costi di produzione del biodiesel (*Kemp, 2006*).

A ciò si aggiunge la competitività degli oli vegetali usati per ottenere biocombustibili con quelli destinati al settore alimentare. Il conflitto etico, oltre che economico, *food vs fuel* ha spostato l'attenzione verso la ricerca di una fonte di "seconda generazione" che non interferisca con il settore alimentare e che sia nello stesso tempo rinnovabile e a basso costo. In particolare, per quanto riguarda la produzione di biodiesel, sono stati individuati gli oli da cucina esausti come potenziale materia prima, perché non solo non sono destinati a un uso alimentare, ma richiedono anche particolari accorgimenti in fase di smaltimento. Infatti, l'olio fritto è una delle fonti di inquinamento più pericolose per il pianeta (*Kulkarni & Dalai, 2006*), ma sono purtroppo ancora moltissimi coloro che senza pensarci troppo, dopo aver fritto e cucinato, gettano nel lavandino o nello scarico del water l'olio utilizzato, senza pensare abbastanza a quanto la facile superficialità di questo gesto arrechi danno ai mari, oggi nel

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

costante pericolo di un ecosistema dagli equilibri precari. Nel caso di impianti fognari inadeguati, lo smaltimento dei residui oleosi influenza negativamente l'adeguata attività dei depuratori con conseguenze in termini di ecologia e costi supplementari. Inoltre, l'olio fritto se disperso nel sottosuolo crea una sottile pellicola attorno alle formazioni terrose creando un'innaturale separazione tra piante, terra ed elementi nutritivi e impedendo l'ossigenazione delle piante e lo sviluppo della flora. Infine, i residui di olio fritto possono danneggiare anche le falde freatiche e raggiungere pozzi d'acqua anche a una considerevole distanza: sarebbe sufficiente un litro di olio mescolato ad un milione di litri d'acqua per alterarne il gusto con grave rischio per la salute. È evidente che un corretto recupero dell'olio esausto non solo evita i problemi sopra citati, ma diventa anche una preziosa materia prima eco-sostenibile per la produzione di biodiesel, essendo costituito per la maggior parte da trigliceridi.

Studi recenti hanno dimostrato come i costi di produzione diminuiscono più della metà quando si utilizzano gli oli esausti piuttosto che gli oli raffinati (*Escobar et al., 2009*).

Poiché le proprietà del diesel sono strettamente correlate alle proprietà fisico-chimiche della materia prima da cui è stato prodotto, di notevole importanza diventano le modifiche subite dall'olio durante la frittura. Durante questa preparazione, infatti, l'olio viene riscaldato, in condizioni atmosferiche, a temperature prossime ai 160-190°C (*Gazmuri & Bouchon, 2009*) anche per tempi relativamente lunghi e per usi ripetuti. Dal punto di vista fisico, l'olio durante la frittura subisce un aumento della viscosità, un aumento del calore specifico, una variazione della tensione superficiale e un cambiamento del colore (*Cvengroš & Cvengrošová, 2004*). Tuttavia, i cambiamenti più importanti sono quelli chimici, dovuti, essenzialmente, a tre reazioni che hanno luogo durante la frittura: ossidazioni, idrolisi e termolisi (*Mittelbach & Enzelsberger, 1999*).

Le reazioni di ossidazione avvengono in quanto l'ossigeno dell'aria, 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 nella Figura 1.8 (*Kulkarni & Dalai, 2006*). La maggior parte dei composti 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*).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
 Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

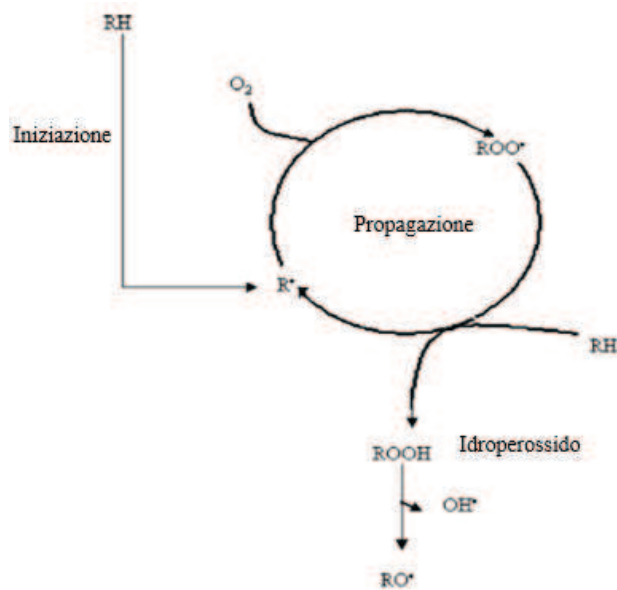


Figura 1.8 - Meccanismo ossidazione radicalico degli acidi grassi.

La reazione di idrolisi è schematizzata in Figura 1.9. Nonostante parte dell'acqua formatasi evapora, una determinata quantità si dissolve nell'olio, riuscendo ad idrolizzare i trigliceridi, con conseguente formazione di acidi grassi liberi, glicerolo, monogliceridi e digliceridi (Kulkarni & Dalai, 2006).

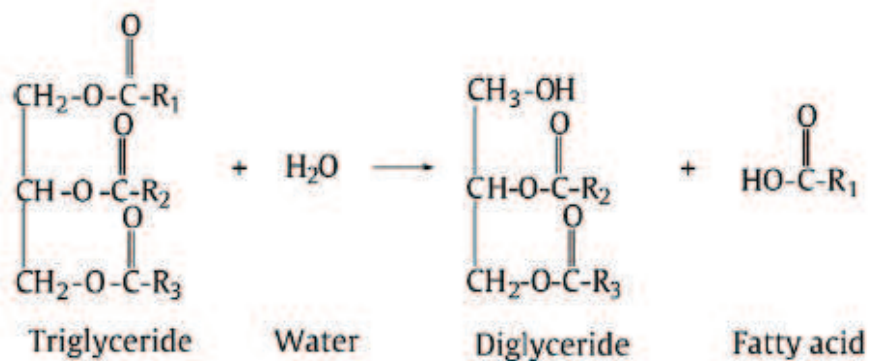


Figura1.9 - Idrolisi dei trigliceridi (Lam et al., 2010).

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, in una serie di composti: gli acidi grassi saturi danno origine ad alcani, alcheni, chetoni, monossido di carbonio, anidride carbonica ed altri composti, mentre quelli insaturi formano principalmente

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

dimeri, sia saturi che deidrogenati, e idrocarburi policiclici. Gli acidi grassi insaturi, inoltre, possono reagire tra di loro formando dimeri e trimeri secondo la reazione denominata Diels-Alder.

Il quantitativo e la tipologia dei composti indesiderati formati durante la frittura influenzano sia la reazione di trans-esterificazione sia le proprietà del biodiesel. Gli effetti che questi composti hanno sulla qualità del biodiesel sono stati studiati da Mittelbach ed Enzelsberger (1999) mediante transesterificazione con metanolo e idrossido di potassio come catalizzatore dell'olio di colza esausto, dopo riscaldandolo a 180°C per circa 20 ore. Essi riscontrarono che le differenze, rispetto all'olio "fresco", riportate nella Tabella 1.8 (Leung & Guo, 2006).

Tabella 1.8 - Proprietà fisiche e chimiche dell'olio di colza fresco ed esausto (Leung & Guo, 2006).

PROPRIETÀ	OLIO DI COLZA ESAUSTO	OLIO DI COLZA FRESCO
Acidità (mg KOH/g)	2.1	<0.5
Viscosità cinematica a 40 °C (cSt)	35.3	30.2
Composizione acidi grassi (wt%)		
Miristico(C14:0)	0.9	0.1
Palmitico(C16:0)	20.4	5.5
Palmitoleico (C16:1)	4.6	1.1
Stearico (C18:0)	4.8	2.2
Oleico (C18:1)	52.9	55
Linoleico(C18:2)	13.5	24
Linolenico (C18:3)	0.8	8.8
Arachico (C20:0)	0.12	0.7
Gadoleico (C20:1)	0.84	1.4
Beenico (C22:0)	0.03	0.5
Erucico (C22:1)	0.07	0.4
Lignocerico (C24:0)	0.04	0.3
Peso Molecolare Medio (g/mol)	856	882

Anche gli esteri ottenuti dalla reazione di transesterificazione dell'olio esausto, incidono sulle caratteristiche del biocombustibile, aumentandone la viscosità e modificandone le caratteristiche di combustione, traducendosi in un alto valore di CCR (*Conradson Carbone Residue*). Alti valori di CCR corrispondono ad un aumento del contenuto dei gliceridi, degli acidi grassi liberi ed altre impurità (Mittlebach, 1996). Per gli standard ASTM tale parametro deve assumere un valore minore dello 0.05%. Nel caso del biodiesel da oli esausti tale limite è superato, poiché si è passato da un valore dello 0.02%, relativo all'olio fresco, ad uno dello

0.17%, relativo all'olio esausto. Nonostante ciò non è stato riscontrato alcun effetto negativo sulle performance, nel lungo periodo, durante i test utilizzando una miscela al 100% biodiesel da olio esausto come carburante per bus cittadini (*Mittelbach & Enzelsberger, 1999*).

Se si volesse, invece, rimuovere determinati composti indesiderati, per migliorare le prestazioni e le proprietà del biodiesel, bisognerebbe ricorrere all'utilizzo di pretrattamenti precedenti la reazione, il che implicherebbe l'unico costo aggiuntivo, insieme al trasporto, per la produzione di biodiesel da tale biomassa. Tali pretrattamenti possono essere sia fisici che chimici. I primi consistono, principalmente, nella filtrazione dell'olio per separare tutte le impurità solide, e nel ripetuto lavaggio con vapore o acqua, per allontanare quei sali solubili, mentre i trattamenti chimici consistono in esterificazioni in ambiente acido e distillazioni, anche sotto vuoto, per la riduzione del contenuto di acidi grassi liberi. Essendo, però, il pretrattamento precedente la transesterificazione, la scelta è strettamente legata alle condizioni impiegate nella reazione, nello specifico al tipo di catalisi. Per meglio capire quanto appena detto si passa alla trattazione del processo di trans-esterificazione.

1.5 Il biodiesel dalle microalghe

Le microalghe possono essere una valida fonte di lipidi per la reazione di transesterificazione. Il biodiesel derivato da colture oleaginose è una fonte rinnovabile a impatto zero di carbonio e rappresenta una potenziale alternativa ai combustibili derivanti dal petrolio. Purtroppo, il biodiesel prodotto dalle colture oleaginose, da oli esausti da cucina e da grassi animali è in grado di soddisfare solo una piccola frazione della domanda esistente per i carburanti da trasporto. Le microalghe invece, sembrano essere una fonte in grado di soddisfare la domanda globale di carburanti per il trasporto (*Chisti, 2007*), essendo caratterizzate da una resa fotosintetica superiore rispetto a quella delle piante terrestri. Le microalghe hanno un potenziale di produzione fino a 40000 l/ha di biodiesel (*Weyer et al., 2010*) rispetto ai 455 l/ha dei semi di soia o ai 5685 l/ha di palme da olio (*Murthy, 2011*). A livello produttivo, l'obiettivo principale è quello di coltivare un ceppo microalgale con contenuti lipidici elevati. Tuttavia, tali ceppi risultano essere più sensibili alla contaminazione (*Sheehan et al., 1998; Schenk et al., 2008*) e presentano una crescita più lenta rispetto ai ceppi con contenuto lipidico basso (*Sheehan et al., 1998; Pienkos e Darzins, 2009*).

I diversi step previsti nella produzione di biodiesel sono mostrati nello schema a blocchi in Figura 1.10 (Demirbas, 2011).

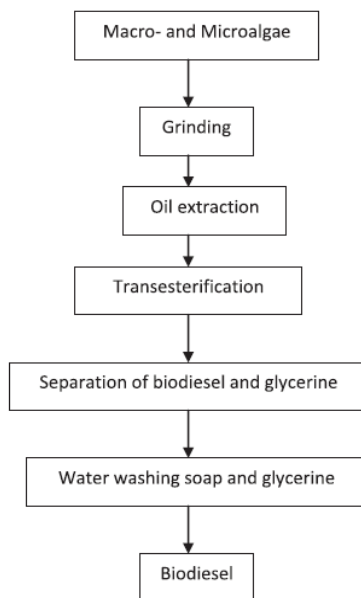


Fig. 1.10 - Schema a blocchi della produzione di biodiesel dalle alghe (Demirbas, 2011).

Generalmente si procede, quindi, con l'estrazione dei lipidi e successiva transesterificazione, ma molti studi sono stati condotti per fare avvenire queste due operazioni in un unico step con una transesterificazione *in situ* (Parte IA, Cap. 2, par. 2.3.3).

Hossain et al. (2008) hanno transesterificato con metanolo mediante catalisi basica i lipidi estratti con esano/etere 1:1 da *Oedogonium* e *Spirogyra* sp., mentre Vijayaraghavan e Hemanathan (2009) hanno condotto la transesterificazione basica con etanolo dei lipidi estratti con esano da *Chlorella protothecoides*. La catalisi acida è stata, invece, adottata da Miao e Wu (2006), da Xu et al. (2006) e da Cheng et al. (2009) per transesterificare i lipidi estratti con esano dalla *Chlorella protothecoides* cresciuta in condizioni eterotrofe. Infine, Tran et al. (2012) hanno sottoposto a transesterificazione enzimatica con lipasi i lipidi estratti da *Chlorella vulgaris*.

1.5.1 Vantaggi e svantaggi del biodiesel ottenuto da microalghe

Di seguito sono riportati sinteticamente i vantaggi e gli svantaggi del biodiesel ottenuto da microalghe (Demirbas, 2011; Demirbas & Demirbas, 2011).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

Vantaggi:

- ✓ versatilità, dovuta alla possibilità di svariate condizioni operative, alla varietà delle specie e delle loro caratteristiche e alla complessa distribuzione dei prodotti estraibili dalla biomassa;
- ✓ elevate velocità di crescita e attività fotosintetica;
- ✓ adattabilità ai fattori ambientali che determina la possibilità di crescita praticamente dappertutto e, quindi, utilizzo di terreni altrimenti non produttivi e non coltivabili;
- ✓ possibilità di manipolare le condizioni di coltura e modificare i prodotti algali a seconda delle specifiche esigenze;
- ✓ alta produttività per unità di area coltivata;
- ✓ rese maggiori e produttività in olio a costo minore;
- ✓ nessun bisogno di ricorrere a coltivazioni, ad esempio di palme, per produrre olio e quindi non competitività con il *food-market*;
- ✓ assenza di zolfo;
- ✓ non tossicità ed elevata biodegradabilità;
- ✓ utilizzo di un'ampia qualità di acque, da quelle dolci a quelle salate, ai reflui urbani e zootecnici;
- ✓ compatibilità con l'esistente infrastruttura dei combustibili destinati al trasporto; infatti, il biofuel ottenibile dalla trasformazione dei lipidi estratti dalle microalghe presenta proprietà del tutto analoghe al tradizionale diesel di origine fossile, il che lo rende facilmente miscelabile e/o sostituibile in tutte le fasi di processo ed impiego finora consolidate (*Haik et al., 2011*);
- ✓ produzione combinata di energia e prodotti ad alto valore aggiunto;
- ✓ integrabilità di aree di coltivazione industriale di microalghe con impianti pre-esistenti, con benefici per entrambi i processi e la riduzione di costi e impatto ambientale, grazie alla caratteristica delle alghe di trasformare quelli che tradizionalmente sono scarti e costi degli impianti industriali in nutrienti per la crescita della biomassa; l'integrazione può avvenire con impianti di produzione di energia elettrica che emetterebbero anidride carbonica in atmosfera, con impianti di trattamento delle acque e con impianti di allevamento intensivo (*Pittman et al., 2011*);

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

- ✓ riduzione del livello di anidride carbonica in atmosfera.

Svantaggi:

- ✓ complessità e variabilità dei processi e tecniche applicabili;
- ✓ grande dispersione di dati in letteratura scientifica e diluizione degli sforzi dei gruppi di ricerca nella direzione di molteplici idee di impiego; altrettanto incerte, data l'assenza di test almeno a livello pilota (salvo alcuni rari casi, tuttavia intrappolati nell'inevitabile riservatezza che distingue la ricerca di imprese private) sono le soluzioni di processo che presentano elevata variabilità;
- ✓ instabilità dovuta all'elevato tenore di polinsaturi;
- ✓ costi elevati per una tecnologia relativamente nuova;
- ✓ gli oli prodotti dalle microalghe differiscono dalla maggior parte degli oli vegetali, essendo molto ricchi di acidi grassi polinsaturi con quattro o più doppi legami, come l'acido ecosapentaenoico e docosaesaenoico; questi acidi grassi sono più facilmente ossidabili durante l'immagazzinamento e poco adatti a essere usati per il biodiesel.

1.5.2 Accettabilità del biodiesel dalle microalghe

Per essere utilizzato come combustibile per mezzi di trasporto, il biodiesel da microalghe deve rispettare alcuni criteri di accettabilità stabiliti dagli standards esistenti: l'ASTM Biodiesel Standard D 6751 negli Stati Uniti, lo Standard EN 14214 per i mezzi di trasporto e lo Standard EN 14213 per l'uso come olio riscaldante nell'Unione Europea. Gli oli microalgali differiscono dalla maggior parte degli oli vegetali in quanto sono ricchi di acidi grassi polinsaturi con quattro o più doppi legami (ad esempio l'acido eicosapentanoico EPA e l'acido docoesanoico DHA). Gli acidi grassi e i metil esteri degli acidi grassi (FAME) con più di 3 doppi legami sono sensibili all'ossidazione durante lo stoccaggio e questo riduce la loro accettabilità nella produzione di biodiesel. In particolare, l'insaturazione totale di un olio è indicato dal suo valore di iodio, che per lo Standard EN 14212 e EN 14213 non deve superare rispettivamente 120 e 130 g iodio/100 g biodiesel (*Singh et al., 2011*). Inoltre per entrambi gli standards europei il contenuto di FAME non deve superare l'1% mol. L'entità dell'insaturazione degli oli da microalghe e il contenuto di acidi grassi con più di 4 doppi

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

legami possono essere ridotti facilmente mediante una parziale idrogenazione catalitica dell'olio, usata anche comunemente per ottenere la margarina dagli oli vegetali (*Chisti, 2007*).

In Tabella 1.9 (*Satyanarayana et al., 2011*) è riportato un confronto tra le proprietà del biodiesel ottenuto dalle microalghe, di quello ottenuto da colture oleaginose “tradizionali” e di quello standardizzato dalle norme ASTM.

Tab. 1.9. Confronto tra le proprietà del biodiesel ottenuto dalle microalghe, dalle colture oleaginose “tradizionali” e secondo gli standard ASTM (adattata da *Satyanarayana et al., 2011*).

Proprietà	Biodiesel da microalghe	Biodiesel da altre matrici	Biodiesel ASTM
Densità (kg/L)	0.864	0.838	0.86-0.9
Viscosità (mm ² /s)	5.2	1.9-4.1	3.5-5.0
Flash point (°C)	115	75	Min 100
Punto di solidificazione (°C)	-12	-50 100	/
Valore acido (mg KOH/g)	0.374	max 0.5	max 0.5
Heating value (MJ/kg)	41	40-45	-
Rapporto H/C	1.81	1.81	-

1.5.3 Analisi economica del biodiesel ottenuto dalle microalghe

Affinché il biodiesel sostituisca effettivamente il combustibile fossile, esso deve non solo presentare benefici ambientali ma anche essere competitivo dal punto di vista economico ed essere prodotto in quantità tali da soddisfare la reale richiesta del mercato (*Meng et al., 2009*).

Il costo globale della produzione di biodiesel deve tener conto di:

- costi della crescita della biomassa, del recupero delle microalghe, dell'estrazione dei lipidi e della loro transesterificazione;
- costi di ingegneria, per le licenze, di costruzione delle infrastrutture, di acquisto delle attrezzature, di installazione e di integrazione;
- costi operativi e di manutenzione;
- spese per i nutrienti, l'erogazione di CO₂, il rifornimento di acqua (che man mano evapora) e dei componenti consumati durante la crescita, le utilities energetiche;
- costo della manodopera e affitto del terreno (*Amaro et al., 2011*).

Considerando i dati riportati e assumendo che l'anidride carbonica sia disponibile a costo nullo, il costo stimato per la produzione di 1 kg di biomassa microalga è 2.95 \$ per il

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

fotobioreattore e 3.80 \$ per la vasca “raceway”. Aumentando la capacità di produzione annuale di biomassa a 10000 t, il costo di produzione per kilogrammo si ridurrebbe rispettivamente a 0.47 \$ e 0.60 \$ a causa dell'economia di scala. Assumendo che la biomassa contenga il 30% di olio in peso, il costo della biomassa per ottenere un litro di olio sarebbe pari a circa 1.40 \$ e 1.81 \$ rispettivamente. L'olio finale estratto dalla biomassa avrebbe un costo di circa 2.80 \$/L, molto maggiore del più economico tra gli oli vegetali (olio di palma grezzo, 0.52 \$/L nel 2006) e del petrodiesel (tra 0.66 \$/L e 0.79 \$/L, comprese le tasse, il costo del petrolio greggio, le spese di raffineria, la distribuzione e il marketing) (Satyanarayana *et al.*, 2011). Secondo altri autori, il costo del biodiesel è stimato pari a 9-25 \$/gallone (equivalente a 2.4-6.6 \$/L) se le microalghe sono coltivate nelle vasche aperte e pari a 15-40 \$/gallone (equivalente a 4-10.6 \$/L) se le microalghe sono coltivate nei fotobioreattori chiusi (Amaro *et al.*, 2011), o ancora pari a 1.94-3.35 €/L (Delrue *et al.*, 2012). Affinché l'olio da microalghe sia competitivo con il petrodiesel, il suo costo (in assenza di tasse sul biodiesel) deve essere di \$0.48/L in base ai dati disponibili per il 2006. In generale, vale la seguente relazione:

$$C_{algal\ oil} = 6.9 \cdot 10^{-3} C_{petroleum}$$

dove $C_{algal\ oil}$ è il prezzo dell'olio da microalghe in \$/L e $C_{petroleum}$ è il prezzo del petrolio in \$/barile (Chisti, 2007). La competitività della biomassa microalgale dal suo contenuto di olio e dal prezzo del petrolio, come mostrato in Figura 1.11.

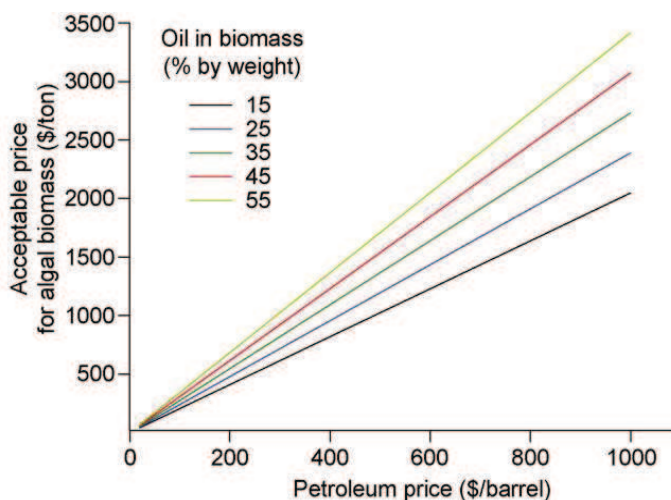


Fig. 1.11 - Competitività della biomassa microalgale (Chisti, 2008).

Negli ultimi anni sono state condotte anche diverse LCA (*Life Cycle Assessment*) (Lardon et al., 2009; Sander & Murthy, 2010; Scott et al., 2010; Stephenson et al., 2010; Brentner et al., 2011; Campbell et al., 2011; Shirvani et al., 2011; Singh & Olsen, 2011; Ajayebi et al., 2013; Passell et al., 2013; Adesanya et al., 2014; Collet et al., 2014; Ponnusamy et al., 2014) e analisi tecnico-economiche (Kovacevic & Wesseler, 2010; Amer et al., 2011; Davis et al., 2011; Harun et al., 2011; Gallagher, 2011) per valutare la sostenibilità della produzione di biodiesel da microalghe.

Il costo di produzione del biodiesel da microalghe può essere ridotto sostanzialmente attraverso tre possibilità:

1. ricorrendo a una strategia di produzione basata sul fatto che la singola specie algale si presenta come una sorta di *micro-bioraffineria* (Singh & Gu, 2010; Rawat et al., 2013), capace di una produzione estremamente differenziata se rapportata alla semplicità della sua struttura. Infatti, la biomassa microalgale può essere usata per produrre non solo oli, ma anche proteine, carboidrati e altri nutrienti; la biomassa residua dopo l'estrazione degli oli può essere usata come mangime animale, per produrre metano mediante la digestione anaerobica e per generare l'energia elettrica necessaria all'impianto di produzione di biodiesel da microalghe (l'energia in eccesso verrebbe eventualmente venduta); tuttavia, anche se la produzione di metano dalla biomassa microalgale è tecnicamente fattibile, non può competere con quella da altri substrati organici a basso costo (Chisti, 2007); pertanto, è importante ideare soluzioni di processo capaci di estrarre e valorizzare ognuno dei prodotti estraibili dalla biomassa algale; un esempio di sistema "integrato" per la produzione del biodiesel è riportato in Figura 1.12 (Chisti, 2008).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

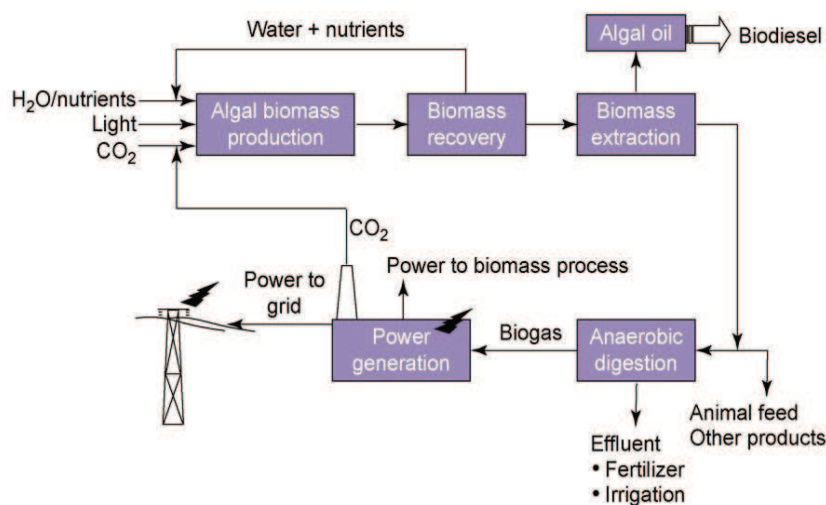


Fig. 1.12 - Diagramma schematico della biotecnologia basata sulle microalghe (Chisti, 2008).

2. sviluppando il potenziale delle microalghe attraverso l'ingegneria genetica e metabolica (Rosenberg *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2011), che permette di aumentare la stabilità, l'efficienza fotosintetica, la velocità di crescita della biomassa, il contenuto di olio nella biomassa e l'intervallo di temperatura accettabile in modo da ridurre i costi di raffreddamento, di eliminare il fenomeno della saturazione e della fotoinibizione in modo che la crescita della biomassa possa continuare anche in presenza di elevati livelli di luce, di ridurre la sensibilità alla foto-ossidazione che danneggia le cellule; sono state sviluppate tre principali tecnologie genetiche interdipendenti: clonazione di geni di enzimi cruciali, espressione transgenica di questi geni e modifica dei geni clonati al fine di costruire la proteina desiderata (Meng *et al.*, 2009);
3. migliorando l'ingegneria dei fotobioreattori. Ad esempio, ogni fotobioreattore presenta una zona interna più scura e una esterna più illuminata ed è necessaria la circolazione del fluido tra queste due zone, la cui frequenza dipende da fattori come l'intensità della turbolenza, la concentrazione delle cellule, le proprietà ottiche della coltura, il diametro del tubo e il livello di irraggiamento esterno. Si sa che tempi di circolazione del fluido tra le due zone di 10 ms migliorano le condizioni di crescita, ma il problema di stimare la frequenza di tale circolazione per i singoli sistemi non è stato ancora risolto. Poiché attraverso la turbolenza le alghe non sono sottoposte continuamente allo stesso livello di luce, si riducono i problemi di fotoinibizione, anche se la turbolenza genera degli effetti di shear che possono danneggiare le cellule. In teoria i miscelatori statici installati all'interno dei fotobioreattori

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 1 – Il biodiesel: stato dell'arte

tubolari possono favorire la miscelazione tra la zona buia e quella illuminata, ma i progetti esistenti non sono soddisfacenti perché riducono la penetrazione della luce nei tubi. Di conseguenza, sono necessari nuovi progetti dei miscelatori statici e nuovi metodi per ridurre i danni alle cellule associati alla turbolenza. Inoltre, alcune alghe crescono preferenzialmente sulla parete interna dei tubi, riducendo la penetrazione della luce e la produttività. Risulta necessario sviluppare dei metodi che controllino la crescita sulle pareti, ad esempio insufflando aria o facendo circolare *close fitting balls* per pulire la superficie interna del tubo, garantendo un flusso altamente turbolento, ricorrendo a sabbia in sospensione per l'abrasione della biomassa che aderisce alla parete o a enzimi che digeriscano la sostanza polimerica che fa aderire le cellule algali alle pareti del tubo (Chisti, 2007). È necessario anche rendere più economici i processi di separazione della biomassa algale dal brodo di coltura e di estrazione degli oli. Infine, bisogna sviluppare una metodologia per la previsione della produttività in funzione della latitudine geografica alla quale sono collocati i fotobiorattori e dell'intensità della luce solare (Chisti, 2008).

Capitolo 2

La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

2.1 L'enzima lipasi

La lipasi appartiene a una classe di enzimi che vanta numerose applicazioni negli ambiti, sempre più specializzati, delle biotecnologie e della biomedica. Uno studio approfondito e un'ampia ricerca bibliografica sull'enzima lipasi, le sue caratteristiche fisiche, le reazioni da esso catalizzate, le sue applicazioni e il suo meccanismo d'azione sono stati condotti nella mia Tesi di Laurea Specialistica (*Lopresto, 2011*), la cui parte sperimentale è stata svolta presso la Technical University of Denmark (supervisore: Pär Tufvesson, Post-Doc), mentre l'analisi dei dati e la modellazione sono state eseguite presso il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie (supervisore: Prof.ssa Vincenza Calabrò). Lo studio di questa reazione è stato ulteriormente approfondito durante il dottorato, soprattutto per quanto riguarda la reversibilità del sistema reagente e l'eventuale inibizione dei prodotti, e il lavoro completo è stato pubblicato sulla rivista *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (→**Appendice C**).

2.2 La transesterificazione di trigliceridi catalizzata da lipasi

La catalisi enzimatica della transesterificazione dei trigliceridi è oggetto di moltissimi studi per i notevoli vantaggi che offre rispetto alle catalisi tradizionali omogenee ed eterogenee. Fu descritta per la prima volta da Mittlebach (1991) e da allora diversi gruppi di ricerca, in tutto il mondo, hanno sperimentato questa biotecnologia per la produzione di biodiesel (*Fjerbaek et al., 2008; Gog et al., 2012*). Alcuni studiosi hanno effettuato accurati screening di diversi biocatalizzatori immobilizzati e non, al fine di verificare la fattibilità del processo di transesterificazione con varie fonti di trigliceridi e diversi tipi di alcoli. Da tutti gli studi è emerso che i fattori che incidono sull'efficienza del processo in esame sono principalmente il tipo di lipasi e la sua preparazione (pre-trattamenti ed eventuale immobilizzazione), il tipo di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

olio e le sue caratteristiche chimico-fisiche, l'alcol utilizzato, il rapporto molare alcol/trigliceridi, l'eventuale presenza di un solvente organico e la temperatura di reazione.

2.2.1 Tipo di lipasi

In letteratura sono presentati diversi tipi di lipasi impiegate per le reazioni di transesterificazione di differenti oli. La Tabella 2.1 consente di riassumere una serie di informazioni significative (Bajaj et al., 2010):

Tab. 2.1 - Confronto dell'attività di diversi tipi lipasi su vari substrati.

Olio	Alcol	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 antarctica</i>	98.4	-
Girasole	Metanolo	<i>Candida antarctica</i>	97	-
WCO	Metanolo	<i>B.subtilis</i>	90	-

Nelson et al. (1996) hanno studiato in primo luogo l'uso della lipasi *Mucor miehei* su olio di tallow in diverse prove che differiscono in base al tipo di alcol 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 del 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

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

conversione del 92% (Luo et al., 2006), in un altro caso con rapporto molare alcol:olio pari a 3:1, raggiungendo conversioni dell'83.8% (Yang et al., 2009), mentre con etanolo (rapporto molare alcol: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. (2000) 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 Bélafi-Bakó et al. (2002) 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 del 92.2%.

Sul WCO si è esaminata l'azione della lipasi *Bacillus subtilis* con metanolo alimentato a step, raggiungendo una conversione del 90% (Ying & 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. Si può dedurre che 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. Le condizioni di *optimum* si esprimono in termini di temperatura, durata del processo e velocità di agitazione per i diversi casi presentati in Tabella 2.1 e che tengono conto delle diverse combinazioni di lipasi, olio, alcol ed eventualmente solvente impiegati (Bajaj et al., 2010).

Il costo di produzione del biodiesel 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 (Bajaj et al., 2010). 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

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

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 biocatalizzatori 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., 2009).

2.2.2 Tipo di alcol

Per condurre la reazione di alcolisi dei trigliceridi (e in generale dei gliceridi) possono essere usati tutti i tipi di alcoli, anche se l'attenzione è stata focalizzata sugli alcoli primari a catena corta, primo fra tutti il metanolo in quanto è il più economico. Mittlebach (1999) ha utilizzato olio di semi di girasole con la lipasi *Pseudomonas fluorescens* e ha trovato che l'etanolo, anche in assenza di solvente, converte l'82% dei trigliceridi iniziale, mentre con il metanolo si ottengono conversioni apprezzabili solo in presenza di solvente (etere di petrolio). Nelson e al. (1996) ha osservato che a partire da olio di semi di soia o di colza con alcoli a catena corta in presenza di esano come solvente, la *Mucor miehei* è molto efficiente con gli alcoli primari, mentre la *Candida antarctica* lo è con gli alcoli secondari; in assenza dell'esano, invece, le rese si abbassano notevolmente. Anche Abigor et al. (2000), utilizzando olio di palma con la *Pseudomonas cepacia* senza alcun solvente, hanno verificato che l'etanolo fa raggiungere conversioni più elevate. Questi risultati sperimentali fanno desumere che l'alcolisi dei trigliceridi in generale sia più efficiente con l'etanolo che con il metanolo, indipendentemente dall'utilizzo o meno di un solvente. Shimada et al. (2000) hanno osservato che la lipasi *Candida antarctica* veniva drasticamente disattivata aggiungendo più della metà del metanolo stechiometrico. Le ragioni di ciò risiedono nella solubilità degli alcoli negli oli. In generale, le lipasi catalizzano efficientemente le reazioni quando i substrati si dissolvono completamente l'uno nell'altro. Si è studiata quindi la solubilità dei vari alcoli negli oli e si è trovato che gli alcoli con catene di atomi di carbonio superiori a tre sono completamente solubili almeno fino alla quantità stechiometrica della reazione di transesterificazione (moli alcol/ moli olio = 3), mentre il metanolo e l'etanolo sono solubili in quantità pari rispettivamente a 1/3 e 2/3 del

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

valore stechiometrico. Poiché le proteine sono generalmente instabili negli alcoli a catena corta, è stato ipotizzato che le basse conversioni raggiunte nella metanolisi siano dovute alla disattivazione della lipasi a causa del contatto con il metanolo non solubilizzato che è presente nella miscela sotto forma di gocce nell'olio. Tali considerazioni sono state ritenute valide anche nel caso dell'etanolisi. In Figura 2.1 è riportato l'andamento della conversione in funzione della quantità di metanolo presente e si può facilmente osservare il decadimento della conversione non appena si entra nella zona di non solubilità.

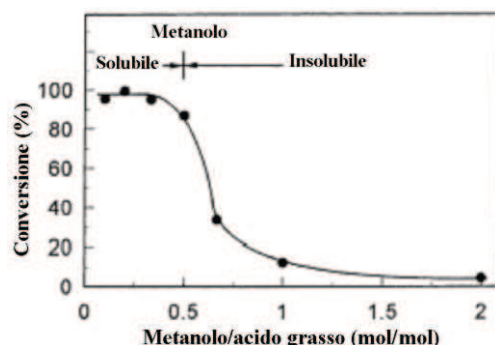


Fig. 2.1 - Dipendenza della conversione dalla solubilità dell'alcol.

Inoltre, poiché la diminuzione dell'attività della lipasi non è ripristinata anche nel caso di successive reazioni con quantità di metanolo (etanolo) inferiori al limite di solubilità, si evince che la lipasi viene irreversibilmente disattivata dal contatto con l'alcol non solubilizzato nell'olio (*Wu et al., 2004; Li et al., 2006; Bajaj et al., 2010*). Pertanto nella metanolisi (e per estensione anche nell'etanolisi) viene alimentato l'alcol in tre step successivi, in ognuno dei quali il rapporto molare alcol:olio è di 1:1 (*Nelson et al., 1996; Shimada et al., 2002*). In Figura 2.2 si osserva l'evoluzione della reazione nel tempo nel caso di due e tre iniezioni di metanolo:

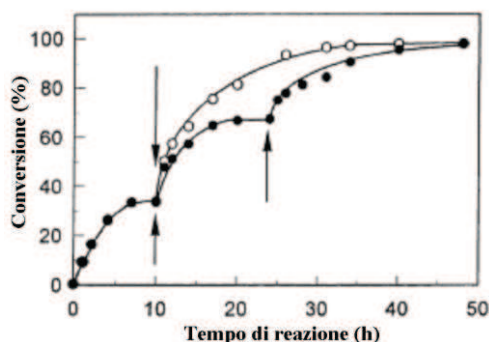


Fig. 2.2 - Conversioni raggiunte in sistemi alimentati a step di alcol.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

Kaieda et al. (2001) hanno studiato l'effetto dell'acqua e del metanolo sulla metanolisi di olio di semi di soia in assenza di solvente per diversi tipi di lipasi, trovando che la *Pseudomonas cepacia*, la *Candida rugosa* e la *Pseudomonas fluorescens* sono le più attive in presenza del 10% (in peso) d'acqua e che la *Pseudomonas cepacia* è anche altrettanto attiva in assenza d'acqua. Inoltre, piccole quantità d'acqua favoriscono la cinetica della reazione di transesterificazione prevenendo la disattivazione della lipasi, mentre quantità eccessive riducono progressivamente la velocità di reazione. Infine test a vari rapporti metanolo/olio hanno mostrato la sostanziale tolleranza della *P. cepacia* al metanolo, superiore a quella della *Rhizopus oryzae* e della *C. antarctica*, convertendo con buone rese anche in presenza di 2 o 3 equivalenti molar di metanolo/olio. In un lavoro precedente, Kaieda e al. (1999) avevano constatato che anche la lipasi da *Rhizopus oryzae* è inattiva in assenza d'acqua, mentre l'attività aumenta progressivamente all'aumentare del contenuto d'acqua fino a un valore limite in cui cambia tendenza. Avevano, inoltre, verificato che anche la *R. oryzae* segue un meccanismo di reazione secondo successive idrolisi ed esterificazioni, poiché, valutando la concentrazione acidi grassi liberi (FFA) durante il processo di transesterificazione, hanno notato che crescevano con velocità dello stesso ordine di grandezza dei metil esteri.

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, Zhang et al., 2006).

Xie e Ma (2010) 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.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

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

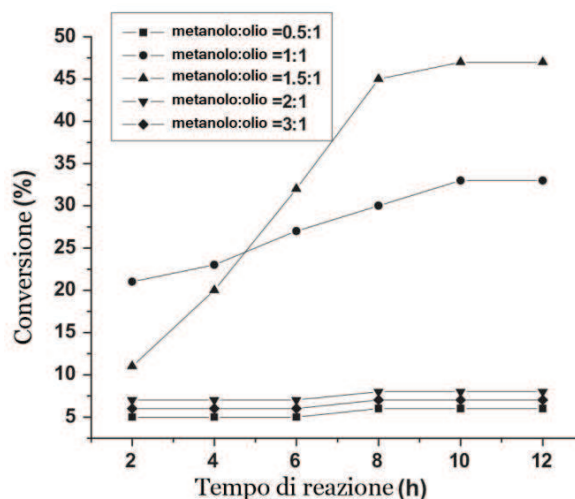


Fig. 2.3 - Effetto del rapporto metanolo:olio sulla transesterificazione di olio di soia con enzima immobilizzato (Xie & Ma, 2010)

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'alcol in tre step consecutivi, mantenendo un rapporto molare globale metanolo:olio pari a 3:1.

Si è anche valutata la possibilità di alimentare l'alcol in due step anziché in tre: Xu, Zhang et al. (2006) 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 step successivi, raggiungendo una conversione totale dell'85% dopo 36 ore di reazione.

2.2.3 Presenza di un 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., 2010). 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 sovente 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 (Li *et al.*, 2006). Di conseguenza si è optato per un solvente moderatamente polare come il *tert*-butanolo (Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010), nel quale sia il metanolo che il glicerolo sono solubili.

2.3 Linea di ricerca attiva presso il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie (Università della Calabria)

La transesterificazione enzimatica di oli vegetali è oggetto di una linea di ricerca attiva da circa un decennio presso il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie. In questo arco temporale sono state svolte numerose tesi sull'argomento, nelle quali sono stati approfonditi aspetti importantissimi che rappresentano la base del lavoro svolto anche durante il mio dottorato:

1. Marco Catalano, *Studio cinetico-sperimentale della transesterificazione enzimatica per la produzione di biodiesel* (A.A. 2004/2005): è stato effettuato uno screening di diverse lipasi sia libere che immobilizzate su un sistema reagente formato da trioleina al 60% (che simula un olio vegetale), etanolo ed esano come solvente ed è stato individuato il modello cinetico che descrive la reazione di transesterificazione enzimatica;
2. Adelaide Multari, *Transesterificazione enzimatica di olio di oliva finalizzata alla produzione di biodiesel* (A.A. 2003/2004): è stata studiata la reazione di transesterificazione di olio di sansa di oliva con etanolo catalizzata dalla lipasi immobilizzata commerciale Lipozyme® in esano come solvente ed è stata effettuata un'analisi multivariata;

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

3. Anita Soriano, *Analisi sperimentale del recupero e riuso della lipasi immobilizzata nella reazione di transesterificazione per la produzione di biodiesel* (A.A. 2005/2006): è stata valutata la possibilità di riutilizzare il biocatalizzatore (Lipozyme®) con e senza lavaggio in più cicli di reazione (transesterificazione di olio di sansa di olive ed etanolo in presenza di esano come solvente);
4. Salvatore Carmisciano, *Analisi sperimentale della reazione di transesterificazione enzimatica in assenza di solvente, per la produzione di biodiesel a partire da olio di sansa* (A.A. 2005/2006): è stata studiata la reazione di transesterificazione tra olio di sansa di olive ed etanolo catalizzata da Lipozyme® in assenza di solvente;
5. Adele Perziano, *Progettazione ad analisi teorico-sperimentale di un impianto per la produzione continua di biodiesel in un bireattore a letto fluido mediante transesterificazione con lipasi immobilizzata* (A.A. 2006/2007): si è passati dallo studio della reazione in un sistema discontinuo (batch) allo studio della reazione in un reattore a letto fluido continuo;
6. Pasquale Francesco Zito, *Analisi preliminare delle prestazioni di un reattore enzimatico a letto fluido per la produzione di biodiesel* (A.A. 2006/2007): è stata valutata la possibilità di riutilizzare il catalizzatore nel reattore a letto fluido continuo e sono state studiate le prestazioni al variare della portata di alimentazione al reattore;
7. Luca Mannis, *Studio sperimentale della disattivazione di lipasi nel processo di transesterificazione* (A.A. 2007/2008): è stato valutato l'effetto dell'olio e del glicerolo sull'attività del biocatalizzatore Lipozyme® nella transesterificazione tra olio di sansa ed etanolo in un reattore batch;
8. Francesco Ivan Caruso, *Studio sperimentale della disattivazione di lipasi nel processo di trans-esterificazione* (A.A. 2008/2009): è stato valutato l'effetto dell'etanolo sull'attività del biocatalizzatore Lipozyme® nella transesterificazione tra olio di sansa ed etanolo in un reattore batch;
9. Cecilia Nicoletti, *Transesterificazione enzimatica per la produzione di biosiesel da oli di frittura esausti* (A.A. 2011/2012): al variare delle condizioni operative è stata studiata la reazione di transesterificazione di olio di frittura commerciale "Friol" in assenza di solvente, catalizzata da due diversi tipi di lipasi (*Mucor miehei* nella forma immobilizzata commerciale Lipozyme® e *Pseudomonas cepacia* immobilizzata).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 2 – La reazione di transesterificazione enzimatica dei trigliceridi

Alla luce dello studio della letteratura scientifica e dei risultati ottenuti in questi lavori, è stata impostata una sperimentazione volta a studiare la produzione di biodiesel da oli vegetali prima e dopo la frittura mediante una reazione di transesterificazione enzimatica (successivo Capitolo 3).

Capitolo 3

Studio sperimentale della produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

Nell'ottica di un successivo utilizzo degli oli estratti dalle microalghe, è stata testata in laboratorio la transesterificazione di un olio vegetale che simulasse il comportamento degli oli microalgali. L'esigenza di ricorrere a un olio simulante è stata dettata dalla necessità di avere una grande quantità di olio a disposizione per poter condurre le prove, il cui obiettivo non è tanto la resa in biodiesel quanto la valutazione della stabilità e dell'attività di una lipasi immobilizzata. Infatti, al fine di rendere completamente *green* il processo si è pensato di catalizzare la transesterificazione non mediante i tradizionali metodi basici o acidi, ma enzimaticamente in un sistema effettivamente free-solvent costituito esclusivamente dall'olio e dall'etanolo necessario alla transesterificazione.

3.1 Scelta del sistema di reazione

3.1.1 L'olio

In letteratura sono diversi gli oli vegetali impiegati nella produzione enzimatica di biodiesel: mais, cotone, crambe (estratto dai semi dell'*Abyssinica crambe*, pianta nativa del Mediterraneo), arachidi, colza, soia, girasole per citare i più comuni (Marchetti *et al.*, 2007). Sono sempre più frequenti i riferimenti a oli vegetali legati alla particolare posizione geografica in cui si intende produrre il biocombustibile: olio di Tallow (Nelson *et al.*, 1996) o di *Jatropha* in India (Shah *et al.*, 2004) o di Tung in Cina (Xu, Zhang *et al.*, 2006). L'attenzione dei ricercatori si sta anche focalizzando sulla transesterificazione degli oli di frittura esausti (WCOs), facilmente reperibili e biodegradabili, evitandone così il recupero e il successivo smaltimento (Al-Zuhair *et al.*, 2009; Banerjee & Chakraborty, 2009; Liu *et al.*, 2010).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

La scelta dell'olio da utilizzare, invece, nella sperimentazione condotta durante il dottorato è ricaduta su un olio commerciale comune ("Friol"), facilmente reperibile e con caratteristiche uguali per ogni prova sperimentale condotta. L'olio commerciale "Friol" è costituito prevalentemente da olio di girasole e in parte da oli vegetali frazionati. Perciò, si considera la composizione dell'olio di girasole così come presente in letteratura (Marchetti *et al.*, 2007), riportata in Tabella 3.1:

Tab. 3.1 - Composizione dell'olio di girasole in acidi grassi

Acido grasso	% in peso
Ac. palmitoleico (16:1)	6.08
Ac. stearico (18:0)	3.26
Ac. oleico (18:1)	16.93
Ac. linoleico (18:2)	73.73

Un'analisi cromatografica in HPLC di campioni di olio "Friol" ha mostrato la composizione in termini di gliceridi (mono-, di-, tri-) mostrata in Tabella 3.2:

Tab. 3.2 - Composizione dell'olio "Friol".

Gliceridi	% in peso
trigliceridi	96-97
digliceridi	3-4
monogliceridi	-

I gruppi R , R' e R'' degli esteri saranno costituiti principalmente dall'acido linoleico e in misura minore anche dall'acido oleico e palmitico.

Sulla base di queste considerazioni e tenendo conto delle formule di struttura dei gliceridi e degli esteri, si calcolano i pesi molecolari dei gliceridi e dell'estere (Tabella 3.3).

Tab. 3.3 - Pesi molecolari di gliceridi e esteri.

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

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

3.1.2 L'alcol

Solitamente gli alcoli utilizzati nella transesterificazione enzimatica di oli vegetali sono metilico, etilico, propilico, butilico ed amilico. In letteratura sono diversi i riferimenti relativi all'impiego del metanolo (Nelson et al., 1996; Shimada et al., 1999; Bélafi-Bakó et al., 2002; Shieh et al., 2003; Du et al., 2005; Li et al., 2006; Luo et al., 2006; Xu, Zhang et al., 2006; Ying & Chen, 2007; Banerjee & Chakraborty, 2009; Al-Zuhair et al., 2009; Kumari et al., 2009; Yang et al., 2009; Liu et al., 2010; Xie & Ma, 2010), mentre sono meno numerosi quelli relativi all'impiego di etanolo (Nelson et al., 1996; Shah et al., 2004; Zhao et al., 2007; De Paola et al., 2009; Calabrò et al., 2010). Nelson et al. (1996) hanno anche investigato l'utilizzo di propanolo, butanolo e isobutanolo nella transesterificazione di olio di tallow con *Mucor miehei*.

In questo lavoro è stato scelto l'etanolo come alcol (secondo substrato della transesterificazione), perché in primo luogo si intende continuare e ampliare studi relativi alla transesterificazione enzimatica con etanolo condotti nel Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie. Inoltre, la letteratura è ricca di riferimenti relativi all'uso di metanolo e si vuole dare qui un nuovo contributo alla ricerca nel campo della produzione del biodiesel a partire da etanolo che è anche meno tossico del metanolo (Calabrò et al., 2010).

3.1.3 Il biocatalizzatore: lipasi *Pseudomonas cepacia* immobilizzata

Il catalizzatore enzimatico impiegato nella reazione di transesterificazione dell'olio commerciale è stato fornito dalla SPRIN Technologies di Trieste. Nello specifico, per indagare anche l'influenza della tipologia di immobilizzazione sulla catalisi, sono stati utilizzati due diversi biocatalizzatori: *Lipo Pseudomonas pepacia* ed *Epobond Pseudomonas Cepacia*. La prima è una lipasi immobilizzata su resina di polistirene mediante adsorbimento e in *cross-linking* col copolimero divinilbenzene, mentre la seconda è legata covalentemente a un supporto costituito da una resina epossidica-acrilica. Entrambi i biocatalizzatori mostrano un'attività sintetica maggiore di 100 U/g_{DRY} (unità: 1-phenylethyl acetate).

Le lipasi da *Pseudomonas* giocano un ruolo importante nella biotecnologia sia come idrolasi per additivi detergenti che come catalizzatori di sintesi della risoluzione cinetica di composti racemi

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

(Reetz & Jaeger, 1998). Le lipasi da *Pseudomonas* (Tabella 3.4) sono state utilizzate in diverse reazioni, come l'idrolisi (*P. Alcaligenes* con il nome commerciale Lipomax ® e *P. Mendocina* con il nome commerciale Lumafast ®) e un gran numero di reazioni sintetiche in chimica organica, con particolare attenzione sulla produzione di composti chirali racemi (*P. aeruginosa*, *P. cepacia* e *P. fluorescens*).

Tab. 3.4 - Lipasi *Pseudomonas* per applicazioni di biotecnologia (Reetz & Jaeger, 1998).

Lipasi <i>Pseudomonas</i>	Peso molecolare (kDa)	Struttura 3D (Ref.)	Applicazioni	Commercializzata da
<i>P. aeruginosa</i>	30	Jaeger et al., 1993	Sintesi organiche	Merck, USA
<i>P. alcaligenes</i>	30	–	Additivo detergenti	Genencor International, USA
<i>P. mendocina</i>	30	+ (Boston et al., 1997)	Additivo detergenti	Genencor International, USA
<i>P. cepacia</i>	33	+ (Schrag et al., 1997)	Sintesi organiche	Amano, Japan
<i>P. glumae</i>	33	+ (Noble et al., 1993)	Sintesi organiche	Unilever, The Netherlands
<i>P. fluorescens</i>	50	–	Sintesi organiche	Biocatalysts, UK

+ : struttura 3D determinata attraverso cristallografia a raggi X; – : struttura 3D non pubblicata.

La lipasi da *Pseudomonas cepacia* è un catalizzatore largamente utilizzato nella risoluzione di miscele racemiche di alcoli primari e secondari chirali, nell'esterificazione enantioselettiva e nelle sintesi organiche quali: idrolisi/esterificazione di acidi grassi a catena lunga e transesterificazione di trigliceridi con alcoli a catena corta (soprattutto, metanolo ed etanolo) per la produzione di biodiesel. Mentre la sua stereopreferenza è determinata prevalentemente dalla struttura del substrato, la stereoselettività dipende dai dettagli atomici delle interazioni tra substrato e lipasi (Schulz et al., 2000). Sono stati studiati diversi metodi di immobilizzazione della *Pseudomonas cepacia*: adsorbimento su un supporto poroso di polipropilene (Pencreac'h et al., 1997), intrappolamento su una matrice di sol-gel di fillosilicato (Hsu et al., 2000), intrappolamento all'interno di un supporto in sol gel idrofobo chimicamente inerte (Noureddini et al., 2002), immobilizzazione covalente su silicio poroso-cristallino (Fernandez et al., 2008).

Per quanto riguarda l'uso della *P. cepacia* nella transesterificazione degli oli esausti, Nelson et al. (1996) studiarono e confrontarono l'attività catalitica di quattro tipologie di lipasi (*M. meihei*, *C. antarctica*, *G. candidum* e *P. cepacia*) e riscontrarono le seguenti condizioni

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

operative ottimali: temperatura di 45°C, velocità di agitazione di 200 rpm, concentrazione dell'enzima 12-25% wt (basata sui trigliceridi), rapporto molare Alcol:Olio pari a 3:1 e tempo di reazione di 4-8 ore quando si ricorreva ad alcoli primari e di 16 ore quando si ricorreva ad alcoli secondari. L'enzima *M. meihei* risultò il più efficiente sugli alcoli primari con una conversione del 95%, mentre la *P. cepacia* si dimostrò la più efficiente con gli alcoli secondari con una conversione del 90%. Nelson et al. (1996), inoltre, studiarono l'effetto della presenza di un solvente organico, quale l'esano, sull'attività catalitica di tali enzimi, riscontrando che conversioni maggiori si ottengono in assenza di tali solventi. Poiché questo lavoro evidenziò che l'enzima *P. cepacia* non era un buon catalizzatore per le transesterificazioni degli oli esausti con alcol primari, furono portati avanti molti studi con lo scopo di massimizzare le conversioni raggiunte con tale enzima. Ad esempio, Wu et al. (1999) ottennero una resa in esteri dell'85% utilizzando la *P. cepacia* per la transesterificazione degli oli esausti con metanolo nelle seguenti condizioni operative: temperatura 38.4°C, tempo di reazione 2.47 ore, contenuto lipasi 13,12% wt e Etanolo:Olio 6.6:1.

Gli effetti dell'immobilizzazione sull'attività catalitica dell'enzima furono, invece, analizzati da Hsu et al. (2001). La lipasi *P. cepacia* fu immobilizzata in una matrice sol-gel e poi impiegata per la transesterificazione con alcoli sia primari che secondari, in assenza di solventi organici. Si riscontrarono basse conversioni, 47-89%, con la lipasi libera ed ottime conversioni, 84-94%, invece, con l'immobilizzata. In particolare nel caso di reazione utilizzando etanolo al 95% furono ottenute conversioni maggiori del 94% in 2.47 ore, impiegando 13.7% di enzima ed una temperatura di 38.4°C. Si dimostrò, inoltre, che tale lipasi immobilizzata poteva essere riutilizzata fino a sei volte senza registrare alcuna perdita significativa di attività. In un altro studio, inoltre, Hsu et al. (2002) testarono l'attività catalitica della *P. cepacia* immobilizzata su sol-gel nella reazione di transesterificazione degli oli esausti con alimentazione singola dell'alcol. Si ottenne una resa in esteri del 98% in 48 ore senza alcuna disattivazione dell'enzima da parte dell'alcol.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

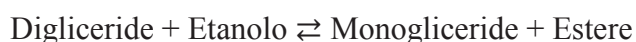
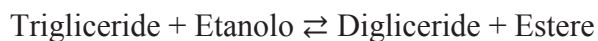
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

3.2 Studio sperimentale della stabilità e dell'attività della *Lipo P. cepacia*

3.2.1 Obiettivi e piano sperimentale

La transesterificazione di olio commerciale FRIOL con etanolo avviene mediante tre reazioni reversibili in serie – parallelo:



I due substrati principali sono i trigliceridi e l'etanolo, dal momento che la quantità di digliceridi presente inizialmente e che partecipa alla reazione è bassa rispetto a quella dei trigliceridi.

Prima di studiare questo sistema di reazioni dal punto di vista cinetico, sono stati indagati i diversi aspetti che concernono la stabilità e le prestazioni del biocatalizzatore. Per quel che riguarda la stabilità del biocatalizzatore oggetto di studio, è stata verificata l'assenza di rilascio di enzima dal supporto nella miscela di reazione. Le prestazioni del biocatalizzatore sono state, invece, studiate mediante la valutazione dell'influenza dei seguenti fattori sulla conversione dei trigliceridi:

- tenore di acidi grassi liberi FFA e dei trigliceridi, poiché dalla letteratura emerge che le lunghe catene di acidi grassi liberi possono essere adsorbite all'interno del supporto causando, se in grosse quantità, la parziale ostruzione dei pori del catalizzatore e, quindi, un impedimento all'attacco da parte del substrato ai siti attivi con conseguente rallentamento dell'attività dell'enzima, soprattutto nella fase iniziale (*Hsu et al., 2000*);
- concentrazione di alcol, che ha un effetto inibitorio;
- velocità di agitazione;
- lavaggio del catalizzatore prima di un successivo riutilizzo.

3.2.2 Conduzione delle prove

Le prove di reazione sono state condotte in un sistema batch, costituito da un pallone di vetro, riposto all'interno di un bagno termico agitato, in condizioni di temperatura e velocità di agitazione controllate e costanti.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

Le prove mirate a verificare l'assenza di rilascio di enzima dal supporto sono state condotte con una quantità di catalizzatore pari all'1% dell'olio caricato. Il biocatalizzatore è stato incubato per 180 minuti a una temperatura costante di 37°C e a due diversi valori di velocità di agitazione (100 e 150 strokes/min). Al termine dell'incubazione, l'olio è stato separato dal biocatalizzatore mediante filtrazione e a quello stesso olio è stato aggiunto etanolo in 3 step (in ciascuno dei quali si garantisce un rapporto olio:alcol pari a 1:1, ovvero 1/3 di quello stechiometrico): se fosse stato rilasciato enzima nell'olio, i trigliceridi sarebbero stati convertiti in esteri.

L'effetto dei trigliceridi e degli acidi grassi liberi sull'attività del biocatalizzatore è stato valutato incubando il biocatalizzatore (all'1% rispetto all'olio) in olio per 180 min alla temperatura costante di 37°C e alla velocità di agitazione di 150 strokes/min. Terminata questa fase, è stato separato l'olio dal catalizzatore e sono state effettuate due tipologie di prove:

- 1) reazione con il catalizzatore non lavato dopo l'incubazione in olio, olio fresco e alcol alimentato in tre steps successivi;
- 2) reazione con il catalizzatore lavato con esano dopo l'incubazione in olio, olio fresco e alcol alimentato in tre steps successivi.

L'effetto inibitorio dell'etanolo sul biocatalizzatore è stato verificato conducendo la reazione sia con un'unica alimentazione iniziale di alcol in rapporto stechiometrico olio: alcol pari a 1:3 sia con un'alimentazione di alcol in tre steps da 100 minuti ciascuno (ciascuno con rapporto olio:alcol pari a 1:1).

L'influenza della velocità di agitazione è stata valutata conducendo la prova di reazione con il biocatalizzatore fresco all'1%, olio e alcol alimentato in tre steps successivi alla temperatura costante di 37°C e a due diverse velocità di reazione: 150 e 200 strokes/min.

Infine, si è visto se il lavaggio con esano del biocatalizzatore separato dalla miscela di reazione avesse (e in che misura) effetto sull'andamento della reazione avviata con il biocatalizzatore riutilizzato nelle stesse condizioni operative della reazione con biocatalizzatore "fresco" (37°C e 200 strokes/min).

I campioni prelevati durante la reazione sono stati analizzati in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con fase mobile acetone/acetonitrile in rapporto 70/30 v/v.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

3.2.3 Risultati e discussione

3.2.3.1 Verifica dell'assenza di rilascio dell'enzima dal supporto

Per valutare l'eventuale rilascio di enzima dal supporto, il biocatalizzatore è stato incubato in olio per tre ore, alla temperatura costante di 37°C e a due diverse velocità di agitazione (100 e 150 strokes/min). In seguito, è stato aggiunto l'etanolo, senza utilizzo di catalizzatore e si è verificato che i campioni prelevati a diversi tempi presentano le stesse caratteristiche (Tabelle 3.5 e 3.6), per cui non c'è enzima libero in soluzione capace di catalizzare la reazione.

Tab. 3.5 - Concentrazioni percentuali delle specie in miscela a diversi tempi dopo incubazione del biocatalizzatore in olio alla velocità di agitazione di 100 strokes/min.

Tempo [min]	Monogliceridi %	Esteri %	Digliceridi %	Trigliceridi %
10	0	0.51	4.18	95.31
20	0	0.53	4.11	95.36
100	0	0.52	4.08	95.40
200	0	0.48	4.03	95.49

Tab. 3.6 - Concentrazioni percentuali delle specie in miscela a diversi tempi dopo incubazione del biocatalizzatore in olio alla velocità di agitazione di 150 strokes/min.

Tempo [min]	Monogliceridi %	Esteri %	Digliceridi %	Trigliceridi %
10	0	1.08	5.77	93.15
20	0	1.05	5.65	93.30
100	0	1.08	5.94	92.98
200	0	1.09	5.62	93.29

Prove analoghe sono state condotte anche con il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia* e anche in questo caso si è verificato che non vi è alcun rilascio di enzima dal supporto durante la reazione.

3.2.3.2 Effetto della preliminare incubazione in olio sull'attività del biocatalizzatore

L'andamento della reazione di transesterificazione dell'olio, con e senza preliminare incubazione del biocatalizzatore in olio, è stato seguito mediante prelievi e analisi della miscela di reazione a diversi tempi. È stata, quindi, analizzata l'evoluzione temporale delle concentrazioni dei gliceridi e degli esteri durante la reazione. A titolo d'esempio, si riporta in Figura 3.1 l'andamento della concentrazione degli esteri (in % rispetto al totale dei gliceridi e degli esteri, misurabili in HPLC), nelle reazioni condotte sul biocatalizzatore lavato con esano

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

o non lavato dopo l'incubazione in olio. Come controllo, è stata condotta la reazione senza preliminare incubazione del biocatalizzatore in olio.

La differenza tra l'utilizzo di catalizzatore non lavato dopo l'incubazione in olio e quello di catalizzatore lavato è molto marcata. Questo presupporrebbe che le catene di acidi grassi liberi e di trigliceridi abbiano una certa influenza sull'attività dell'enzima immobilizzato, in quanto si depositano sulla sua superficie dando luogo alla formazione di un film sottile, ostruendo parzialmente i pori del catalizzatore e causando un rallentamento della reazione con un aumento del tempo di attacco ai siti attivi. Il lavaggio con esano riporta, invece, l'attività del biocatalizzatore a quella originaria, dal momento che la reazione evolve in modo del tutto analogo a quella con catalizzatore "fresco" che non ha subito alcuna incubazione in olio.

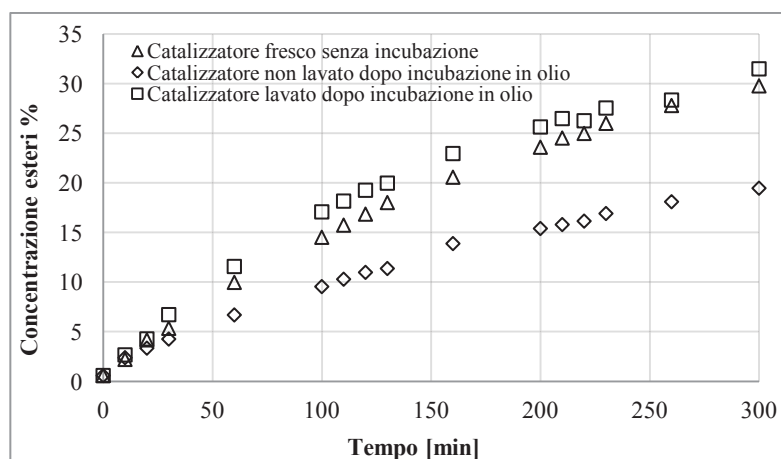


Fig. 3.1 - Percentuale di esteri nella fase gliceridi+esteri nella transesterificazione con 1% di biocatalizzatore, con e senza preliminare incubazione in olio e lavaggio con esano.

3.2.3.3 Verifica dell'inibizione da etanolo

L'andamento delle concentrazioni dei gliceridi e degli esteri mostrato in Figura 3.2 evidenzia come l'alimentazione a step aumenti la conversione rispetto all'alimentazione dell'etanolo stechiometrico all'inizio della reazione. In particolare, con l'alimentazione stechiometrica all'inizio della reazione bisogna aspettare un tempo più che doppio per raggiungere le stesse concentrazioni di quando si procede con un'alimentazione in tre *steps*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

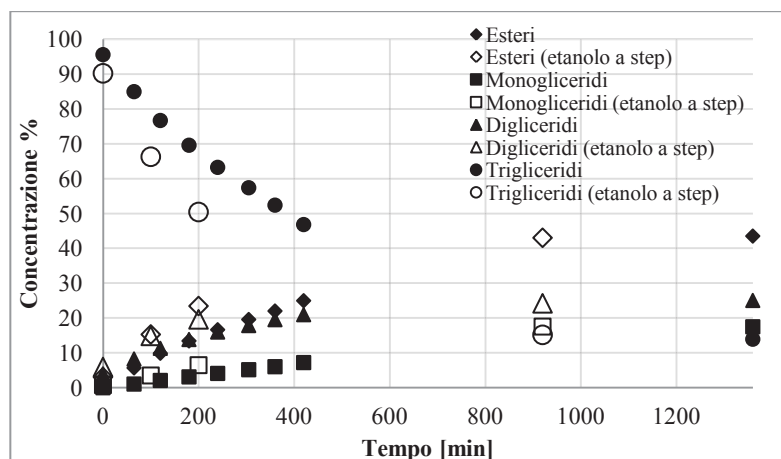


Fig. 3.2 - Andamento nel tempo delle concentrazioni dei gliceridi e degli esteri con alimentazione stechiometrica dell'etanolo all'inizio della reazione e con alimentazione di etanolo in 3 steps (1% di biocatalizzatore).

3.2.3.4 Effetto della velocità di agitazione sull'attività del biocatalizzatore

La transesterificazione con l'1% di biocatalizzatore rispetto alla massa d'olio caricata è stata valutata a due diverse velocità di agitazione, seguendo l'evoluzione temporale delle concentrazioni dei gliceridi e degli esteri presenti nel sistema di reazione. A titolo d'esempio, si riporta in Figura 3.3 l'andamento della concentrazione degli esteri (in % rispetto al totale dei gliceridi e degli esteri, misurabili in HPLC).

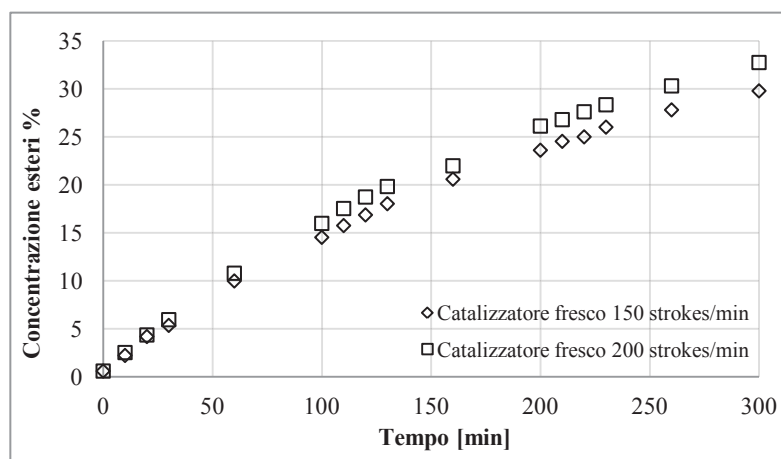


Fig. 3.3 Confronto tra le concentrazioni di esteri (in % rispetto alla somma dei gliceridi e degli esteri presenti nel sistema di reazione) al variare del tempo a 150 e a 200 strokes/min.

È evidente che l'aumento della velocità di reazione da 150 a 200 strokes/min è del tutto ininfluente nel primo step di reazione e porta a un leggerissimo miglioramento negli altri due

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

steps, garantendo probabilmente minori resistenze al trasporto quando viene aggiunto l'alcol dopo 100 minuti dall'inizio della reazione.

3.2.3.5 Effetto del lavaggio del biocatalizzatore con esano

Dopo aver condotto una prova di transesterificazione con biocatalizzatore all'1% per 300 minuti a 37°C e 200 strokes/min, il biocatalizzatore è stata lavato con esano e riutilizzato per una nuova reazione nelle stesse condizioni del precedente. Dalla Figura 3.4 emerge che gli andamenti della concentrazione di esteri prodotti nelle due reazioni sono perfettamente sovrapponibili, per cui il lavaggio con esano è stato sufficiente a riportare il biocatalizzatore nel suo stato originario.

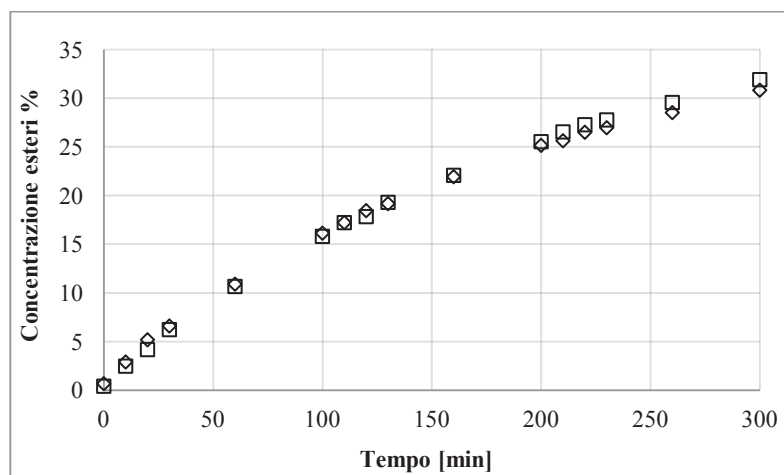


Fig. 3.4 - Confronto, al primo riutilizzo, tra gli andamenti della concentrazione di esteri nelle reazioni condotte con il catalizzatore fresco e con quello lavato con esano.

Sono state poi effettuate prove con un ulteriore riutilizzo del catalizzatore (senza effettuare prelievi intermedi se non quelli alla fine di ogni step di reazione) in due condizioni:

- secondo riutilizzo del biocatalizzatore, senza l'alimentazione della terza aliquota di reazione, ma "dilatando" il secondo step fino a che non si raggiungono condizioni di invarianza delle concentrazioni delle specie nella miscela di reazione;
- secondo riutilizzo del biocatalizzatore, prolungando il terzo step fino a che non si raggiungono condizioni di invarianza delle concentrazioni delle specie nella miscela di reazione.

I tre andamenti sono confrontati in Figura 3.5.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

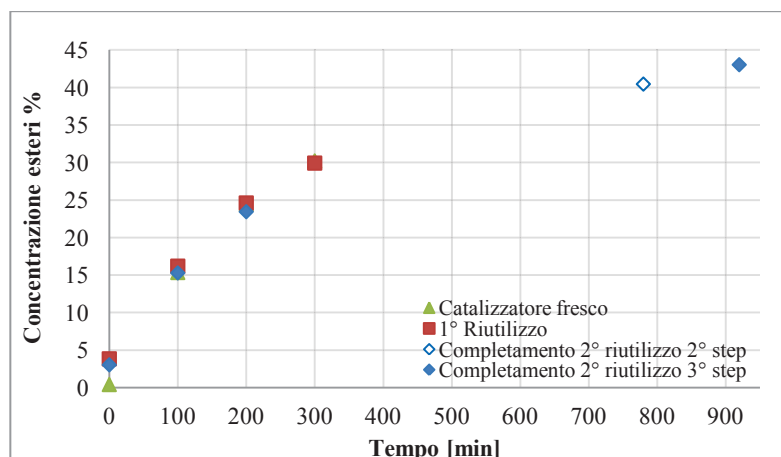


Fig. 3.5 - Riutilizzo del catalizzatore senza prelievi intermedi.

Infine, in Figura 3.6 si evidenzia che i prelievi intermedi non alterano l'andamento della reazione, dal momento che le concentrazioni alla fine di ogni step di reazione sono praticamente uguali nelle prove di reazione condotte sia con i prelievi intermedi che senza.

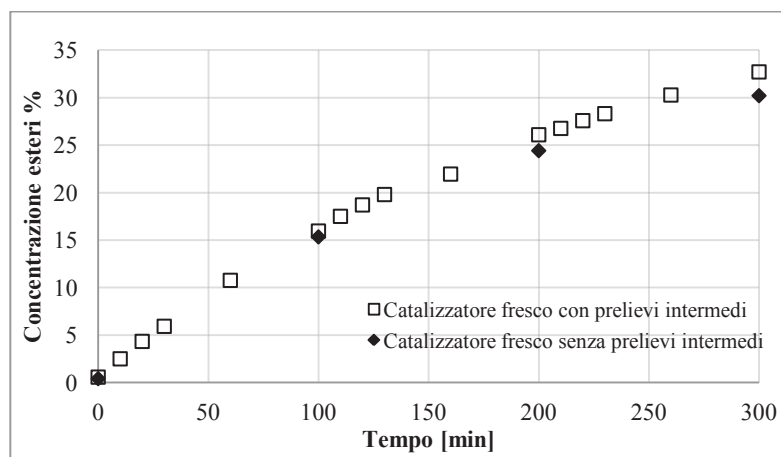


Fig. 3.6 - Andamento della concentrazione di esteri nella reazione con catalizzatore fresco all'1% con e senza prelievi intermedi di miscela di reazione.

3.3 Studio sperimentale della transesterificazione di un olio vegetale “fresco” mediante il biocatalizzatore *Lipo P. cepacia* e *Epobond P. cepacia*

3.3.1 Obiettivi e piano sperimentale

Chiariti gli aspetti legati alla stabilità e all'attività del biocatalizzatore, l'obiettivo della successiva sperimentazione è stato l'individuazione della cinetica di reazione, valutando l'efficienza dell'attività enzimatica in relazione alla quantità di catalizzatore impiegato (*Li et*

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

al., 2006; Xu, Zhang *et al.*, 2006; Xie & Ma, 2010) con un'alimentazione a step dell'etanolo per evitare i problemi legati alla scarsa solubilità dell'alcol in olio (Marchetti *et al.*, 2007). Inoltre, dal momento che il costo dell'enzima per kg di estere prodotto è significativamente alto (soprattutto se confrontato con gli altri metodi di produzione dell'enzima) (Bajaj *et al.*, 2010), si è testato il riutilizzo dell'enzima immobilizzato per un certo numero di cicli senza prevedere alcun lavaggio tra un ciclo e l'altro, in modo da realizzare un processo biocompatibile ma anche economicamente vantaggioso.

È stato, quindi, progettato un piano sperimentale che prevede l'alimentazione in tre step dell'etanolo e il riutilizzo del catalizzatore.

3.3.2 Conduzione delle prove

La reazione di transesterificazione è stata fatta avvenire in laboratorio all'interno di un reattore batch, costituito da un pallone chiuso (250 ml), posto all'interno di un bagno termostato alla temperatura di 37°C e a una velocità di agitazione promossa esternamente di 200 strokes/min.

Il piano sperimentale è stato organizzato nel seguente modo:

Lipo P. cepacia:

- ❖ conduzione della reazione a tre diversi valori del rapporto % catalizzatore/olio: 1% w/w; 3% w/w; 5% w/w;
- ❖ per ogni fissato valore di % catalizzatore/olio esecuzione delle prove così articolata:
 1. **Prova F** (relativa all'impiego del catalizzatore "fresco"): alimentazione a step dell'etanolo in tre momenti successivi, cioè al tempo iniziale e poi ogni 100 minuti, per una durata complessiva della reazione di 300 minuti; sono stati prelevati campioni della miscela di reazione (da analizzare successivamente in HPLC) a intervalli di tempo fissati; infine, è stato separato e recuperato il biocatalizzatore.
 2. **Prova R1** (relativa al primo riutilizzo del biocatalizzatore): procedura analoga al punto 1.
 3. **Prova R2** (relativa al secondo riutilizzo del biocatalizzatore): procedura analoga al punto 1., ma che non richiede la separazione del catalizzatore dalla miscela reagita al termine della reazione.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

4. **Prova F2** (relativa all'impiego del catalizzatore "fresco"): alimentazione a step dell'etanolo in tre momenti successivi, cioè al tempo iniziale e poi ogni 180 minuti, per una durata complessiva della reazione di 540 minuti; sono stati prelevati campioni della miscela di reazione (da analizzare successivamente in HPLC) a intervalli di tempo fissati;
- ❖ Analisi dei campioni prelevati in HPLC per valutare in che modo cambia nel tempo la concentrazione di monogliceridi, digliceridi, trigliceridi ed esteri (fase mobile acetone/acetonitrile 70:30 v/v, flusso fase mobile 1 ml/min). Un esempio di cromatogramma elaborato nel corso della sperimentazione è mostrato in Figura 3.7.

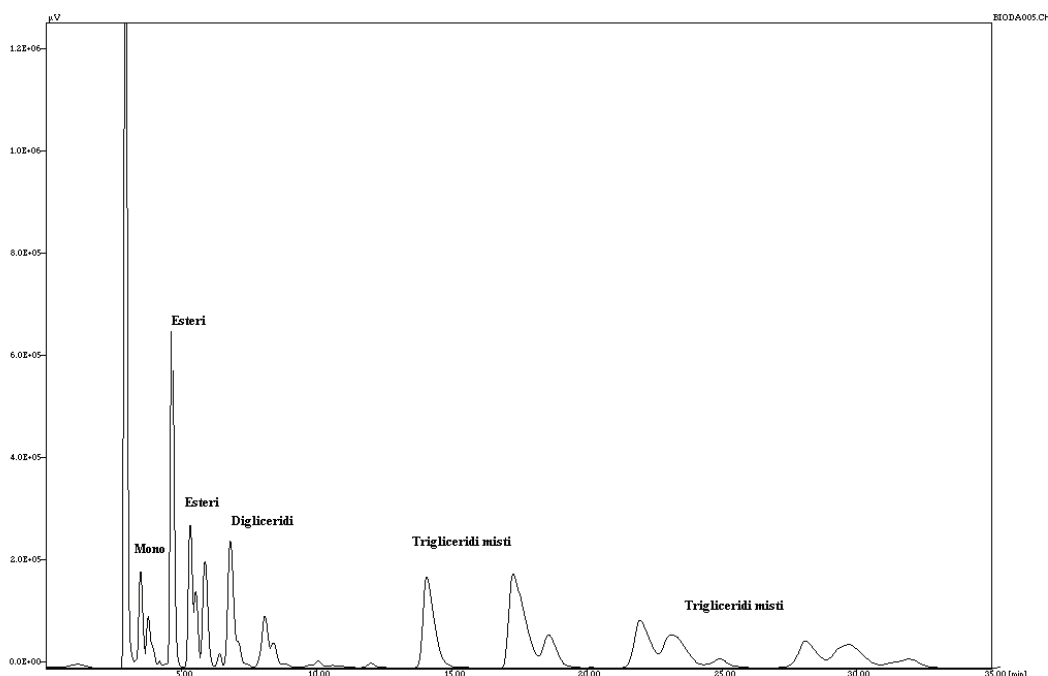


Fig. 3.7 - Cromatogramma del campione 1% cat/olio, prova F, 1°step dopo 60 min di reazione.

Epobond P. cepacia:

- ❖ conduzione della reazione a tre diversi valori del rapporto % catalizzatore/olio: 1% w/w; 3% w/w; 5% w/w;
- ❖ per ogni fissato valore di % catalizzatore/olio esecuzione delle prove così articolata:
- Prova F** (relativa all'impiego del catalizzatore "fresco"): alimentazione a step dell'etanolo in tre momenti successivi, cioè al tempo iniziale e poi ogni 180 minuti,

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

per una durata complessiva della reazione di 540 minuti; sono stati prelevati campioni della miscela di reazione (da analizzare successivamente in HPLC) a intervalli di tempo fissati; infine, è stato separato e recuperato il biocatalizzatore.

Prove R (relative a successivi riutilizzi del biocatalizzatore): si separa il biocatalizzatore dal sistema di reazione dopo la transesterificazione dell'olio fresco e si procede al lavaggio con esano del biocatalizzatore stesso; si lascia poi evaporare l'esano residuo nel biocatalizzatore e si riutilizza il biocatalizzatore in una nuova reazione con olio fresco (considerando sempre una quantità di biocatalizzatore pari al 3% dell'olio fresco). Lo stesso biocatalizzatore è stato riutilizzato in 7 cicli di reazione consecutivi, come riportato in Tabella 3.7:

Tab. 3.7 - Condizioni iniziali e operative delle diverse prove condotte a partire da olio fresco con il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia*.

PROVA	ENZIMA	OLIO	ENZIMA/OLIO [w/w]
1	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Fresco	1%
2	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Fresco	3%
3	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Fresco	5%
4	Riutilizzato da 2	Fresco	3%
5	Riutilizzato da 4	Fresco	3%
6	Riutilizzato da 5	Fresco	3%
7	Riutilizzato da 6	Fresco	3%
8	Riutilizzato da 7	Fresco	3%
9	Riutilizzato da 8	Fresco	3%

- ❖ Analisi dei campioni prelevati in HPLC per valutare in che modo cambia nel tempo la concentrazione di monogliceridi, digliceridi, trigliceridi ed esteri (fase mobile acetone/acetonitrile 70:30 v/v, flusso fase mobile 1 ml/min).

3.3.3 Rielaborazione dei dati

L'analisi dei campioni all'HPLC fornisce le percentuali massiche (% w_i) dei gliceridi (mono-, di-, tri-) e degli esteri, cioè w_{mono} , w_{di} , w_{tri} , w_{estere} in $[(g/g_{tot}) \cdot 100]$. Questi dati vengono rielaborati in termini di concentrazioni, le cui unità di misura sono espresse in $[mmol/g_{tot}]$.

Per semplificare la trattazione si indicheranno i composti secondo la nomenclatura riportata in Tabella 3.8.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

Tabella 3.8. Nomenclatura utilizzata per le specie coinvolte nella reazione di transesterificazione.

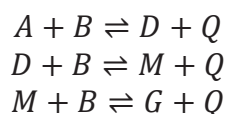
COMPOSTO	SIMBOLO
Trigliceridi	A
Etanolo	B
Digliceridi	D
Monogliceridi	M
Esteri	Q
Glicerolo	G
Monogliceridi+Digliceridi+Glicerolo	P

Le concentrazioni delle specie rilevate in HPLC possono essere, quindi, espresse nel seguente modo:

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{mono} = \frac{(\%w_M/100)}{MW_M} \cdot 1000 \\ C_{estere} = \frac{(\%w_Q/100)}{MW_Q} \cdot 1000 \\ C_{di} = \frac{(\%w_D/100)}{MW_D} \cdot 1000 \\ C_{tri} = \frac{(\%w_T/100)}{MW_T} \cdot 1000 \end{array} \right.$$

in cui si sono considerati i pesi molecolari dei vari composti (MW_i).

Le concentrazioni di glicerolo (C_G) ed etanolo (C_B) possono essere calcolate indirettamente mediante dei bilanci di materia, ricordando le reazioni che avvengono durante la transesterificazione:



In particolare, per il glicerolo si ottiene:

$$C_G = [C_T(t=0) - C_T(t)] - [C_D(t=0) - C_D(t)] - [C_M(t=0) - C_M(t)]$$

Per quanto riguarda l'etanolo, è necessario valutare il bilancio di materia per ogni *step* separatamente:

$$1^\circ \text{ step: } C_B(t) = C_B(t=0) - C_Q(t)$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

$$2^\circ \text{ step: } C_B(t) = 2C_B(t=0) - C_Q(t)$$

$$3^\circ \text{ step: } C_B(t) = 3C_B(t=0) - C_Q(t)$$

Queste relazioni derivano dal fatto che l'estere formato è legato all'etanolo consumato tramite il rapporto molare di 1:1, mentre il glicerolo è prodotto dalle moli non reagite dei tri-, di- e monogliceridi.

In modo più rigoroso si può procedere definendo per ciascuna delle tre reazioni un grado di avanzamento pari alle moli di esteri formate nella reazione i -esima nell'unità di tempo e nell'unità di volume:

$$\xi_i = \frac{\text{mol}_{Q, \text{REAZIONE } i}}{t V}$$

Per ogni composto, quindi, si può scrivere il bilancio di materia in funzione del grado di avanzamento appena definito.

- Trigliceridi $\frac{dC_A}{dt} = -\xi_1$
- Digliceridi $\frac{dC_D}{dt} = \xi_1 - \xi_2$
- Monogliceridi $\frac{dC_M}{dt} = \xi_2 - \xi_3$
- Glicerolo $\frac{dC_G}{dt} = \xi_3$
- Esteri $\frac{dC_Q}{dt} = \xi_1 + \xi_2 + \xi_3$
- Etanolo $\frac{dC_B}{dt} = -\xi_1 - \xi_2 - \xi_3$

L'analisi in HPLC fornisce l'andamento temporale di A, D, M e Q. Attraverso le derivate numeriche è possibile determinare il valore da assegnare al grado di avanzamento di ciascuna reazione e, quindi, determinare il profilo temporale delle concentrazioni dei composti non rilevabili attraverso una semplice integrazione numerica. Si procede, quindi, nel seguente modo:

$$C_A(t) \Rightarrow \xi_1 = -\frac{C_A(t_i) - C_A(t_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})}$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

$$C_D(t) \Rightarrow \xi_2 = \xi_1 - \frac{C_D(t_i) - C_D(t_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})}$$

$$C_M(t) \Rightarrow \xi_3 = \xi_2 - \frac{C_M(t_i) - C_M(t_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})}$$

e, utilizzando il bilancio ridondante sugli esteri si può verificare l'accuratezza della stima del grado di avanzamento secondo la procedura appena esposta. Si può, infatti, determinare la somma dei tre gradi di avanzamento attraverso la relazione:

$$C_Q(t) \Rightarrow \xi_1 + \xi_2 + \xi_3 = \frac{C_Q(t_i) - C_Q(t_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})}$$

e confrontarla con il valore ottenuto sommando, invece, i valori ricavati prima. A questo punto si possono determinare le concentrazioni dei due composti rimanenti integrando le espressioni del bilancio di materia scritte precedentemente.

- Glicerolo

$$\frac{dC_G}{dt} = \xi_3 \Rightarrow \int_{C_{G0}}^{C_G} dC_G = \int_{t_0}^t \xi_3 dt \quad \text{con } C_{G0} = 0 \text{ mol/l}$$

- Etanolo

$$\frac{dC_B}{dt} = -\xi_1 - \xi_2 - \xi_3 \Rightarrow \int_{C_{B0}}^{C_B} dC_B = \int_{t_0}^t (-\xi_1 - \xi_2 - \xi_3) dt$$

In questo caso, però, l'equazione va scritta ed integrata per ciascuno step, poiché cambiano le condizioni iniziali:

$$1^\circ \text{ step} \quad C_{B0} = \frac{1}{3} \text{ stechiometrico} = C_{A0}$$

$$2^\circ \text{ step} \quad C_{B0} = \frac{1}{3} \text{ stechiometrico} + C_B(t_F)|_{1^\circ \text{ STEP}} = C_{A0} + C_B(t_F)|_{1^\circ \text{ STEP}}$$

$$3^\circ \text{ step} \quad C_{B0} = \frac{1}{3} \text{ stechiometrico} + C_B(t_F)|_{2^\circ \text{ STEP}} = C_{A0} + C_B(t_F)|_{2^\circ \text{ STEP}}$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

Determinate tutte le concentrazioni è importante anche considerare come evolve nel tempo la conversione in esteri, definita come:

$$\eta = \frac{C_Q}{3C_{B0}|_{1^{\circ} STEP}}$$

dove C_{B0} è la concentrazione dell'alcol alimentato al primo step.

La scrittura dei bilanci di materia sui singoli componenti attraverso la definizione di un grado di avanzamento è risultata necessaria dato che si ha a che fare con tre reazioni serie-parallelo reversibili. La reversibilità, o al massimo la presenza di qualche ancora non definito effetto inibitorio, è concorde con quanto ottenuto. Nessuna concentrazione dei reagenti, infatti, scende a zero, assestandosi, invece, ad un valore finito, indice del non raggiungimento di una condizione di equilibrio. Se così non fosse almeno l'etanolo, alimentato in ciascun step in difetto stechiometrico, sarebbe reagito totalmente, e la sua concentrazione scesa a zero. Per questi motivi si ritiene valida l'ipotesi di tre step reversibili.

3.3.4 Risultati e discussione – Prove con Lipo P. cepacia

La seguente Figura 3.8 riporta l'evoluzione temporale dei monogliceridi, digliceridi, trigliceridi ed esteri nella transesterificazione enzimatica con catalizzatore fresco all'1% in peso nella prova condotta in 3 step da 100 minuti ciascuno:

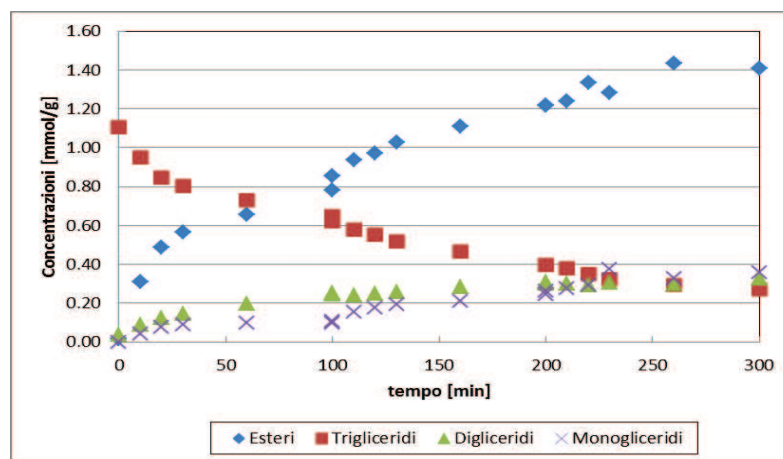


Fig. 3.8 - Evoluzione temporale di monogliceridi, digliceridi, trigliceridi ed esteri, prova 1% F.

La concentrazione dei trigliceridi consumati diminuisce significativamente nel primo step e nei primi 30 minuti di reazione, così come nello stesso tempo aumenta considerevolmente la

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

concentrazione di esteri prodotti. I mono- e i digliceridi si formano nel primo *step* di reazione; l'aumento di concentrazione è meno marcato nel secondo *step*; infine nell'ultimo *step* la concentrazione di entrambi i composti tende ad un valore costante.

L'andamento delle concentrazioni tende a un valore di *plateau* dopo 250 minuti.

È importante considerare come evolve nel tempo la conversione in esteri, definita nel seguente modo (De Paola *et al.*, 2009):

$$\eta = \frac{C_{estere}}{3C_{etanolo}(t = 0)}$$

dove la $C_{etanolo}(t = 0)$ è la concentrazione dell'alcol alimentato al primo *step*.

Con questo tipo di lipasi immobilizzata la transesterificazione di olio fresco "Friol" con etanolo consente, nelle condizioni operative descritte, di raggiungere una conversione finale del 43% dopo 300 minuti di reazione.

La stessa analisi è stata ripetuta anche con il catalizzatore all'1% al secondo ciclo di reazione (primo riutilizzo R1) e al terzo ciclo di reazione (secondo riutilizzo R2). A questo proposito è interessante valutare l'attività del catalizzatore confrontando l'evoluzione temporale degli esteri prodotti nelle tre reazioni consecutive (F, R1, R2), come evidenziato in Figura 3.9.

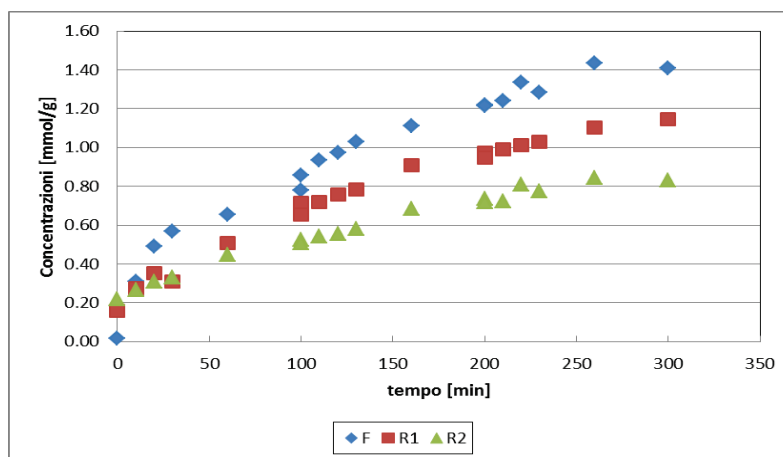


Fig. 3.9 - Andamento della concentrazione degli esteri nel tempo nelle prove con catalizzatore all'1% fresco, al primo riutilizzo e al secondo riutilizzo.

Nelle prove R1 e R2 il valore iniziale di concentrazione degli esteri è di 0.20 mmol/g, a causa della non perfetta separazione del catalizzatore dalla miscela reagita, che è costituita principalmente da esteri. Nel valutare l'andamento delle conversioni nel tempo si tiene conto

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

di quanto appena osservato e nelle prove relative al catalizzatore riciclato (R1 e R2) la conversione effettiva $\eta_{effettiva}$ è calcolata nel seguente modo:

$$\eta_{effettiva}(t) = \eta(t) - \eta(t = 0)$$

in cui $\eta(t)$ è stata precedentemente definita e $\eta(t=0)$ è la conversione al tempo iniziale (diversa da zero). L'andamento della conversione nel tempo per le tre reazioni consecutive è mostrato in Figura 3.10.

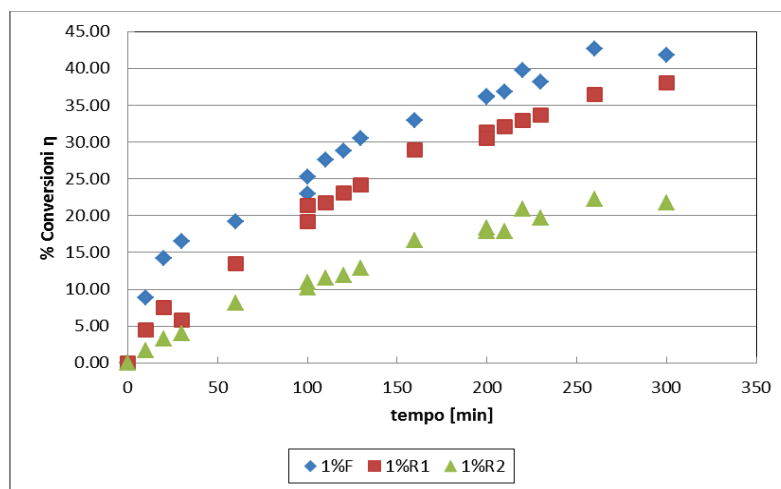


Fig. 3.10 - Andamento della conversione nel tempo nelle prove con catalizzatore all'1% fresco, al primo riutilizzo e al secondo riutilizzo.

La conversione finale in esteri è del 43%, se si impiega il catalizzatore fresco; è pari al 38%, se la lipasi è stata riciclata una volta. Si osserva una diminuzione significativa della conversione nella prova R2, in cui il catalizzatore è al suo terzo utilizzo. Ciò può essere dovuto al deposito del glicerolo e di parte dei gliceridi sulla superficie catalitica o alla denaturazione dell'enzima, che è stato già impiegato in due precedenti cicli di reazione, poi coperto con olio nel pallone e mantenuto nel bagno termostatico, alle condizioni operative indicate, per 12 ore prima dell'ultima prova.

Sono state effettuate delle prove al variare della quantità di catalizzatore rispetto all'olio alimentato, a parità delle altre condizioni, e si è osservato che all'aumentare della concentrazione di catalizzatore si ottengono conversioni più alte (Figura 3.11).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

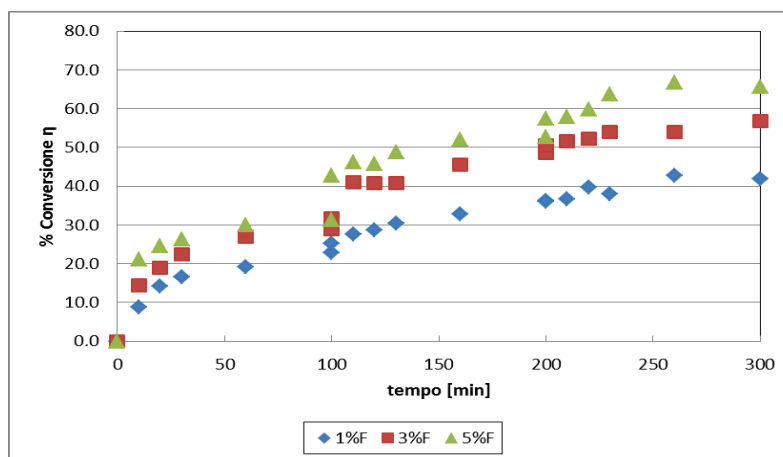


Fig. 3.11 - Andamento della conversione nel tempo nelle prove con catalizzatore fresco all'1%, 3% e 5%.

Si può affermare che i risultati raggiunti, nelle condizioni indicate, sono apprezzabili; in particolare, con un rapporto % catalizzatore/olio pari al 5%, dopo 300 minuti si raggiunge una conversione del 65%. Dall'analisi dei dati sperimentali si è visto che il secondo riutilizzo del biocatalizzatore (prova R2) costituisce un punto critico della reazione di transesterificazione, dal momento che la conversione è significativamente più bassa, se confrontata con quella delle prove F (catalizzatore fresco) o R1 (primo riutilizzo della lipasi immobilizzata). Per approfondire questo aspetto si potrebbe studiare la possibilità di effettuare il lavaggio della lipasi con un opportuno solvente.

Nelle seguenti Figure 3.12-3.15 sono, invece, riportati i profili delle concentrazioni di reagenti e prodotti nelle prove di reazione condotte con le tre diverse concentrazioni di biocatalizzatore (1%, 3%, 5%) in tre step da 180 minuti ciascuno, per un tempo di reazione totale di 540 minuti. È evidente che un aumento della concentrazione di biocatalizzatore dall'1% al 3% porta a un significativo aumento della concentrazione degli esteri (che raddoppia da 1 mol/l a quasi 2 mol/l), mentre un ulteriore aumento dal 3% al 5% non porta a miglioramenti significativi della concentrazione di esteri e quindi della conversione di trigliceridi nel prodotto desiderato.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

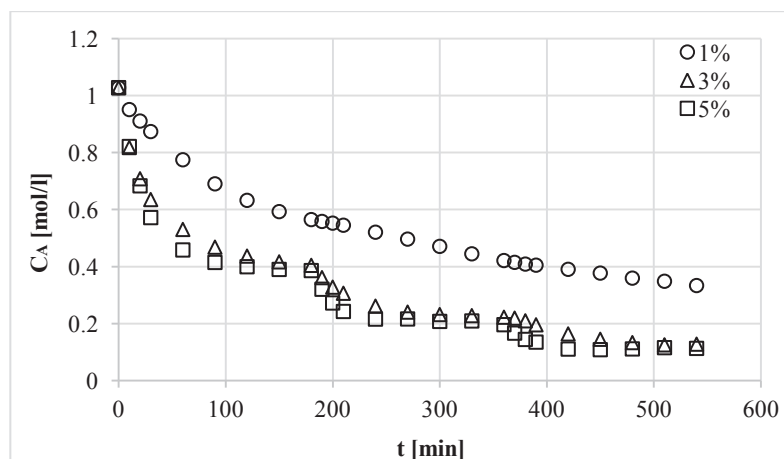


Fig. 3.12 - Andamento dei trigliceridi nella transesterificazione di olio fresco con *Lipo P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

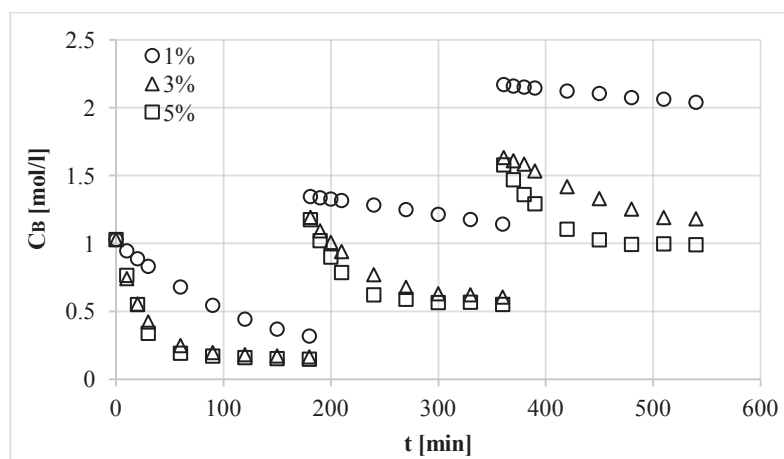


Fig. 3.13 - Andamento dell'etanolo nella transesterificazione di olio fresco con *Lipo P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

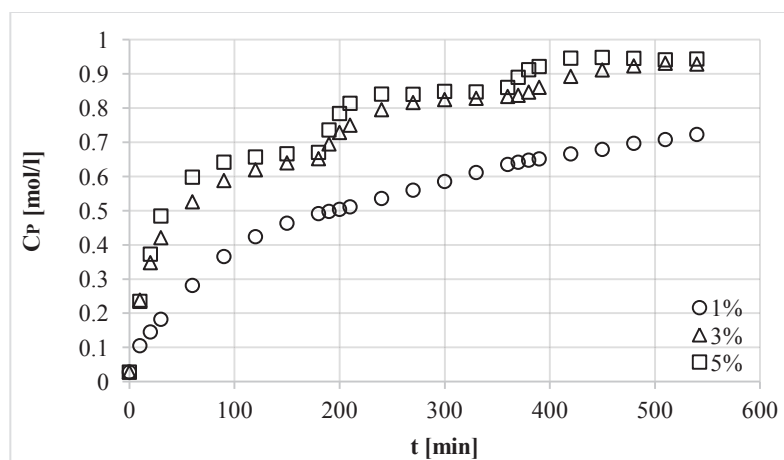


Fig. 3.14 - Andamento di monogliceridi+digliceridi+glicerolo nella transesterificazione di olio fresco con *Lipo P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

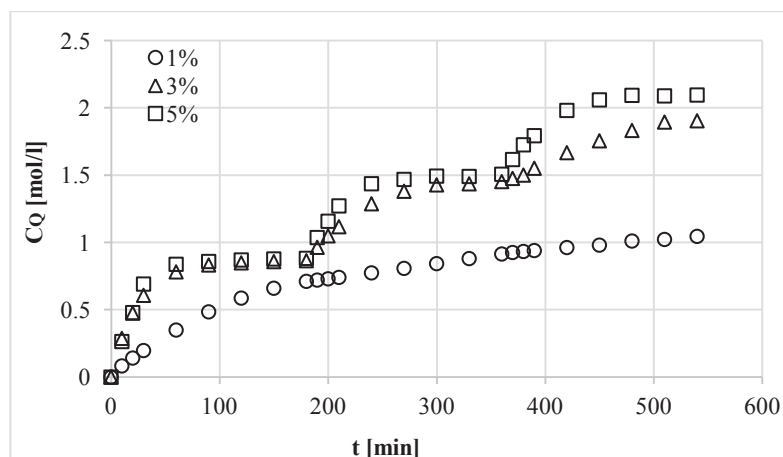


Fig. 3.15 - Andamento degli esteri nella transesterificazione di olio fresco con *Lipo P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

3.3.5 Risultati e discussione – Prove con *Epobond P. cepacia*

Le prove di transesterificazione di olio fresco catalizzata da *Epobond P. cepacia* sono state condotte con tre diverse concentrazioni di biocatalizzatore (1%, 3%, 5%) e riutilizzando il biocatalizzatore al 3% per 6 cicli di reazione consecutivi dopo il primo. Si ribadisce che tra un ciclo di reazione è quello successivo il biocatalizzatore è stato lavato con esano.

Nelle seguenti Figure 3.16-3.19 sono riportati i profili delle concentrazioni di reagenti e prodotti nelle prove di reazione condotte con le tre diverse concentrazioni di biocatalizzatore (1%, 3%, 5%) in tre step da 180 minuti ciascuno, per un tempo di reazione totale di 540 minuti. Così come era stato visto con la *Lipo P. cepacia* (Figure 3.12-3.15), anche con la *Epobond P. cepacia* si osserva che un aumento della concentrazione di biocatalizzatore dall'1% al 3% porta a un significativo aumento della concentrazione degli esteri (che passa da 0.8 mol/l a quasi 1.4 mol/l), mentre un ulteriore aumento dal 3% al 5% non porta a miglioramenti significativi della concentrazione di esteri e quindi della conversione di trigliceridi nel prodotto desiderato.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

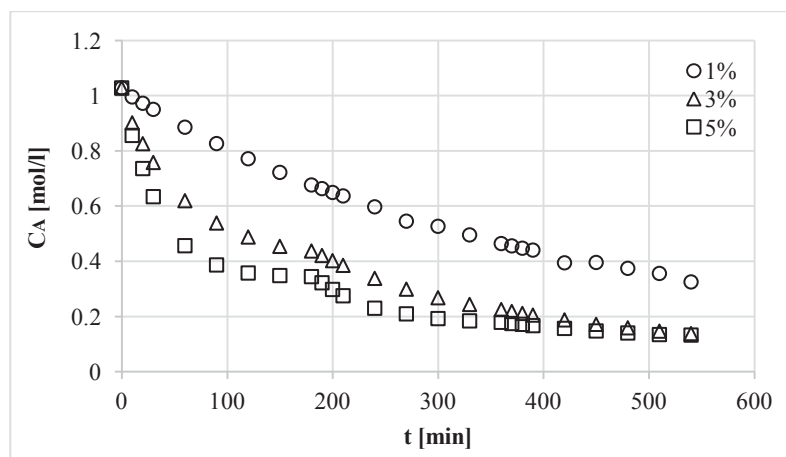


Fig. 3.16 - Andamento dei trigliceridi nella transesterificazione di olio fresco con *Epobond P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

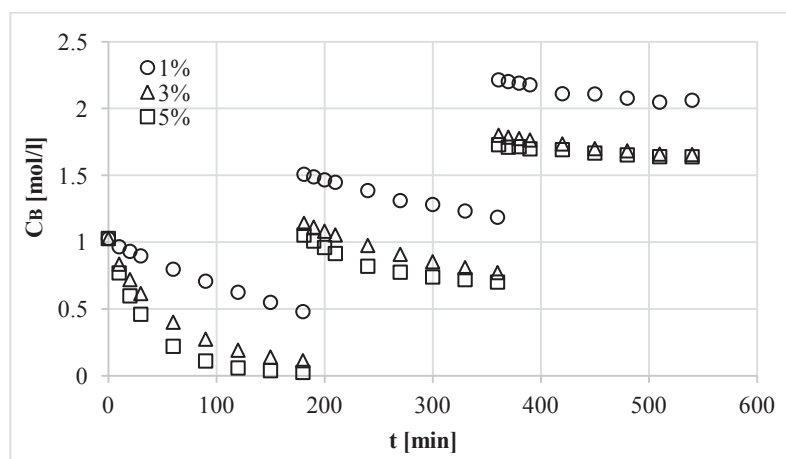


Fig. 3.17 - Andamento dell'etanolo nella transesterificazione di olio fresco con *Epobond P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

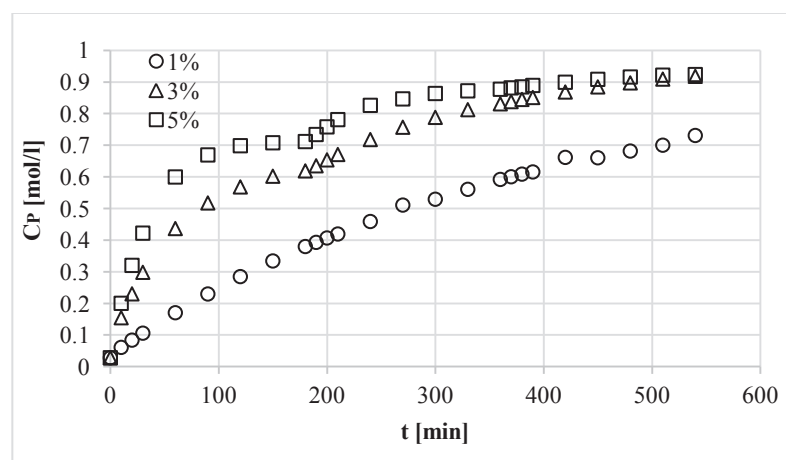


Fig. 3.18 - Andamento di monogliceridi+digliceridi+glicerolo nella transesterificazione di olio fresco con *Epobond P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

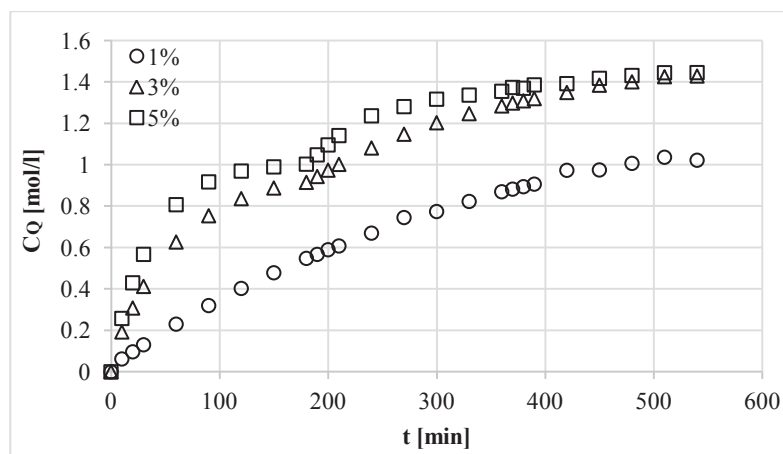


Fig. 3.19 - Andamento degli esteri nella transesterificazione di olio fresco con *Epobond P. cepacia* a diverse concentrazioni, nella reazione condotta in step da 180 minuti ciascuno.

Le evoluzioni temporali delle concentrazioni dei trigliceridi e degli esteri nella transesterificazione di olio fresco con biocatalizzatore al 3% sono riportate nelle Figure 3.20-3.21, nelle quali si ha un confronto tra le performances del biocatalizzatore riutilizzato più volte. In Figura 3.22 è, invece, mostrata la conversione dei trigliceridi in esteri nelle reazioni con i riutilizzi del biocatalizzatore. Infine, le conversioni finali in ogni ciclo di reazione sono evidenziate in Figura 3.23.

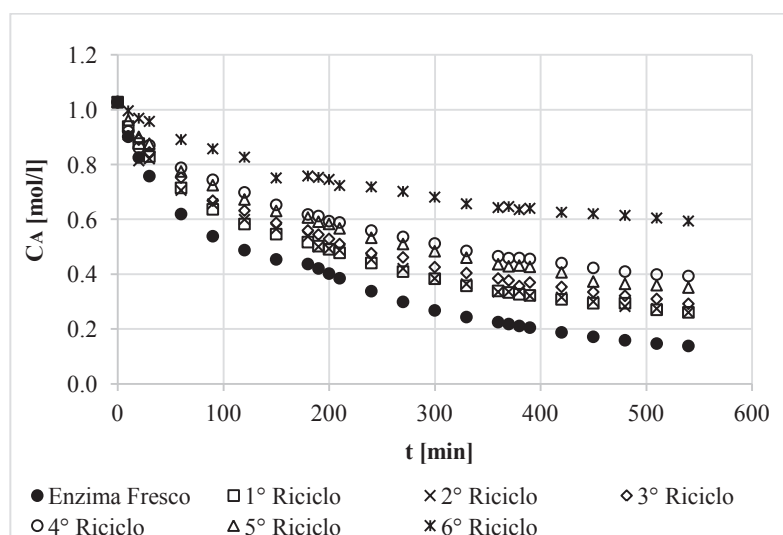


Fig. 3.20 - Andamento dei trigliceridi con *Epobond P. cepacia* riutilizzato, a partire da olio fresco.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

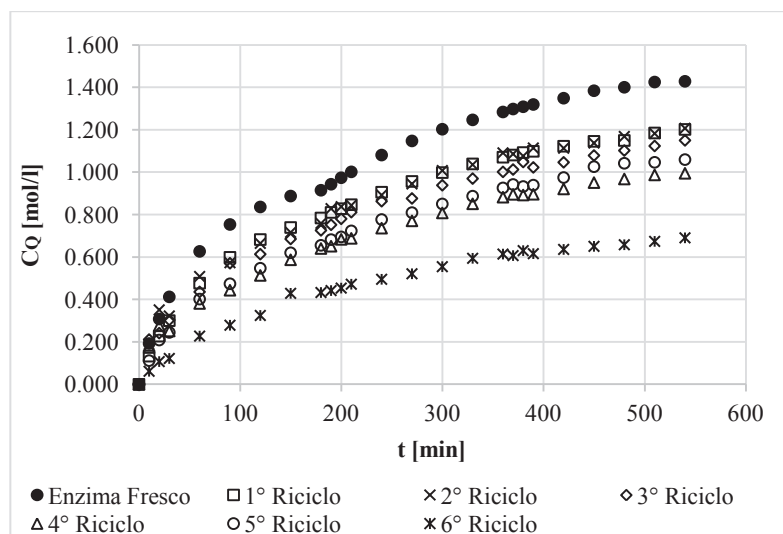


Fig. 3.21 - Andamento degli esteri con *Epobond P. cepacia* riutilizzato, a partire da olio fresco.

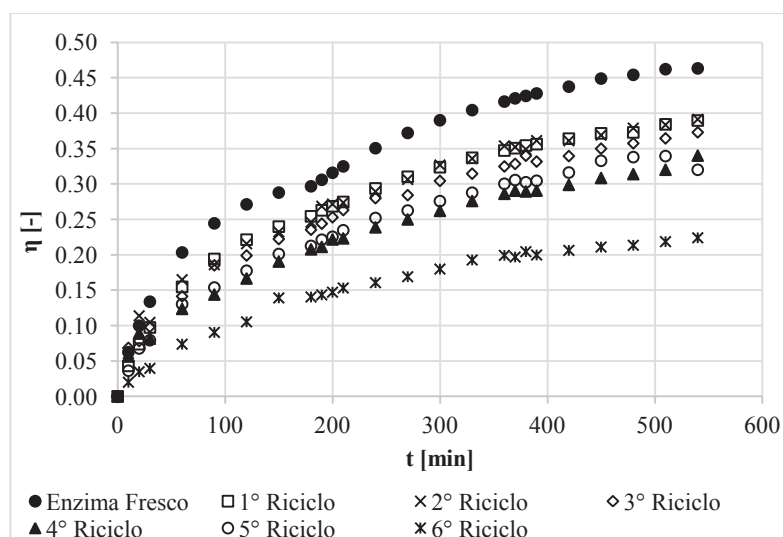


Fig. 3.22 - Andamento della conversione in esteri con *Epobond P. cepacia* riutilizzato.

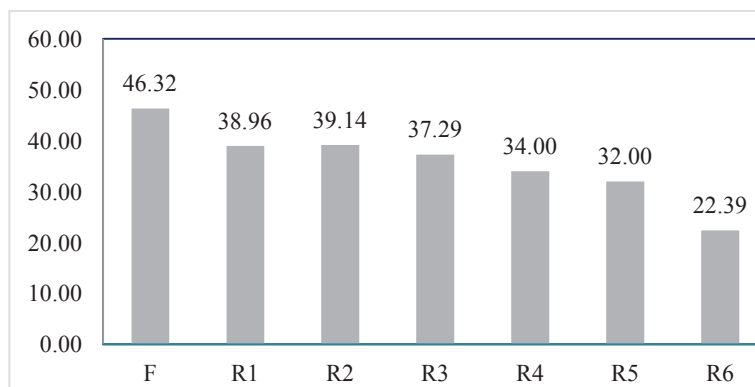


Figura 3.23 . Conversioni % finali in esteri nelle reazioni con i diversi riutilizzi dell'*Epobond P. cepacia*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

Come visibile dai grafici riportati, il riutilizzo del biocatalizzatore porta a una diminuzione della conversione in esteri. La diminuzione dell'attività dell'*Epobond P. cepacia* può essere sostanzialmente dovuta a quattro fattori:

- azione dell'esano durante la fase di lavaggio e l'asciugamento;
- tempo e completamento della reazione;
- inibizione da etanolo;
- perdita fisica dell'enzima durante il lavaggio.

3.4 Studio sperimentale della transesterificazione enzimatica di un olio vegetale “esausto” mediante il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia*

3.4.1 Obiettivi e piano sperimentale

Al fine di valutare la performance del biocatalizzatore su olio esausto, sono stati usati due diversi substrati:

- *olio esausto 1*, ottenuto friggendo delle patate fresche in olio FRIOL a 190°C, in un'apposita friggitrice, per 30 minuti; in tal modo si è cercato di simulare un olio vegetale esausto di uso domestico;
- *olio esausto 2*, ottenuto riscaldando l'“olio esausto 1” in forno a 250°C per due ore, cercando così di simulare il comportamento di un olio esausto da ristorante. Si è ritenuto, infatti, che l'esposizione a temperature così elevate prossime alla temperatura di fumo dell'olio possano indurre le stesse alterazioni dovute all'uso prolungato e ripetuto degli oli nei ristoranti e nelle catene di fast-food.

L'insieme delle prove eseguite a partire dall'olio esausto con il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia* sono riportate nella seguente Tabella 3.9:

Tab. 3.9 - Condizioni iniziali e operative delle diverse prove condotte a partire da olio fresco con il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia*.

PROVA	ENZIMA	OLIO	ENZIMA/OLIO [w/w]
10	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Esausto 1	1%
11	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Esausto 1	3%
12	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Esausto 1	5%
13	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Esausto 2	1%
14	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Esausto 2	3%
15	<i>Epobond P. Cepacia</i>	Esausto 2	5%

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

3.4.2 Conduzione delle prove

Analogamente a quanto fatto con l'olio fresco (paragrafo 3.3), alla miscela olio-catalizzatore, una volta raggiunta la temperatura di 37 °C, viene aggiunto un terzo della quantità di etanolo previsto dal bilancio di materia. Si è, infatti, deciso di lavorare anche con l'olio esausto alimentando in tre step consecutivi l'etanolo stechiometrico per scongiurare la disattivazione dell'enzima. Di conseguenza, all'inizio di ciascuno step di durata pari a 180 minuti, è iniettata una quantità di etanolo corrispondente a un rapporto etanolo:trigliceridi pari ad 1:1. Così facendo si è dato inizio alle reazioni di transesterificazione a 37 °C e a una velocità di agitazione nel bagno termico di 200 strokes/min. In ciascuno step sono stati condotti prelievi, da 200 µl ciascuno, ad intervalli di tempo prestabiliti: 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuti. Il volume di 200 µl è tale da poter trascurare l'effetto della diminuzione di volume che si mantiene al di sotto del 5%.

Di seguito, si riportano i cromatogrammi relativi ai due tipi di oli esausti (Figure 3.25-3.26) confrontati con quello dell'olio fresco (Figura 3.24).

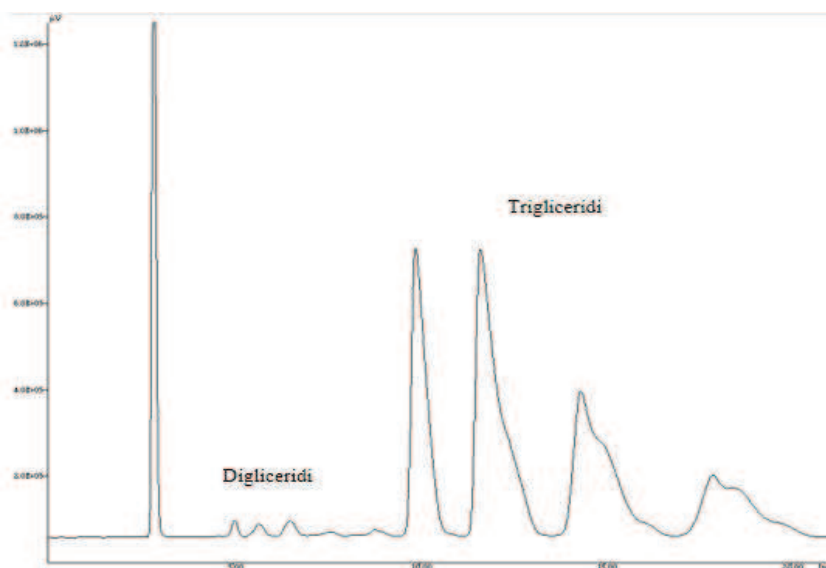


Fig. 3.24 - Cromatogramma di un campione olio fresco.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

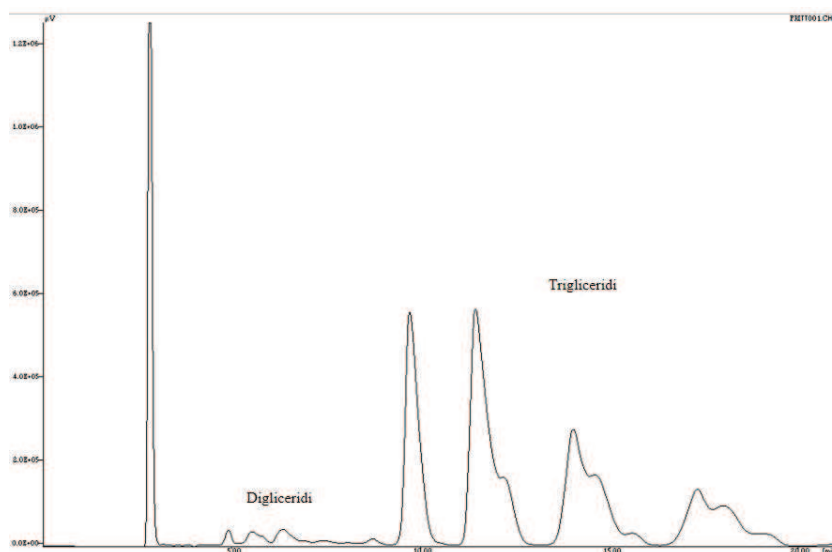


Fig. 3.25 - Cromatogramma di un campione di olio esausto 1.

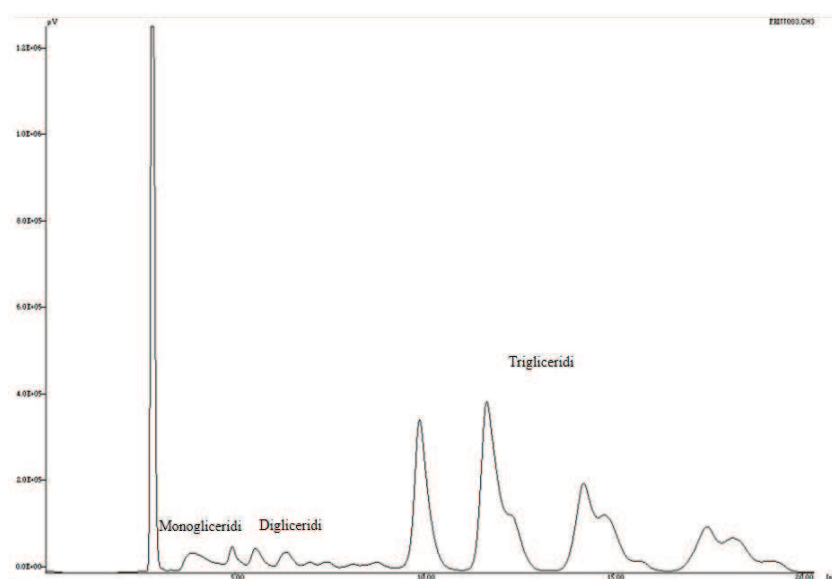


Fig. 3.26 - Cromatogramma di un campione di olio esausto 2.

Rispetto all'olio fresco, si osserva un aumento dei digliceridi e la formazione di esteri e di monogliceridi, in modo ancora più marcato nell'olio esausto 2.

3.4.3 Risultati e discussione – Prove con *Epobond P. cepacia*

La rielaborazione dei dati nel caso di transesterificazione di oli esausti è del tutto analoga a quella descritta nel paragrafo 3.3.3.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

Nelle Figure 3.27-3.32 sono riportati i risultati ottenuti transesterificando l'“olio esausto 1”. In particolare nelle Figure 3.27-3.30 vengono messi a confronto gli andamenti temporali delle concentrazioni dei reagenti e dei prodotti, mentre nella Figura 3.31 è riportato l'andamento temporale della conversione in esteri. Infine, nella Figura 3.32 si confrontano, sotto forma di istogramma, le conversioni finali ottenute in ciascuno step.

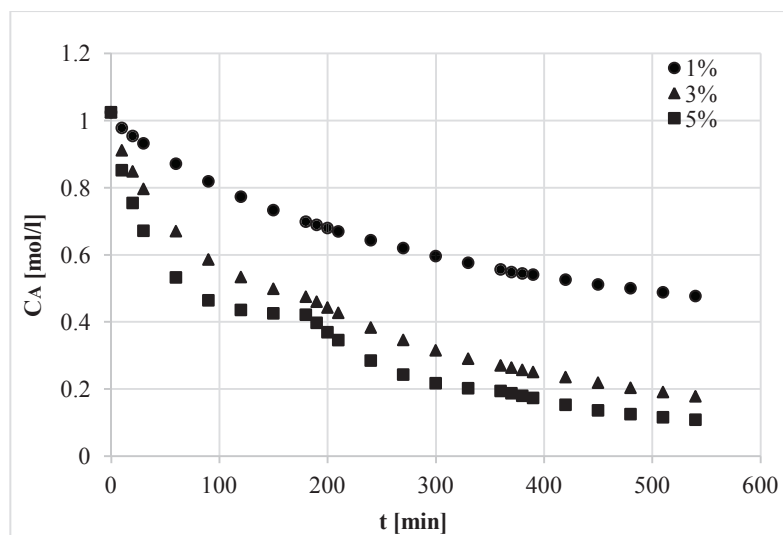


Fig. 3.27 - Evoluzione temporale dei trigliceridi in funzione della quantità di enzima.

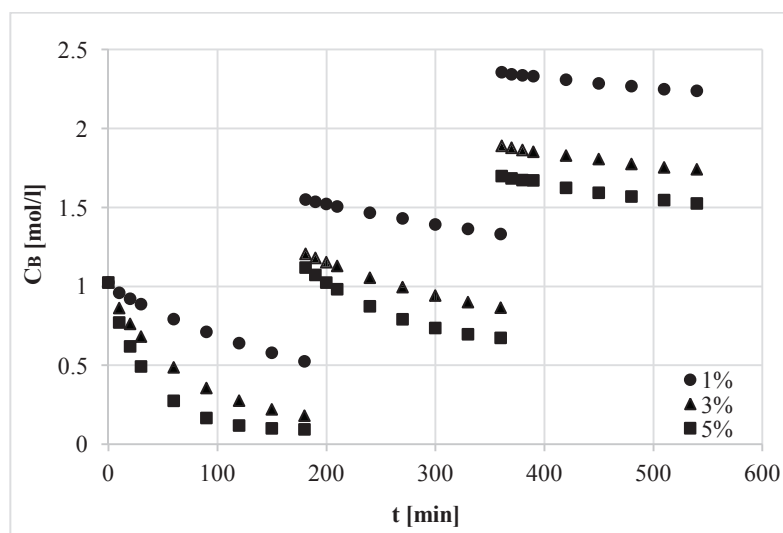


Fig. 3.28 - Evoluzione temporale dell'etanolo in funzione della quantità di biocatalizzatore.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

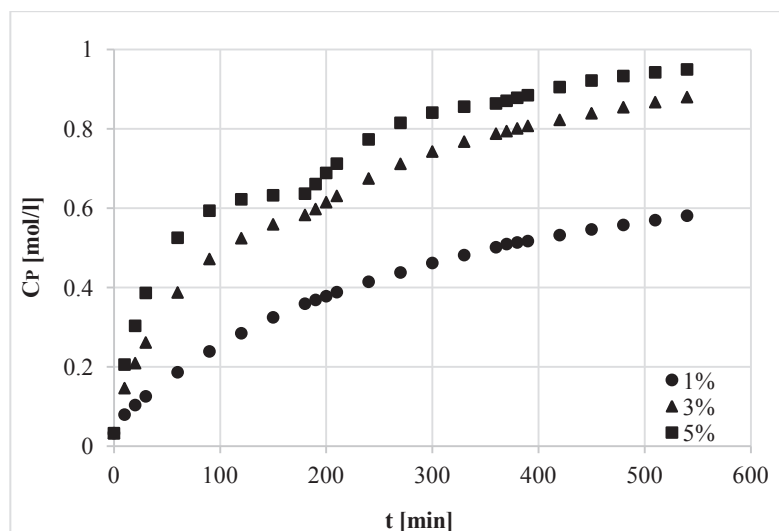


Fig. 3.29 - Evoluzione temporale di monogliceridi+digliceridi+trigliceridi in funzione della quantità di biocatalizzatore.

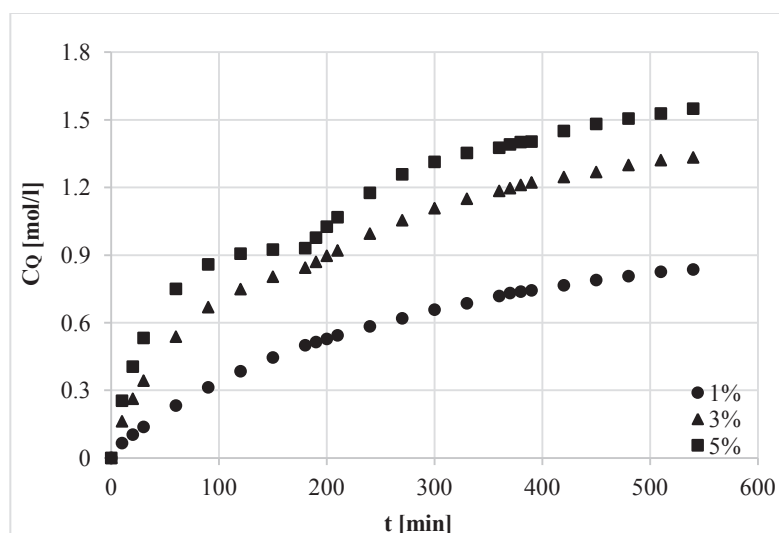


Fig. 3.30 - Evoluzione temporale degli esteri in funzione della quantità di biocatalizzatore.

Dai risultati sopra riportati, si evince una netta differenza tra gli andamenti ottenuti al variare del rapporto enzima/olio. Nello specifico, quando tale parametro è pari all'1% la reazione procede molto lentamente rispetto agli altri due casi: dopo le nove ore di reazione, infatti, la concentrazione degli esteri nella miscela reagente è pari all'incirca a metà della concentrazione ottenuta lavorando al 5%.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

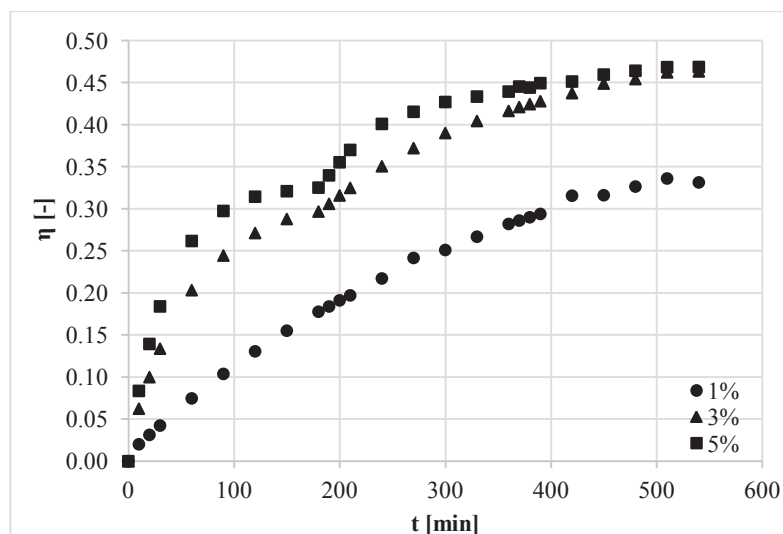


Fig. 3.31 - Conversione in esteri in funzione della quantità di biocatalizzatore.

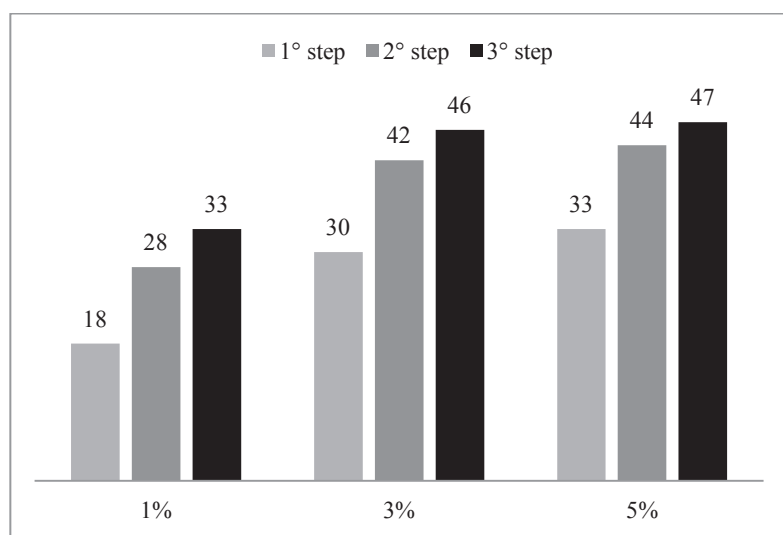


Fig. 3.32 - Confronto delle conversioni % in esteri alla fine di ogni step in funzione della quantità di biocatalizzatore.

La conversione finale in esteri risulta quasi pari al 50% utilizzando il biocatalizzatore al 3% o al 5%, mentre raggiunge al massimo il 35% con l'1% di biocatalizzatore. Per questo motivo si ritiene non accettabile lavorare con quest'ultima concentrazione e, infatti, non verrà presa in considerazione il caso delle prove all'1% nella costruzione del modello cinetico. Per quanto riguarda, invece, le prove al 3 ed al 5% si riscontrano andamenti molto simili tra di loro. Nel caso del 5% si ha che la maggiore quantità di enzima si traduce, come ci si aspetta, in

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

maggiori concentrazioni dei prodotti e minori concentrazioni dei reagenti durante lo svolgersi della reazione rispetto alla prova al 3%.

3.4.4 Confronto tra le prestazioni di Lipo *P. cepacia* ed Epobond *P. cepacia* nelle reazioni di transesterificazione dell'olio fresco

Per la conduzione di tutte le prove si è scelto un enzima immobilizzato, dal momento che in letteratura (Hsu et al., 2001; Hsu et al., 2002) viene più volte evidenziato come l'immobilizzazione sia la migliore tecnica per aumentare la stabilità del catalizzatore, favorendo la possibilità di un eventuale riciclo. In questo lavoro sono stati usati due tipi diversi di immobilizzazione della stessa lipasi: l'adsorbimento su resina polistirenica (*Lipo P. cepacia*) e l'instaurarsi di un legame covalente su una resina epossidica-acrilica (*Epobond P. cepacia*).

Confrontando i risultati ottenuti dalla transesterificazione di olio fresco con il 5% di biocatalizzatore nei due casi, si ottiene l'evoluzione temporale delle concentrazioni delle specie coinvolte nella reazione mostrata nelle Figure 3.33-3.35. Nelle Figure 3.36-3.37 sono riportati, invece, gli andamenti delle conversioni in esteri con i due biocatalizzatori. Nonostante l'enzima sia lo stesso (*Pseudomonas cepacia*), la lipasi *Lipo P. cepacia* mostra una maggiore attività catalitica, considerando solo il prodotto di interesse, ovvero gli esteri, rispetto all'*Epobond P. cepacia*.

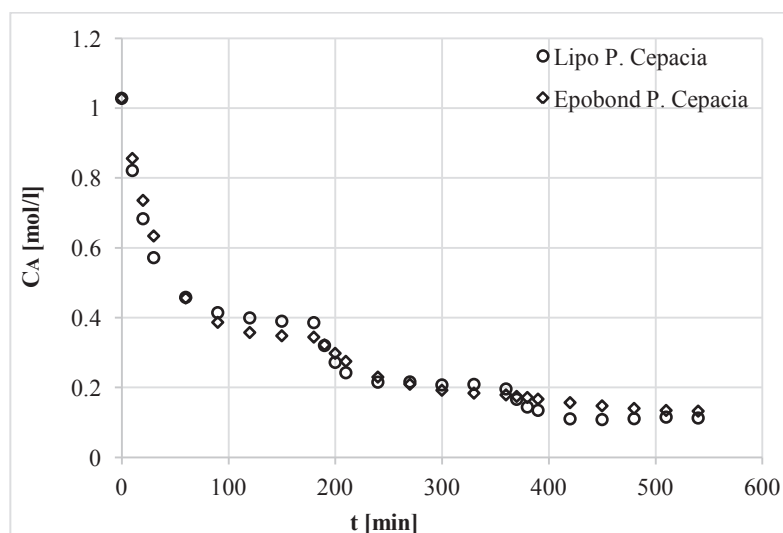


Fig. 3.33 - Confronto degli andamenti dei trigliceridi ottenuti con i due diversi biocatalizzatori (al 5%) nella reazione di transesterificazione dell'olio fresco condotta in tre step per 5 ore.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

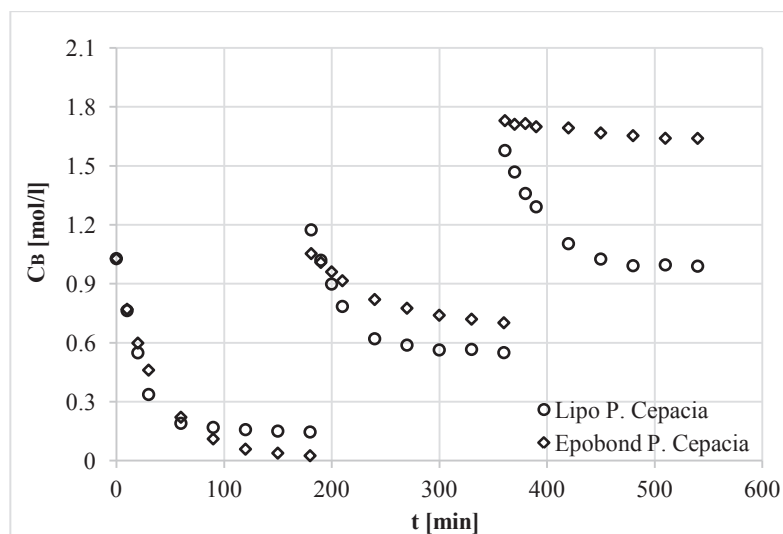


Fig. 3.34 - Confronto degli andamenti dell'etanolo ottenuti con i due diversi biocatalizzatori (al 5%) nella reazione di transesterificazione dell'olio fresco condotta in tre step per 5 ore.

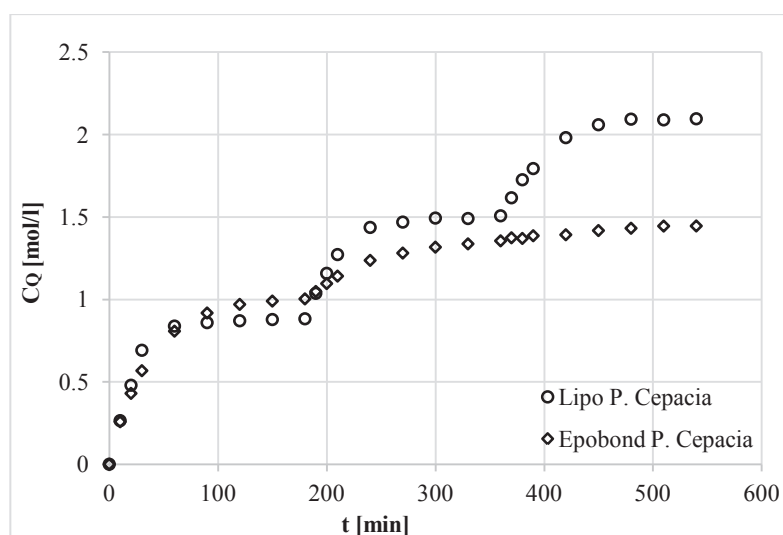


Fig. 3.35 - Confronto degli andamenti degli esteri ottenuti con i due diversi biocatalizzatori (al 5%) nella reazione di transesterificazione dell'olio fresco condotta in tre step per 5 ore.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

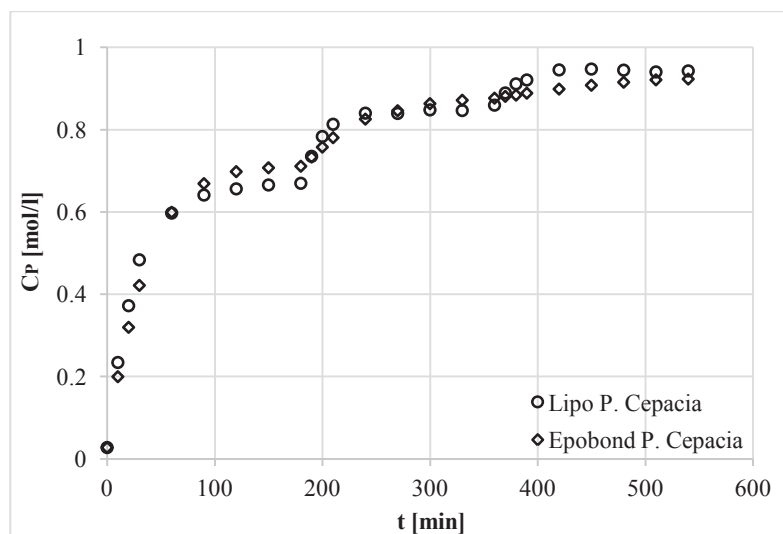


Fig. 3.36 - Confronto degli andamenti dei monogliceridi+digliceridi+glicerolo ottenuti con i due diversi biocatalizzatori (al 5%) nella reazione di transesterificazione dell'olio fresco condotta in tre step per 5 ore.

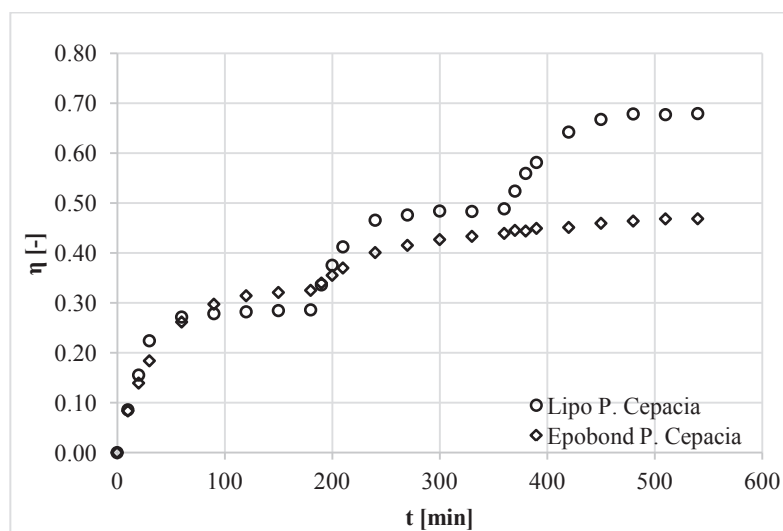


Fig. 3.37 - Confronto degli andamenti della conversione in esteri ottenuti con i due diversi biocatalizzatori (al 5%) nella reazione di transesterificazione dell'olio fresco condotta in tre step per 9 ore.

Dai grafici riportati emerge che le differenze fra le due lipasi sono evidenti negli andamenti degli esteri e dell'etanolo, mentre gli andamenti dei trigliceridi e del prodotto P (monogliceridi+digliceridi+glicerolo) sono quasi coincidenti nei due casi. Da ciò si deduce che i biocatalizzatori considerati mostrano un differente comportamento catalitico verso le singole reazioni di interesse. L'*Epobond P. cepacia*, infatti, non riesce a catalizzare, con la stessa attività dell'altro enzima, gli step di reazione successivi al primo, ovvero quelli che vedono digliceridi e monogliceridi come reagenti, con conseguente conversione alla fine del

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

Capitolo 3 – Studio sperimentale sulla produzione di biodiesel catalizzata da lipasi immobilizzata

terzo step pari al 47%, decisamente minore della conversione del 68% raggiunta con la *Lipo P. Cepacia*.

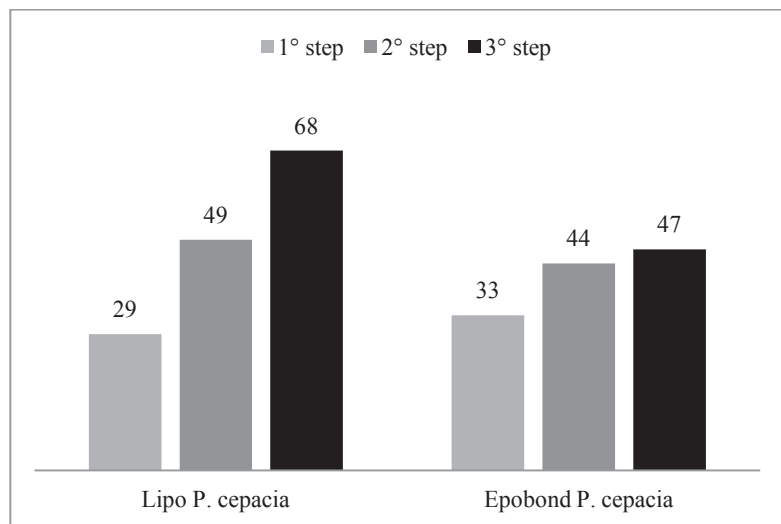


Fig. 3.26 - Conversioni % in esteri a fine step ottenute con i due diversi biocatalizzatori (al 5%) nella transesterificazione dell'olio fresco condotta in tre step per 9 ore.

Valutata la stabilità e l'attività del biocatalizzatore in diverse condizioni operative, si può in seguito pensare di applicare lo stesso protocollo sperimentale agli oli estratti dalle microalghe, al fine di valutare l'efficienza e la convenienza tecnico-economica di portare avanti una transesterificazione a biodiesel per via enzimatica.

Capitolo 4

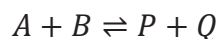
Elaborazione del modello cinetico

I dati sperimentali raccolti nelle varie prove hanno permesso di evidenziare, nel capitolo precedente, gli aspetti qualitativi ed alcuni aspetti quantitativi della reazione di transesterificazione. Per poter utilizzare tali dati per scopi progettuali o almeno di previsione, però, bisogna andare oltre, rielaborandoli e cercando di risalire alle cause che li hanno prodotti. Si è cercato, quindi, di condurre uno studio sull'attività e sulla stabilità del catalizzatore da affiancare alla validazione del modello cinetico che meglio descrive la reazione in esame.

In letteratura si trovano diverse interpretazioni della cinetica della transesterificazione per mezzo di lipasi immobilizzate. Tali studi riguardano, però, la transesterificazione dei trigliceridi da oli vegetali freschi e non da esausti, ma ciò potrebbe non essere una problematica, qualora le modifiche strutturali subite dall'olio durante l'uso non siano tali da influenzare il meccanismo di reazione. La maggior parte dei lavori presenti in letteratura mostra che la cinetica della reazione di transesterificazione enzimatica di oli vegetali può essere ben rappresentata mediante il meccanismo *Ping Pong bi bi* (Marchetti et al., 2007; Al-Zuhair et al., 2009; Calabrò et al., 2009), per il quale è stata anche considerata la possibile inibizione legata all'etanolo (Calabrò et al., 2009). Tuttavia, non mancano modelli molto più semplici, come meccanismi macroscopici del primo e del secondo ordine.

4.1 Meccanismo di pseudo-primo ordine

De Paola et al. (2009) proposero, sulla base dell'analisi dei risultati sperimentali, una cinetica di pseudo-primo ordine per la trans-esterificazione dei trigliceridi con etanolo, utilizzando *Lipozyme* come catalizzatore in presenza di esano. La reazione di interesse può essere schematizzata come:



in cui si è indicato con A i trigliceridi, con B l'alcol, con Q gli esteri e con P la somma di digliceridi, monogliceridi e glicerolo.

L'andamento temporale dei trigliceridi nel tempo può essere ben approssimato da una funzione esponenziale decrescente:

$$C_A(t) = a + be^{-kt}$$

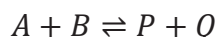
da cui è facilmente ricavabile l'espressione della velocità di reazione, intesa come velocità di scomparsa dei trigliceridi (Equazione 4.1):

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kbe^{-kt} = Ke^{-kt} \quad \text{con } K = kb \quad (4.1)$$

che è equivalente a quella che si otterrebbe ipotizzando una cinetica del primo ordine. Nello specifico, però, si parla di pseudo-primo ordine a causa dell'ipotesi di considerare i trigliceridi come unico substrato principale. Il modello, così ottenuto, è un modello a due parametri.

4.2 Meccanismo del secondo ordine reversibile

Peter e Preda (2002) impiegarono un modello a due substrati per caratterizzare la lipasi *Hog pancreas*, secondo un meccanismo del secondo ordine reversibile. Partendo dalla reazione in esame:



si determina l'equazione cinetica (Equazione 4.2):

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = (k_1C_AC_B - k_{-1}C_PC_Q) [E_0] \quad (4.2)$$

Anche questo modello risulta essere a due parametri.

4.3 Meccanismo di reazione *Ping Pong bi bi*

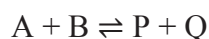
A seconda del numero di substrati coinvolti, di prodotti ottenuti, dell'ordine in cui substrati e prodotti si legano e si liberano dall'enzima, la cinetica della reazione può essere spiegata mediante diversi meccanismi (*Bisswanger, 2002*). Nel caso in cui sono coinvolti più substrati i meccanismi di reazione possono essere suddivisi in due categorie:

- PING PONG: meccanismo caratterizzato dalla dissociazione di uno o più prodotti dall'enzima prima che tutti i substrati si siano legati ad esso;

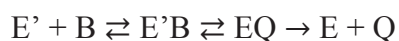
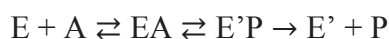
Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

- SEQUENZIALI: tutti i substrati si legano all'enzima prima che si formino i prodotti e possono a loro volta essere di due tipi:
 - *ordinati*: i substrati si legano in ordine preciso di attacco e distacco dall'enzima;
 - *casuali*: si hanno, invece, sequenze casuali di azione.

Nel meccanismo *Ping Pong bi bi* o *a doppio spostamento* le reazioni che coinvolgono due substrati sono quasi sempre reazioni di trasferimento, e in questo specifico caso si tratta di doppio trasferimento. Una generica reazione con due substrati e dalla quale si ottengono due prodotti può essere così indicata:



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



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:



equivalenti allo schema mostrato in Figura 4.1:

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

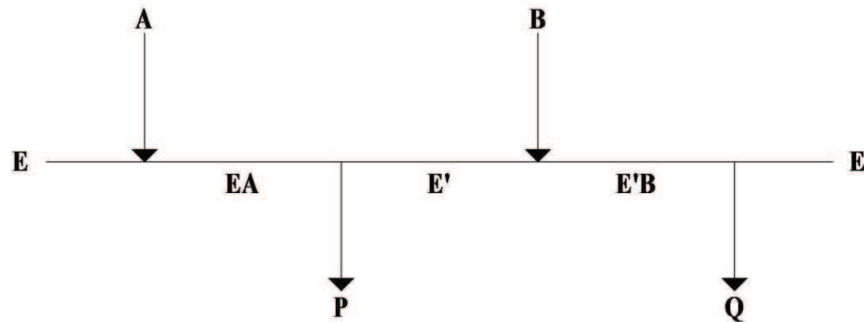
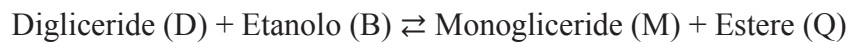
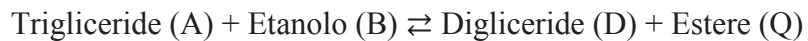


Fig. 4.1 - Meccanismo *Ping Pong bi bi* per un sistema di reazione con due substrati e due prodotti.

Nella transesterificazione di olio commerciale FRIOL con etanolo si hanno tre reazioni reversibili in serie – parallelo:



I due substrati principali sono i trigliceridi (A) e l'etanolo (B), dal momento che la quantità di digliceridi presente inizialmente e che partecipa alla reazione è bassa rispetto a quella dei trigliceridi.

Il meccanismo ipotizzato è riportato in Figura 4.2 (Calabrò et al., 2009):

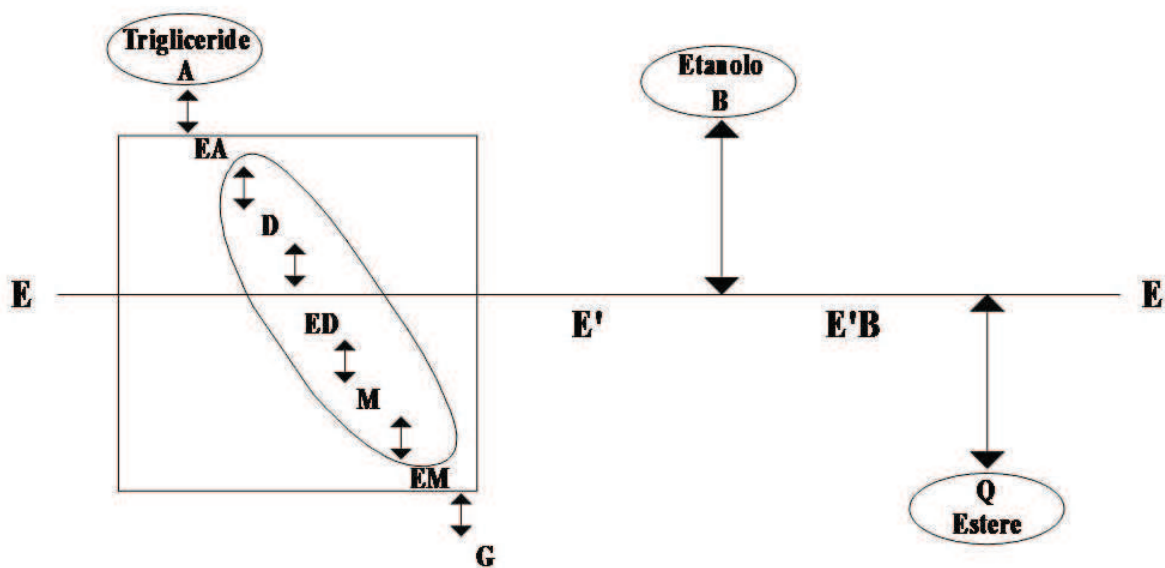


Fig. 4.2 - Meccanismo *Ping Pong bi bi* per la transesterificazione enzimatica dei trigliceridi con l'etanolo.

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*. La forma *E'* ottenuta in questa fase reagisce con l'etanolo *B* per formare il complesso *E'B*, il quale rilascia l'estere *Q* e restituisce l'enzima *E*.

Il meccanismo mostrato in Figura 4.2 può essere semplificato considerando due substrati (i trigliceridi **A** e l'etanolo **B**) e due prodotti (gli esteri **Q** e tutte le altre specie digliceridi + monogliceridi + glicerolo **P**), secondo il meccanismo *Ping Pong bi bi* in Figura 4.3.

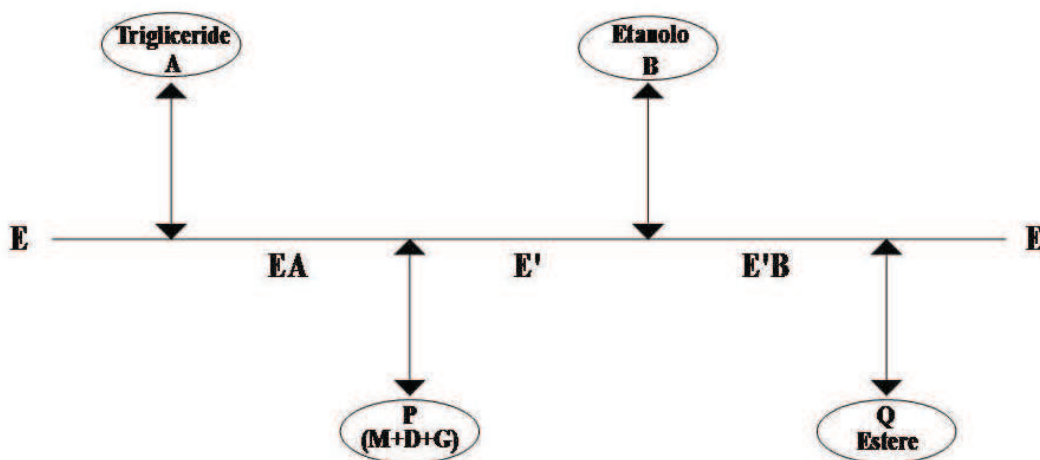


Fig. 4.3 - Meccanismo *Ping Pong bi bi* per la transesterificazione enzimatica dei trigliceridi con etanolo, assumendo una reazione con due substrati e due prodotti.

4.4 Metodo di King-Altman

Per derivare l'equazione cinetica ci si avvale del metodo di King – Altman (*King & Altman, 1956*), in cui si ipotizza che i vari intermedi di reazione in cui è legato l'enzima siano allo stato stazionario, ovvero in equilibrio dinamico, e si valuta la velocità dallo stadio in cui è presente il composto d'interesse. Gli *steps* per derivare l'equazione cinetica possono essere così riassunti:

1. ottenimento dell'equazione per le varie specie di enzimi, incontrate in uno specifico meccanismo, in termini di costanti di velocità e concentrazioni di substrato;
2. sostituzione di queste relazioni nell'equazione di velocità;
3. combinazione di questi termini in modo appropriato e riduzione dell'equazione di velocità alla forma presentata nell'Equazione 4.3.

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{num_1 \cdot [A][B] \dots - num_2 \cdot [P][Q]}{K + K_A[A] + K_B[B] \dots + K_{AB}[A][B] \dots + K_P[P] + K_Q[Q] \dots + K_{PQ}[P][Q]} \quad (4.3)$$

in cui i termini tra parentesi quadre rappresentano le concentrazioni delle varie specie.

Dal momento che si intende considerare l'effetto inibitorio sulla velocità di reazione dovuto all'etanolo (Calabrò et al., 2009), il metodo di King – Altman, basato su un meccanismo Ping Pong Bi Bi, sarà finalizzato all'ottenimento di due diversi modelli:

- a. Modello cinetico *senza* inibizione da etanolo
- b. Modello cinetico *con* inibizione da etanolo

4.4.1. Equazione cinetica *senza* inibizione da etanolo

Si considerano le reazioni:



Lo schema del meccanismo di reazione viene rappresentato con un poligono (Figura 4.4), i cui vertici sono le varie forme in cui è combinato l'enzima e i lati rappresentano gli *steps* del meccanismo.

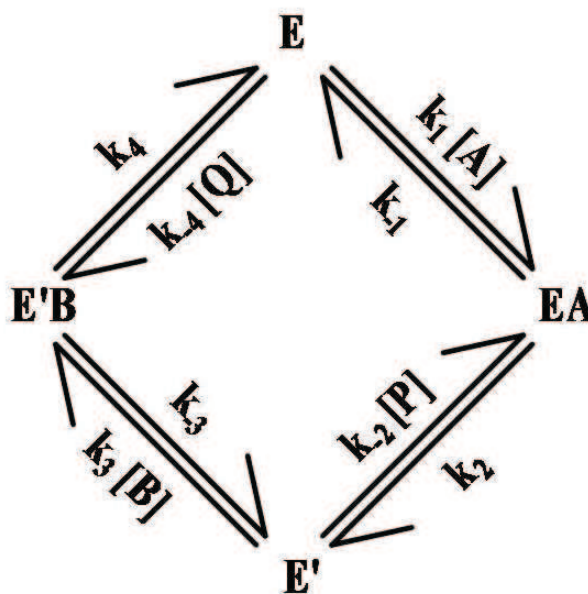


Fig. 4.4 - Poligono di King–Altman con l'indicazione delle varie forme in cui è presente l'enzima.

Tutte le reazioni sono assunte del primo ordine. Partendo dal poligono mostrato in Figura 4.4, si considera la forma geometrica della struttura principale e da questa si trovano quelle sottostrutture che comprendono solo linee della struttura principale, connettono ogni coppia delle varie forme dell'enzima e non sono chiuse. Con riferimento al poligono in Figura 4.4, si ricavano, perciò, quattro possibili schemi, riportati in Figura 4.5:

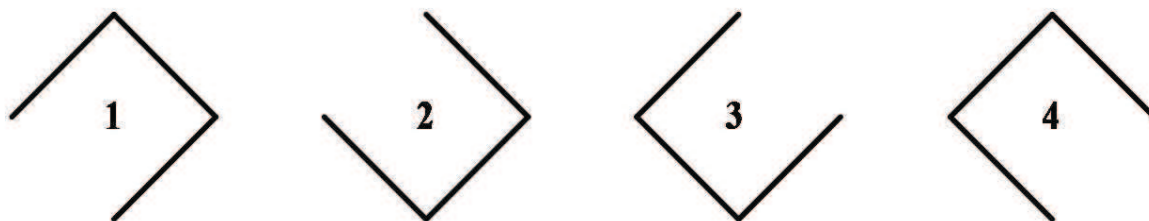


Fig. 4.5 - Possibili schemi di reazione a partire dal poligono di King-Altman.

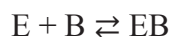
Ogni forma in cui è presente l'enzima è valutata in termini di rapporto $[E_i]/[E]_0$. Considerando la concentrazione dell'enzima costante nel tempo $[E]_0 = [E] + [EA] + [E'] + [E'B]$ e applicando il metodo di King-Altman, si giunge all'Equazione 4.4:

$$r_Q = \frac{[E]_0 \{K_1[A][B] - K_2[P][Q]\}}{K_3[A] + K_4[B] + K_5[A][B] + K_6[P] + K_7[A][P] + K_8[Q] + K_9[B][Q] + K_{10}[P][Q]} \quad (4.4)$$

in cui le costanti da K_1 a K_{10} derivano da raggruppamenti delle costanti k_1, k_2, k_3 e k_4 mostrate in Figura 4.4 $[K_1 = k_1k_2k_3k_4; K_2 = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}; K_3 = k_1k_2(k_{-3} + k_4); K_4 = k_3k_4(k_2 + k_{-1}); K_5 = k_1k_3(k_2 + k_4); K_6 = k_{-1}k_{-2}(k_{-3} + k_4); K_7 = k_{-3}k_{-4}(k_2 + k_{-1}); K_8 = k_{-2}k_{-4}(k_{-1} + k_{-3}); K_9 = k_1k_{-2}(k_4 + k_{-3}); K_{10} = k_3k_4(k_2 + k_{-1})]$.

4.4.2 Equazione cinetica con inibizione da etanolo

Considerando l'inibizione dell'etanolo, lo schema delle reazioni è il seguente:



In questo caso il poligono su cui si applica il metodo di King-Altman è riportato in Figura 4.6 con i singoli schemi riportati in Figura 4.7.

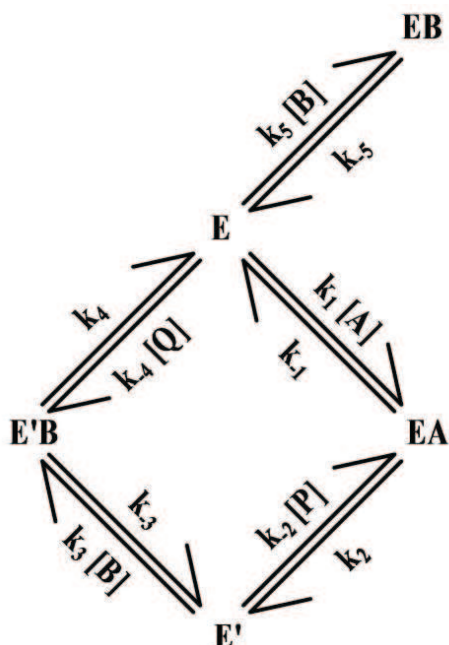


Fig. 4.6 - Poligono di King–Altman con l’indicazione delle varie forme in cui è presente l’enzima, nel caso in cui si abbia inibizione da etanolo.

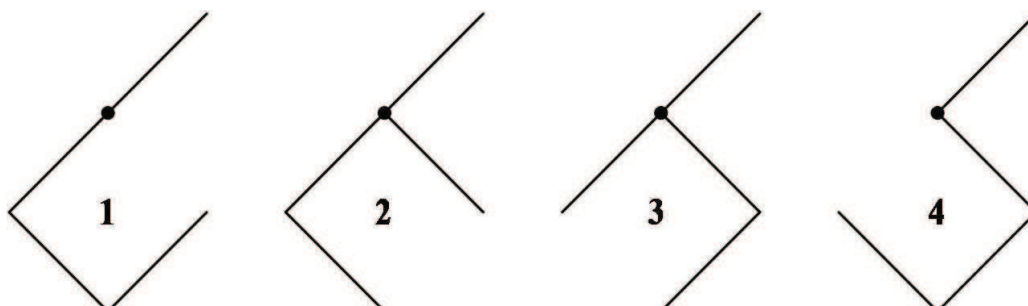


Fig. 4.7 - Possibili schemi di reazione a partire dal poligono di King-Altman con inibizione da etanolo.

In questo caso l’enzima è presente nelle forme $E, EA, E', E'B, EB$ e, applicando il metodo di King-Altman, si ottiene l’Equazione 4.5:

$$r_Q = \frac{[E]_0 \{K_1[A][B] - K_2[P][Q]\}}{K_3[A] + K_4[B] + K_5[A][B] + K_6[P] + K_7[Q] + K_8[P][Q] + K_9[A][P] + K_{10}[B][Q] + K_{11}[B]^2 + K_{12}[B][P]} \quad (4.5)$$

in cui i raggruppamenti delle costanti sono: $K_1 = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5$; $K_2 = k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} k_{-5}$; $K_3 = k_1 k_2 k_{-5} (k_4 + k_{-3})$; $K_4 = k_3 k_4 k_{-5} (k_2 + k_{-1})$; $K_5 = k_1 k_3 k_{-5} (k_2 + k_4)$; $K_6 = k_{-1} k_{-2} k_5 (k_4 + k_{-3})$; $K_7 = k_{-3} k_{-4} k_{-5} (k_2 + k_{-1})$; $K_8 = k_2 k_{-4} k_{-5} (k_{-3} + k_{-1})$; $K_9 = k_1 k_{-2} k_{-5} (k_4 + k_{-3})$; $K_{10} = k_3 k_{-4} k_{-5} (k_2 + k_{-1})$; $K_{11} = k_3 k_4 k_5 (k_2 + k_{-1})$; $K_{12} = k_{-1} k_{-2} k_5 (k_4 + k_3)$.

4.5 Analisi delle velocità di reazione e decadimento dell'attività biocatalitica

Innanzitutto, è stata analizzato l'influenza di diversi parametri sulla velocità della reazione di transesterificazione, per concludere lo studio sull'attività e sulla stabilità del biocatalizzatore. Nello specifico si analizzano due dei quattro parametri: rapporto enzima:olio e riutilizzo enzima. Non vengono, invece, trattati né la tipologia di enzima né la tipologia di olio, in quanto si può solo arrivare alle stesse conclusioni qualitative già ottenute in precedenza.

4.5.1 Effetto della concentrazione del biocatalizzatore nel sistema di reazione

Considerando le prove di transesterificazione condotte a partire da “olio esausto 1” con il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia* a tre diverse concentrazioni (1%, 3% e 5% in massa rispetto all'olio, corrispondenti a 0.623, 1.836 e 3.005 g rispettivamente). L'andamento può essere considerato in buona approssimazione lineare in tutti e tre gli step, come mostrato nelle Figure 4.8-4.10.

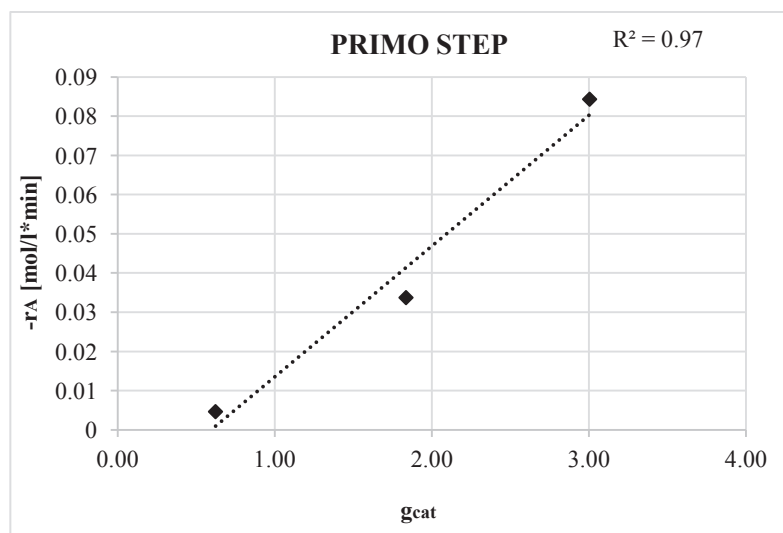


Fig. 4.8 - Legame tra velocità iniziali e quantitativo di enzima impiegato nel primo step (reazione condotta con *Epobond P. cepacia* a partire da “olio esausto 1”).

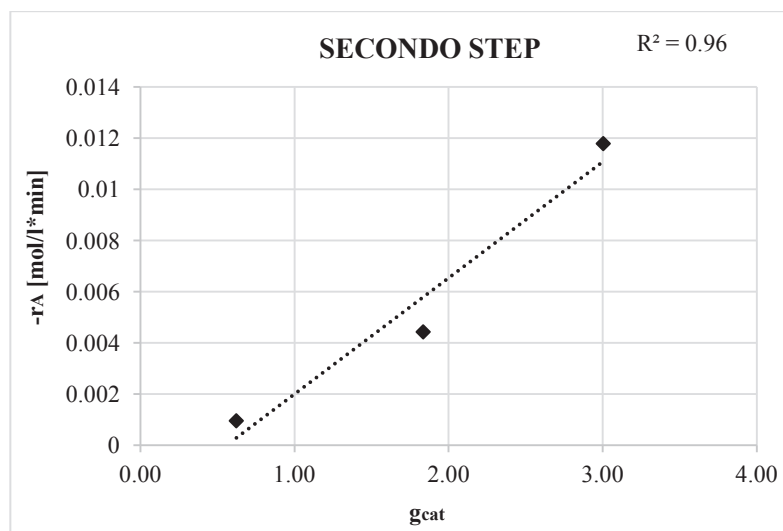


Fig. 4.9 - Legame tra velocità iniziali e quantitativo di enzima impiegato nel secondo step (reazione condotta con *Epobond P. cepacia* a partire da “olio esausto 1”).

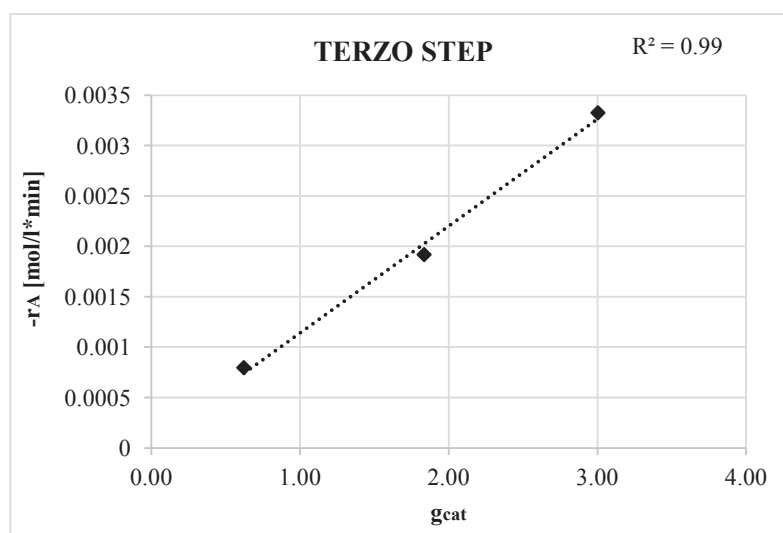


Fig. 4.10 - Legame tra velocità iniziali e quantitativo di enzima impiegato nel terzo step (reazione condotta con *Epobond P. cepacia* a partire da “olio esausto 1”).

4.5.2 Effetto del riutilizzo del biocatalizzatore *Epobond P. cepacia* in cicli di reazione consecutivi

Il biocatalizzatore *Epobond P. cepacia* è stato riutilizzato per sei volte consecutivamente, previo lavaggio con esano, in reazioni di transesterificazione di olio fresco della durata di 540 minuti ciascuna. L'andamento globale della velocità di reazione specifica in funzione della concentrazione di trigliceridi al variare del numero di riutilizzi è mostrato in Figura 4.11.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

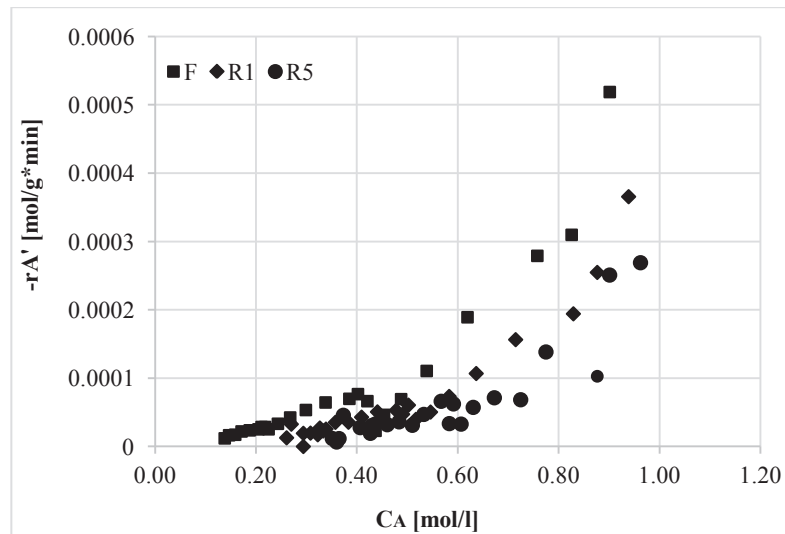
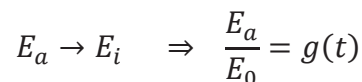


Fig. 4.11 - Andamento della velocità di reazione specifica al variare del numero di riutilizzi del biocatalizzatore *Epobond P. cepacia*.

Come prevedibile dall'analisi qualitativa effettuata nel precedente capitolo, il biocatalizzatore perde gradualmente la sua attività man mano che viene riutilizzato. Per poter descrivere tale fenomeno si ipotizza che durante il corso della reazione il catalizzatore vada incontro ad un cambiamento strutturale o chimico irreversibile che lo porti dalla sua forma attiva E_a alla forma inattiva E_i :



Si può, a questo punto, ritenere la velocità di reazione pari al prodotto di due termini, uno relativo alla concentrazioni dei vari substrati coinvolti e l'altro alla quantità di enzima attivo presente nel sistema di reazione:

$$r = f(C_A, C_B, C_Q, C_P) \cdot E_a$$

Valutando tale espressione ad inizio primo step si ha:

$$r = f(C_{A0}, C_{B0}, C_{Q0}, C_{P0}) \cdot E_a$$

Ricordando che le velocità calcolate sono pari a:

$$-r'_A = \frac{r}{E_0}$$

si possono determinare i rapporti iniziali $E_{a,i}/E_{a,0}$ tramite il rapporto delle velocità dei vari riutilizzi con quella utilizzando il catalizzatore fresco all'inizio del primo step. Si ricorda che si

può lavorare solo con le velocità di inizio primo step, poiché per i successivi, a causa del diverso avanzamento della reazione, non si hanno più le stesse condizioni iniziali. Ricordando, poi, che il catalizzatore per la prova con enzima fresco è “completamente” attivo, cioè che $E_{a,0} = E_0$ e che ciascun riutilizzo dura 9 ore si può costruire la curva riportata nella Figura 4.12.

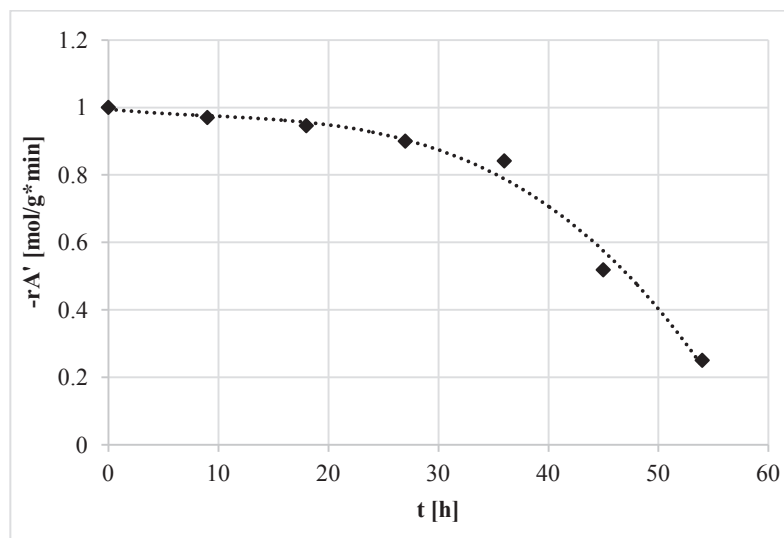


Fig. 4.12 - Decadimento dell'attività del biocatalizzatore *Epobond P. cepacia* in sette cicli di reazione consecutivi.

Dai risultati ottenuti è possibile determinare un tempo di attività catalitica totale di circa 60 ore, corrispondente a sette utilizzi del biocatalizzatore. Dopo 45 ore, ovvero dopo cinque utilizzi, però, l'attività catalizzata risulta ridotta già della metà.

Se a questo punto si “correggono” le velocità di reazione, scorporandole dal termine che tiene conto della disattivazione del catalizzatore si ottiene un ottimo risultato, come riportato nella Figura 4.13. I valori delle velocità, infatti, tendono a disporsi tutti su un'unica curva, a dimostrazione che l'ipotesi di aver considerato le velocità di reazione pari al prodotto dei due termini sia accettabile.

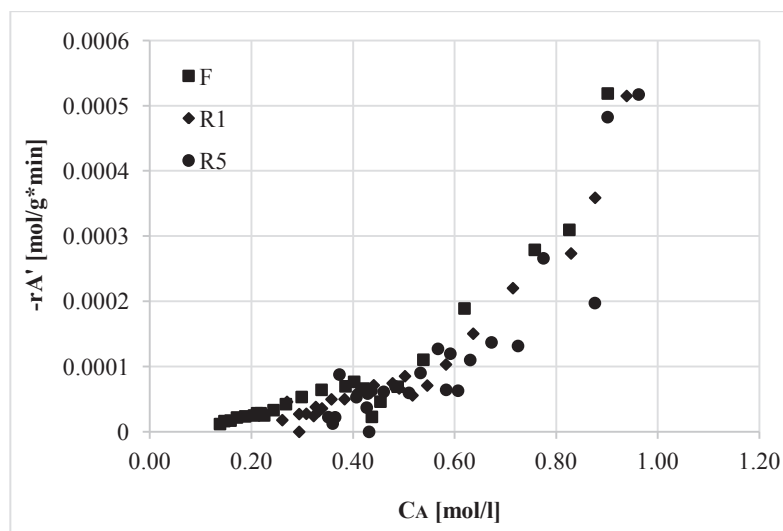


Fig. 4.13 - Andamento della velocità di reazione specifica “corretta” (senza il termine legato all’attività del biocatalizzatore) al variare del numero di riutilizzi del biocatalizzatore *Epobond P. cepacia*.

4.6 Riduzione delle variabili del modello

Le equazioni cinetiche 4.4 e 4.5 sono complete dal punto di vista delle variabili, dal momento che 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. Quindi, si procede secondo una via alternativa, valutando le possibili correlazioni tra le concentrazioni; in particolare alla concentrazione dei trigliceridi si correlano quelle degli altri composti secondo il metodo di riduzione delle variabili (*Calabrò et al., 2009*).

Attraverso la riduzione delle variabili si può esprimere la concentrazione di esteri (E), di etanolo (B) e della somma M+D+G in funzione di quella dei trigliceridi (A). A questo scopo, per ogni *step*, si considerano i dati sperimentali relative alle prove all’1%, 3% e 5% del biocatalizzatore sia *Lipo P. cepacia* che *Epobond P. cepacia*.

4.6.1 Riduzione delle variabili per le prove condotte con il biocatalizzatore *Lipo P. cepacia*

Le correlazioni dell’etanolo, degli esteri e della somma M+D+G in funzione della concentrazione dei trigliceridi nel primo step sono mostrate nelle Figure 4.14, 4.15 e 4.16.

In modo analogo si procede anche con il secondo (Figure 4.17, 4.18 e 4.19) e il terzo step (Figure 4.20, 4.21 e 4.22).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

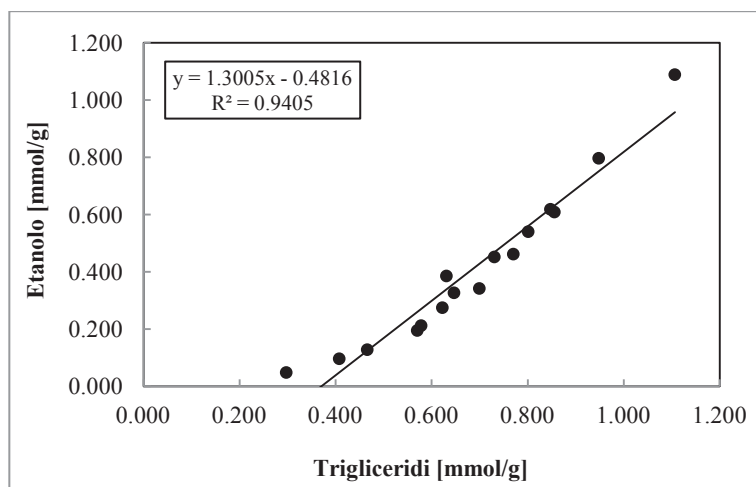


Fig. 4.14 - Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (1° step) – *Lipo P. cepacia*.

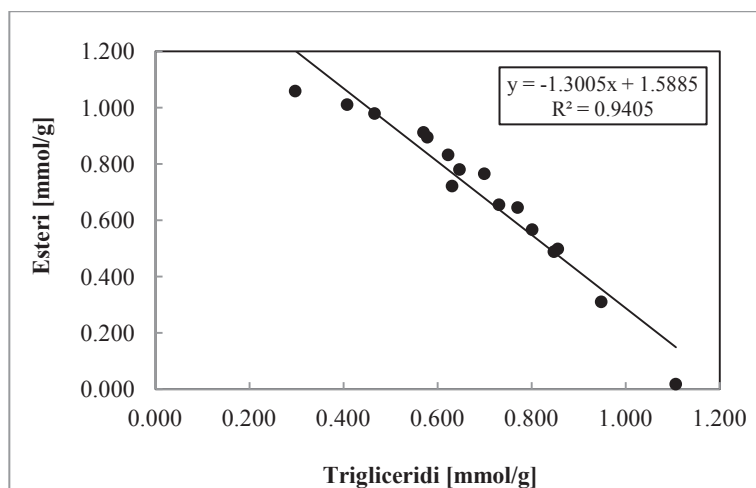


Fig. 4.15 - Correlazione degli esteri con i trigliceridi (1° step) – *Lipo P. cepacia*.

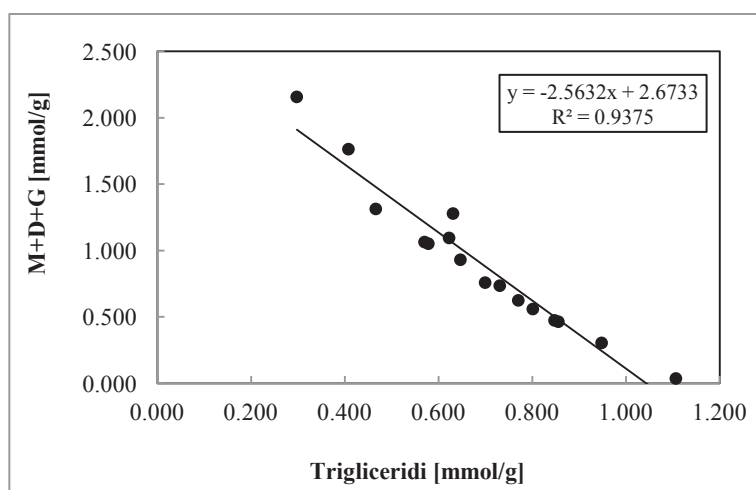


Fig. 4.16 - Correlazione dei monogliceridi+digliceridi+glicerolo con i trigliceridi (1° step) – *Lipo P. cepacia*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

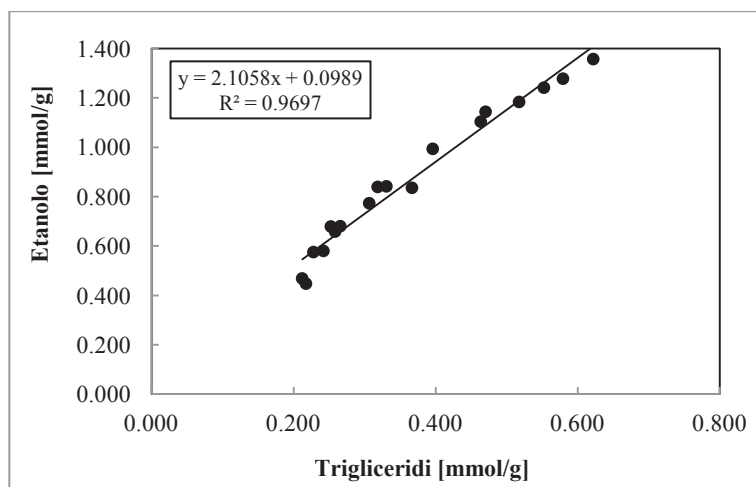


Fig. 4.17 - Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (2° step) – *Lipo P. cepacia*.

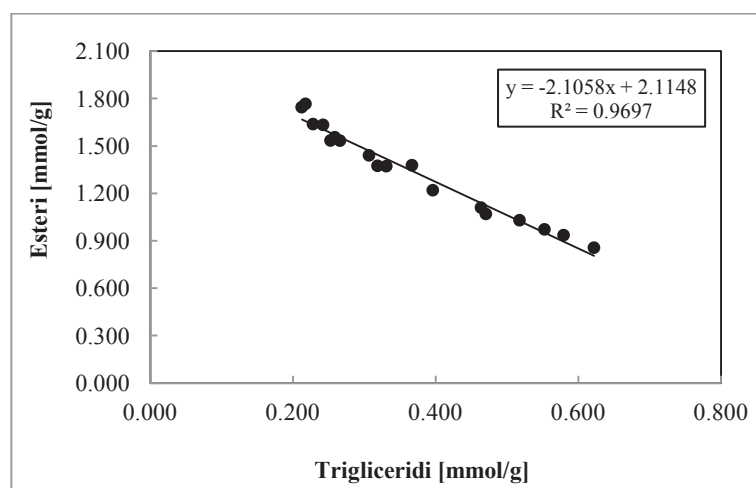


Fig. 4.18 - Correlazione degli esteri con i trigliceridi (2° step) – *Lipo P. cepacia*.

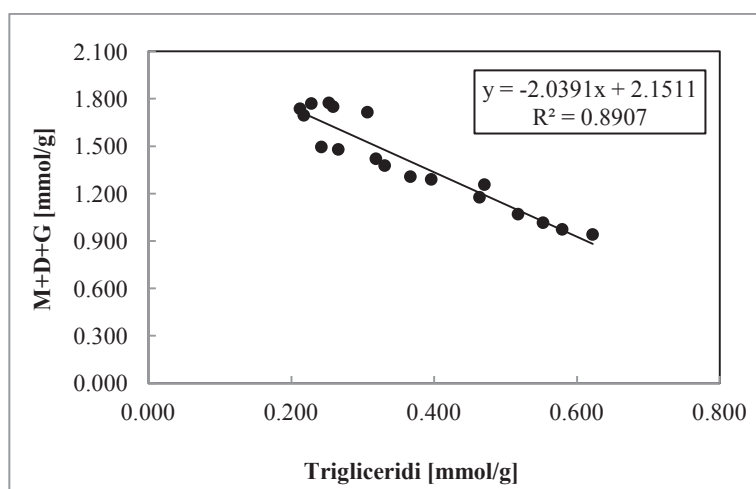


Fig. 4.19 - Correlazione dei monogliceridi+digliceridi+glicerolo con i trigliceridi (2° step) – *Lipo P. cepacia*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

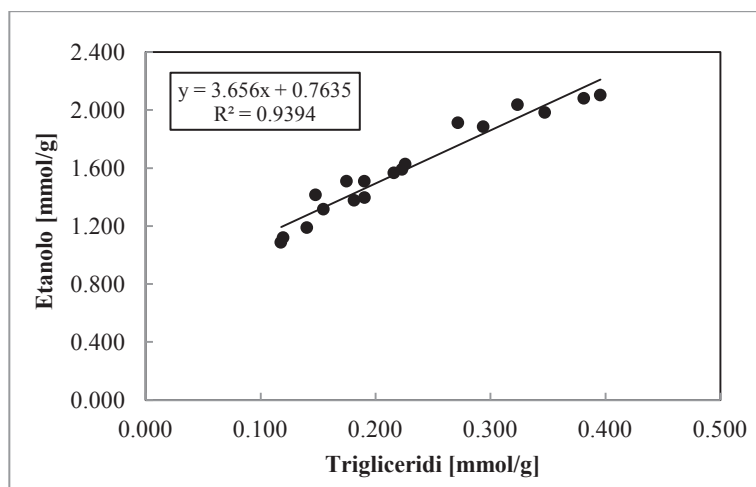


Fig. 4.20 - Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (3° step) – *Lipo P. cepacia*.

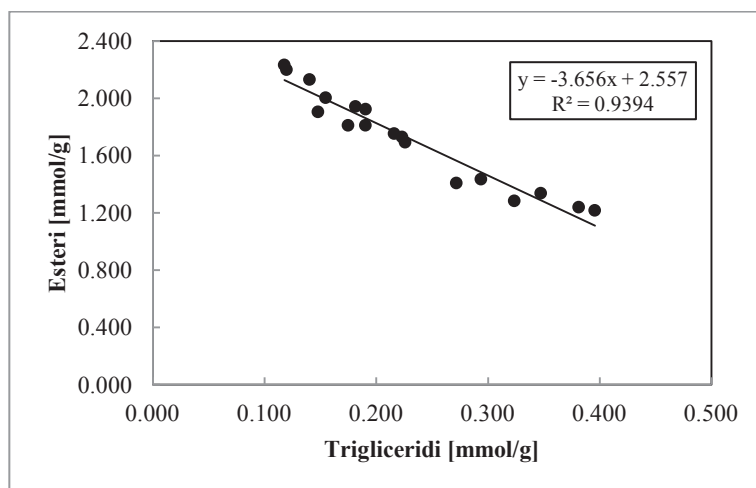


Fig. 4.21 - Correlazione degli esteri con i trigliceridi (3° step) – *Lipo P. cepacia*.

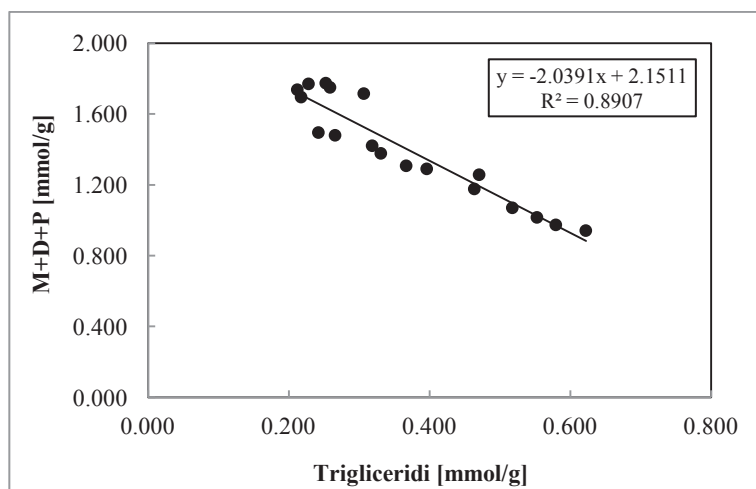


Fig. 4.22 - Correlazione dei monogliceridi+digliceridi+glicerolo con i trigliceridi (3° step) – *Lipo P. cepacia*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

Per ogni *step* si possono considerare i seguenti bilanci molari, che tengono conto delle correlazioni trovate:

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

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

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

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 trigliceridi reagita; A_0 e B_0 sono rispettivamente le moli iniziali (al tempo $t=0$, primo *step*) di trigliceridi ed etanolo; A , B , P e Q sono, rispettivamente, le concentrazioni di trigliceridi, etanolo, monogliceridi+digliceridi+ glicerolo ed esteri.

I valori di a , b e c sono i coefficienti delle correlazioni mostrate nelle Figure 4.14 - 4.22 e sono diversi per ogni *step* di reazione. Sostituendo le definizioni di $[B]$, $[Q]$ e $[P]$ nelle equazioni cinetiche 4.4 (senza considerare l'inibizione da etanolo) e 4.5 (considerando l'inibizione) si ottengono delle espressioni per i diversi *step* di reazione in funzione della sola concentrazione dei trigliceridi $[A]$:

- Cinetica senza inibizione da etanolo – 1° step

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{a[A]\{B_0 - 1.3(A_0 - [A])\} - 3.332b(A_0 - [A])^2}{c[A]^2 + d[A] + e} \quad (4.6)$$

dove $a = K_1$, $b = K_2$, $c = 1.3K_5 - 2.563K_7 + 3.332K_{10} - 1.69K_9$, $d = B_0(K_5 - 1.3K_9) + A_0(-1.3K_5 + 2.563K_7 - 6.664K_{10} + 3.38K_9 + K_3 + 1.3K_4 - 2.563K_6 - 1.3K_8)$,
 $e = B_0(K_4 + 1.3K_9A_0) + A_0(-1.3K_4 + 2.563K_6 + 1.3K_8) + A_0^2(3.332K_{10} - 1.69K_9)$.

- Cinetica senza inibizione da etanolo – 2° step

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{a[A]\{2B_0 - 2,105(A_0 - [A])\} - 4,292b(A_0 - [A])^2}{c[A]^2 + d[A] + e} \quad (4.7)$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

dove $a = K_1$, $b = K_2$, $c = 2.105K_5 - 2.039K_7 + 4.29K_{10} - 4.43K_9$, $d = B_0(2K_5 - 4.21K_9) + A_0(-2.105K_5 + 2.039K_7 - 8.58K_{10} + 8.86K_9 + K_3 + 2.105K_4 - 2.039K_6 - 2.106K_8)$,
 $e = B_0(2K_4 + 4.21K_9A_0) + A_0(-2.105K_4 + 2.039K_6 + 2.105K_8) + A_0^2(4.29K_{10} - 4.43K_9)$.

- Cinetica senza inibizione da etanolo – 3° step

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{a[A]\{3B_0 - 3.656(A_0 - [A])\} - 7.455b(A_0 - [A])^2}{c[A]^2 + d[A] + e} \quad (4.8)$$

dove $a = K_1$, $b = K_2$, $c = 3.656K_5 - 2.039K_7 + 7.455K_{10} - 13.37K_9$, $d = B_0(3K_5 - 10.97K_9) + A_0(-3.656K_5 + 2.039K_7 - 14.91K_{10} + 26.74K_9) + K_3 + 3.656K_4 - 2.039K_6 - 3.656K_8$, $e = B_0(3K_4 + 10.97K_9A_0 + A_0 - 3.656K_4 + 2.039K_6 + 3.656K_8 + A_0^2 7.455K_{10} - 13.37K_9)$.

- Cinetica con inibizione da etanolo – 1° step

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{a[A]\{B_0 - 1.3(A_0 - [A])\} - 3.332b(A_0 - [A])^2}{c[A]^2 + d[A] + e} \quad (4.9)$$

dove $a = K_1$, $b = K_2$, $c = 1.3K_5 + 3.33K_8 - 2.563K_9 - 1.69K_{10} + 1.69K_{11} - 3.33K_{12}$, $d = B_0(K_5 - 1.3K_{10} + 2.6K_{11} - 2.563K_{12} + A_0 - 1.3K_5 + 2.563K_7 + 6.66K_8 + 3.38K_{10} - 3.38K_{11} + 6.66K_{12} + K_3 + 1.3K_4 - 2.563K_6 - 1.3K_7)$, $e = B_0(K_4 + 1.3K_{10}A_0 - 2.6A_0K_{11} + 2.563A_0K_{12}) + A_0(-1.3K_4 + 2.563K_6 + 1.3K_7) + K_{11}B_0^2 + A_0^2(3.33K_8 - 1.69K_{10} + 1.69K_{11} - 3.33K_{12})$.

- Cinetica con inibizione da etanolo – 2° step

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{a[A]\{2B_0 - 2.105(A_0 - [A])\} - 4.29b(A_0 - [A])^2}{c[A]^2 + d[A] + e} \quad (4.10)$$

dove $a = K_1$, $b = K_2$, $c = 2.105K_5 + 4.29K_8 - 2.039K_9 - 4.43K_{10} + 4.43K_{11} - 4.29K_{12}$, $d = B_0(2K_5 - 4.21K_{10} + 8.42K_{11} - 4.078K_{12} + A_0 - 2.105K_5 + 8.58K_8 + 2.039K_9 + 8.86K_{10} - 8.86K_{11} + 8.58K_{12} + K_3 + 2.105K_4 - 2.039K_6 - 2.105K_7)$, $e = B_0(2K_4 + 4.21K_{10}A_0 - 8.42A_0K_{11} + 4.078A_0K_{12}) + A_0(-2.105K_4 + 2.039K_6 + 2.105K_7) + 4K_{11}B_0^2 + A_0^2(4.29K_8 - 4.43K_{10} + 4.43K_{11} - 4.29K_{12})$.

- Cinetica con inibizione da etanolo – 3° step

$$\frac{r_Q}{[E_0]} = \frac{a[A]\{3B_0 - 3.656(A_0 - [A])\} - 7.455b(A_0 - [A])^2}{c[A]^2 + d[A] + e} \quad (4.11)$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

dove $a = K_1$, $b = K_2$, $c = 3.656K_5 + 7.455K_8 - 2.039K_9 - 13.37K_{10} + 13.37K_{11} - 7.455K_{12}$, $d = B_0(3K_5 - 10.97K_{10} + 21.94K_{11} - 6.117K_{12}) + A_0(-3.656K_5 + 14.91K_8 + 2.039K_9 + 26.74K_{10} - 26.74K_{11} + 14.91K_{12} + K_3 + 3.656K_4 - 2.039K_6 - 3.656K_7)$,
 $e = B_0(3K_4 + 10.97K_{10}A_0 - 21.94A_0K_{11} + 6.117A_0K_{12}) + A_0(-3.656K_4 + 2.039K_6 + 3.656K_7) + 9K_{11}B_0^2 + A_0^2(7.455K_8 - 13.37K_{10} + 13.37K_{11} - 7.455K_{12})$.

Dibidendo tutti i termini delle Equazioni 4.6 – 4.11, si riduce ulteriormente il numero dei parametri da 5 a 4:

$$\begin{cases} \alpha = a/c \\ \beta = b/c \\ \delta = d/c \\ \varepsilon = e/c \end{cases}$$

4.6.2 Riduzione delle variabili per le prove condotte con il biocatalizzatore Epobond P. cepacia

Le correlazioni dell'etanolo, degli esteri e della somma M+D+G in funzione della concentrazione dei trigliceridi nel primo step sono mostrate nelle Figure 4.23, 4.24 e 4.25.

In modo analogo si procede anche con il secondo (Figure 4.26, 4.27 e 4.28) e il terzo step (Figure 4.29, 4.30 e 4.31).

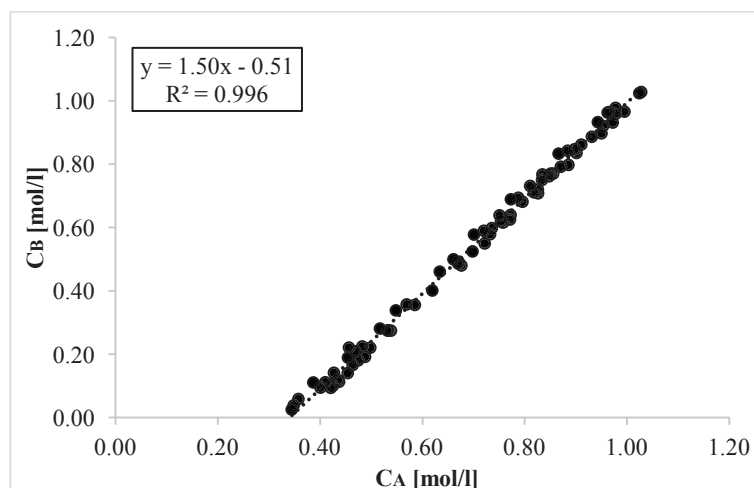


Fig. 4.23 - Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (1° step) – Epobond P. cepacia.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

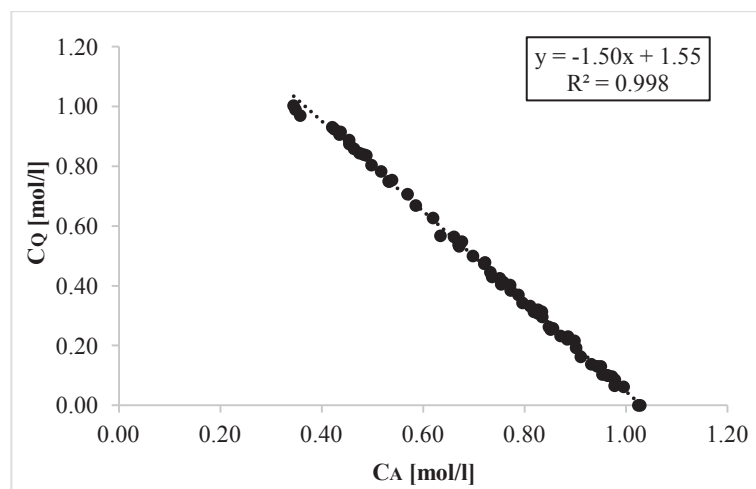


Fig. 4.24 - Correlazione degli esteri con i trigliceridi (1° step) – *Epobond P. cepacia*.

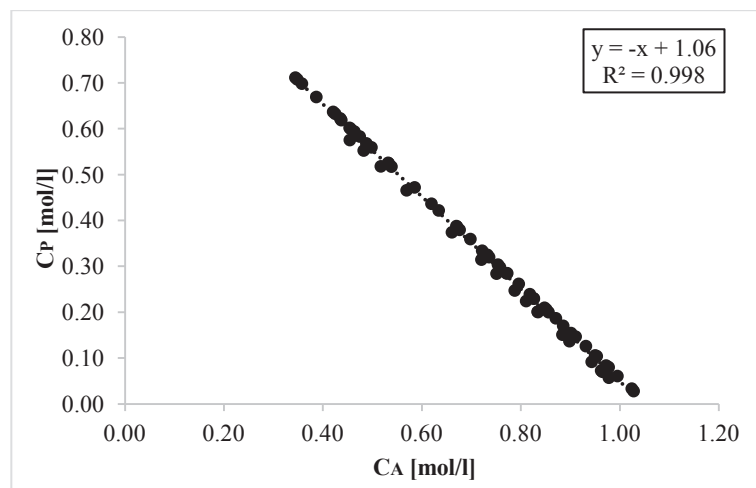


Fig. 4.25 - Correlazione dei monolic.+diglic.+glicerolo con i trigliceridi (1° step) – *Epobond P. cepacia*.

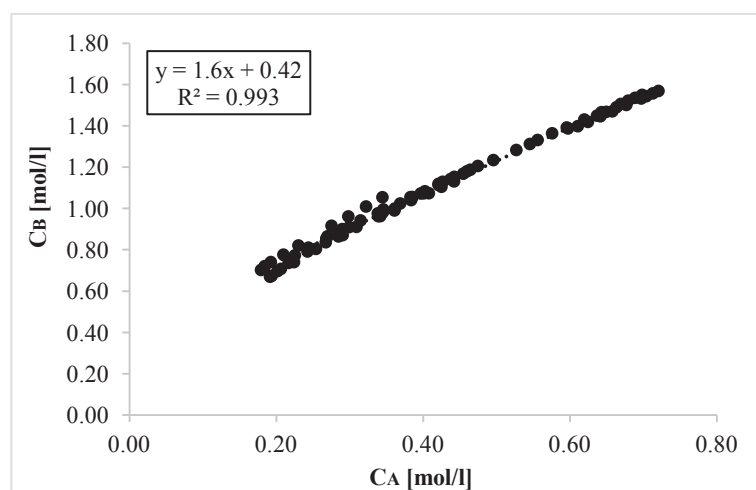


Fig. 4.26 - Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (2° step) – *Epobond P. cepacia*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

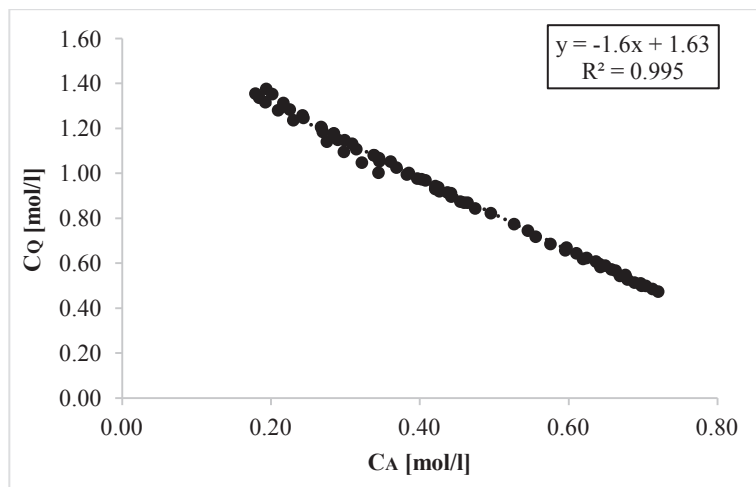


Fig. 4.27 - Correlazione degli esteri con i trigliceridi (2° step) – *Epobond P. cepacia*.

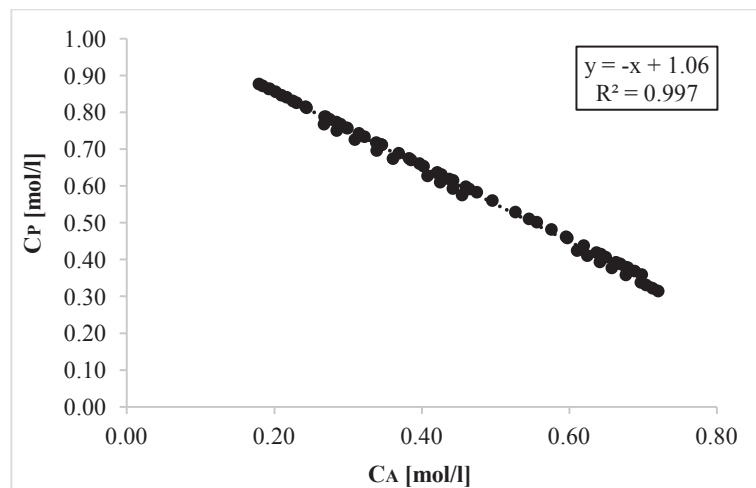


Fig. 4.28 - Correlazione dei monoglic.+diglic.+glicerolo con i trigliceridi (2° step) – *Epobond P. cepacia*.

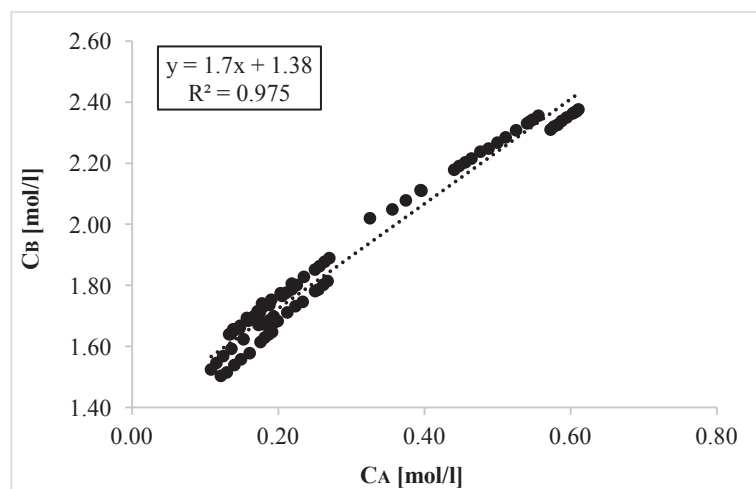


Fig. 4.29 - Correlazione dell'etanolo con i trigliceridi (3° step) – *Epobond P. cepacia*.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

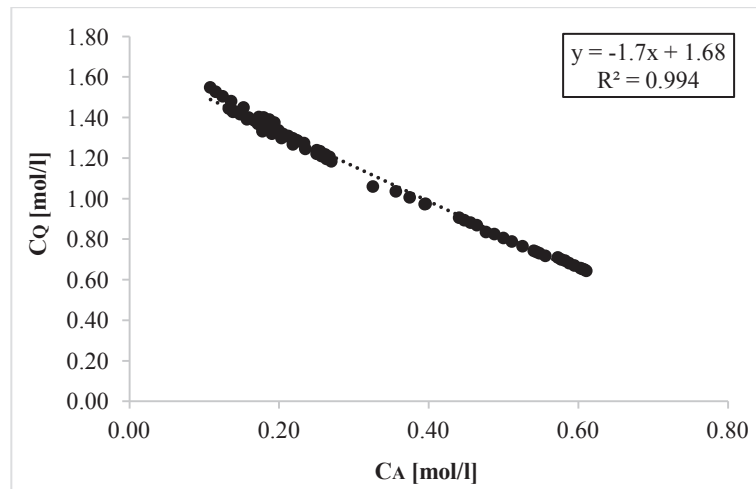


Fig. 4.30 - Correlazione degli esteri con i trigliceridi (2° step) – Epobond P. cepacia.

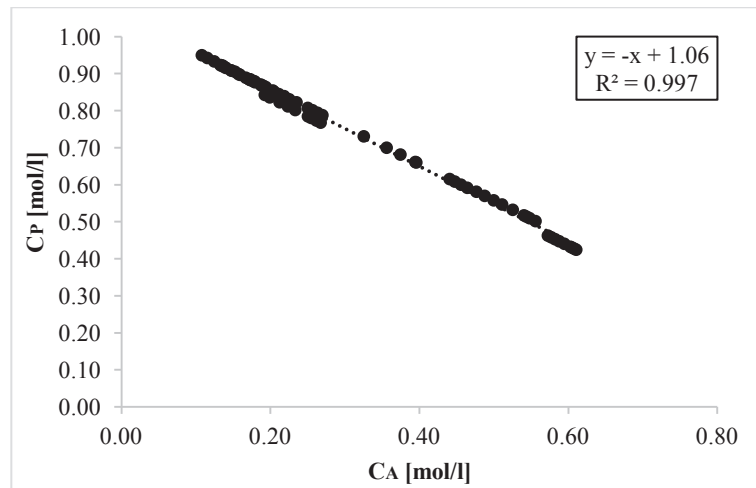


Fig. 4.31 - Correlazione dei monoglic.+diglic.+glicerolo con i trigliceridi (3° step) – Epobond P. cepacia.

Ricordando i seguenti bilanci materiali

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

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

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

si individuano i coefficienti a , b e c per i tre step, riportati in Tabella 4.1.

Tab. 4.1 - Valori dei coefficienti a , b e c per i tre step, derivati dalla riduzione delle variabili nelle prove eseguite con Epobond P. cepacia.

	a	b	c
1° step	1.5	1.5	1
2° step	1.6	1.6	1
3° step	1.7	1.7	1

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

I valori delle concentrazioni iniziali (mol/l) di A , B , Q e P per i tre step per i tre oli usati (fresco, esausto 1 ed esausto 2) nelle prove con il biocatalizzatore Epobond P. cepacia al 3% e al 5% (all'1% la reazione procede troppo lentamente) sono riportati in Tabella 4.2.

Tab. 4.2 - Concentrazioni iniziali di A, B, P e Q nelle prove con *Epobond P. cepacia*.

Step	Prova	A_0	B_0	Q_0	P_0
1°	3% OLIO F	1.028	1.028	0.000	0.028
	5% OLIO F	1.028	1.028	0.000	0.028
	3% OLIO E1	1.025	1.025	0.000	0.033
	5% OLIO E1	1.025	1.025	0.000	0.033
	3% OLIO E2	0.978	0.978	0.000	0.057
	5% OLIO E2	0.978	0.978	0.000	0.057
2°	3% OLIO F	0.438	1.142	0.915	0.619
	5% OLIO F	0.345	1.054	1.003	0.711
	3% OLIO E1	0.475	1.205	0.844	0.583
	5% OLIO E1	0.421	1.119	0.930	0.637
	3% OLIO E2	0.455	1.168	0.874	0.575
	5% OLIO E2	0.401	1.073	0.861	1.395
3°	3% OLIO F	0.225	1.801	1.284	0.831
	5% OLIO F	0.179	1.730	1.355	0.877
	3% OLIO E1	0.270	1.889	1.184	0.788
	5% OLIO E1	0.194	1.698	1.376	0.864
	3% OLIO E2	0.268	1.814	1.206	0.768
	5% OLIO E2	0.192	1.647	1.195	1.958

4.7 Calcolo dei parametri cinetici e validazione del modello cinetico

Per poter analizzare e validare il modello che meglio interpreta i risultati sperimentali, la stima dei parametri per la verifica del modello scelto è stata effettuata mediante il metodo differenziale. Pertanto, i dati sono stati rielaborati in modo da fornire le velocità di reazione lungo tutto il tempo previsto. Ciò è stato realizzato diagrammando i profili di concentrazione dei trigliceridi rispetto al tempo e valutando le derivate prime nei tempi di analisi.

Quindi, si è partiti dalla scrittura delle velocità di reazione discretizzata:

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} \cong -\frac{C_A(t_i) - C_A(t_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})} [=] \frac{mol}{l \cdot s}$$

4.7.1 Modello di pseudo-primo ordine

Riprendendo l'evoluzione temporale dei trigliceridi, si nota che, per ciascuno step, l'ipotesi di approssimare tale andamento nel tempo a un esponenziale decrescente sia compatibile con i risultati sperimentali ottenuti.

Si ipotizza, quindi, valido il modello, espresso dall'Equazione 4.1:

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kbe^{-kt} = Ke^{-kt} \quad \text{con } K = kb$$

e si applica il metodo differenziale per la determinazione dei due parametri K, k:

Per ottenere una prima stima si linearizza l'espressione trovata:

$$\ln(-r_A^{SP}) = \ln K - kt \Rightarrow -\ln(-r_A^{SP}) = -\ln K + kt$$

Se si riportano su di un diagramma il logaritmo della velocità rispetto al tempo si otterrà una retta $y = mx + q$, tramite cui ottenere la prima stima dei parametri del modello:

$$\begin{cases} m = k \\ q = \ln K \Rightarrow K \end{cases}$$

Così facendo si utilizzano i parametri appena determinati per ottenere il primo valore di $-Ra$ da impiegare per il fitting. Nello specifico, poiché si sta applicando il metodo differenziale, la funzione da minimizzare attraverso la variazione dei parametri è la seguente:

$$S = \sum_i \left((-r_{Ai}^{SP}) - (-r_{Ai}^{CALC}) \right)^2$$

Nella seguente Figura 4.32 si riporta la procedura usata per la stima iniziale dei parametri per il primo step della reazione condotta con il catalizzatore *Epobond P. cepacia*.

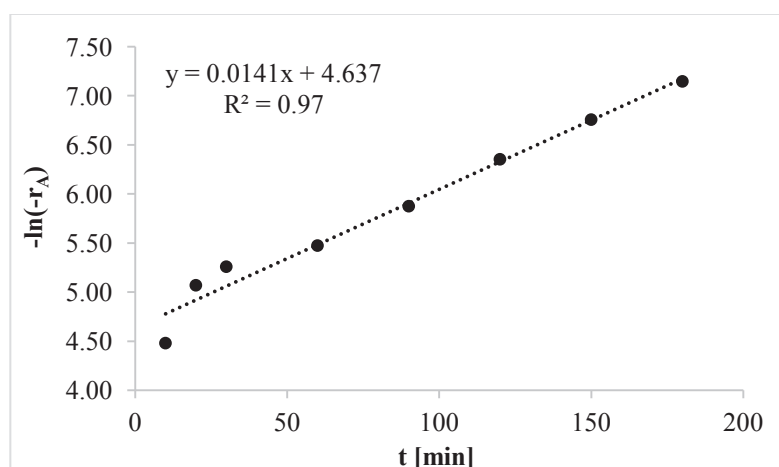


Fig. 4.32 - Stima dei parametri del modello di pseudo-primo ordine (1° step).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

A questo punto, note le due stime (dal coefficiente angolare e dall'intercetta della retta interpolante), si può calcolare il primo valore per la velocità di reazione. Passando tale valore al calcolatore, insieme alla funzione da minimizzare e ai dati a disposizione, si può applicare il metodo integrale attraverso cui compiere il fitting del modello per la determinazione del valore effettivo dei due parametri.

In Figura 4.33 si confrontano i valori di velocità calcolati, attraverso la discretizzazione spiegata ad inizio capitolo, con quelli determinati dal modello.

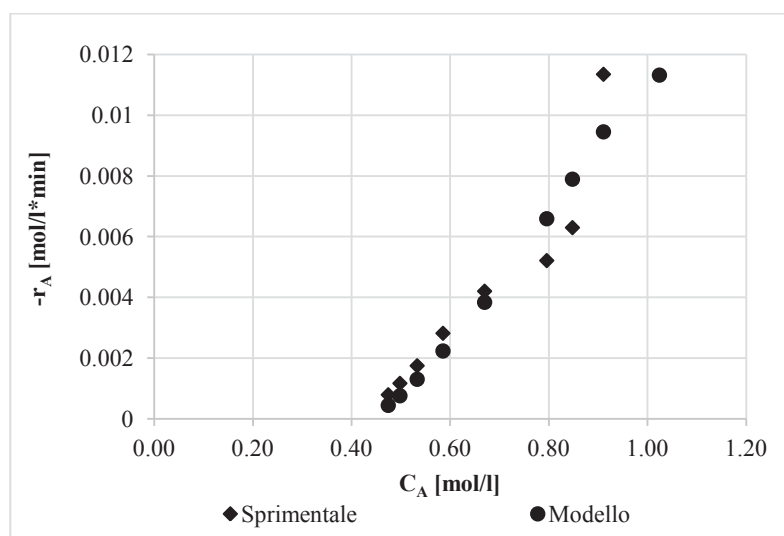


Fig. 4.33 - Applicazione del metodo differenziale al primo step.

Il calcolatore, alla fine del fitting fornisce i valori dei parametri cinetici riportati in Tabella 4.3.

Si procede in modo del tutto analogo con gli altri due step e si calcolano le costanti riportate in Tabella 4.3 per tutti e tre gli step considerati.

Tab. 4.3 - Parametri cinetici per il modello di pseudo-primo ordine.

	PRIMO STEP	SECONDO STEP	TERZO STEP
k	$1.80 \cdot 10^{-2}$	$4.70 \cdot 10^{-3}$	$2.70 \cdot 10^{-3}$
K	$1.13 \cdot 10^{-2}$	$1.78 \cdot 10^{-3}$	$8.324 \cdot 10^{-5}$
R^2	0.95	0.96	0.94

Dai valori appena riportati si evince come vi sia una netta differenza tra ciascuno step. Il profilo di velocità diventa meno “appeso” e presenta valori molto più bassi passando dal primo al terzo step. Ciò è riconducibile a vari fattori, tra cui i principali sono la minore presenza di trigliceridi nel mezzo di reazione e l’inibizione del catalizzatore.

Essendoci un buon accordo con i dati sperimentali, si può concludere che il modello di pseudo-primo ordine vada piuttosto bene per una descrizione di massima, quindi non dettagliata. Tuttavia, tale modello risulta troppo restrittivo per la reazione in esame, in quanto considera un solo substrato e non prevede alcun tipo di inibizione, senza minimamente considerare il tipico meccanismo enzimatico.

4.7.2 Modello del secondo ordine

L'equazione cinetica a cui si fa riferimento è la 4.2:

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = (k_1 C_A C_B - k_{-1} C_P C_Q) [E_0]$$

Applicando il metodo differenziale, si ottiene:

$$\begin{cases} C_A(t) \\ C_B(t) \\ C_P(t) \\ C_Q(t) \end{cases} \text{ noto} \Rightarrow -R_A'^{SP} = -\frac{dC_A(t)}{dt} \Rightarrow -R_A'^{SP} = \frac{-R_A^{SP}}{[E_0]} = (k_1 C_A C_B - k_{-1} C_P C_Q)$$

Anche in questo caso si minimizzerà la seguente quantità:

$$S = \sum_i \left((-r_{Ai}'^{SP}) - (-r_{Ai}'^{MOD}) \right)^2$$

Per la stima del parametro k_1 si ricorre al valore ottenuto con la cinetica del primo ordine.

I parametri del modello del secondo ordine ottenuti per tutti e tre gli step sono riportati in Tabella 4.4.

Tab. 4.4 - Parametri cinetici per il modello del secondo ordine.

	PRIMO STEP	SECONDO STEP	TERZO STEP
k_1	$4.94 \cdot 10^{-4}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	$5.49 \cdot 10^{-5}$
k_{-1}	$1.14 \cdot 10^{-5}$	0	0
R^2	0.95	0.94	0.93

Dai valori riportati nella Tabella 4.4 emerge che la reversibilità sia prevista solo nel primo step. Nel secondo e nel terzo, infatti, il modello si riduce a uno del secondo ordine irreversibile, nel quale, a differenza del primo ordine, viene considerata l'influenza dell'altro substrato, l'etanolo. Si può affermare, alla luce dei risultati riportati, che il modello descrive abbastanza bene i dati sperimentali, nonostante non cogli, però, a pieno l'andamento. Le velocità di reazione delle reazioni catalizzate da enzimi, infatti, dopo l'iniziale aumento si

assestano intorno ad un valore costante, tipico delle cinetiche di saturazione. Il modello del secondo ordine proposto non può descrivere, qualsiasi siano le condizioni impiegate, tale meccanismo di saturazione. Ci si ritrova con i risultati sperimentali solo perché l'intervallo operativo considerato è quello relativo alla prima fase in cui si ha l'aumento della velocità. Ciò implica che l'aver considerato sia la reversibilità che la presenza di tutti i substrati, non considerati con il modello di pseudo-primo ordine, vada bene per la descrizione di massima della cinetica della reazione di trans-esterificazione, ma rimane il limite di considerare un modello senza alcun fondamento enzimatico.

4.7.3 Modello Ping Pong bi bi

La riduzione delle variabili consente di ottenere delle espressioni della velocità di reazione in funzione della sola concentrazione dei trigliceridi, dal momento che A_0 e B_0 sono fissati e costanti in tutte le prove. Le equazioni ricavate sono comunque abbastanza complesse per poter essere ricondotte a espressioni linearizzate. Pertanto il calcolo dei parametri deve essere fatto attraverso un fitting non lineare dei dati.

4.7.3.1 Prove di reazione in tre step da 100 minuti ciascuno con *Lipo P. cepacia* a partire da olio fresco

La velocità di reazione, per ogni *step*, può essere scritta nella forma generica:

$$r_Q = [E]_0 \frac{\alpha[A][B] - \beta[P][Q]}{[A]^2 + \gamma[A] + \delta} \quad (4.12)$$

in cui le unità di misura di r_Q sono espresse in [mmol/(min·g_{tot})], $[E]_0$ in [g_{cat}/g_{tot}], le concentrazioni dei vari composti in [mmol/g_{tot}], α e β in [mmol/(min·g_{cat})], γ in [mmol/g_{tot}] e δ in [(mmol/g_{tot})²].

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 4.13 e 4.14).

$$scarto_i = r_Q|_{modello} - r_Q|_{sperimentale} \quad (4.13)$$

$$\sum_i \ln \sqrt{1 + scarto_i^2} \quad (4.14)$$

Il modello ottenuto è stato validato, integrando con il metodo di Eulero il sistema di equazioni cinetiche nel tempo. In particolare, si è considerata l'Equazione cinetica 4.15 in termini di velocità di formazione dell'estere:

$$r_Q = \frac{d[Q]}{dt} \quad (4.15)$$

In base alla stechiometria della reazione la velocità di “scomparsa” dei trigliceridi (A) $-r_A$ è legata alla velocità di formazione dell'estere r_Q dall'Equazione 4.16:

$$-r_A = \frac{r_Q}{3} \quad (4.16)$$

Discretizzando nel tempo, si ottiene l'Equazione 4.17:

$$[A]_{i+1} = [A]_i - \frac{1}{3} r_Q|_i \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (4.17)$$

che permette di valutare la concentrazione dei trigliceridi all'istante di tempo $(i+1)$ a partire dalla concentrazione dei trigliceridi e della velocità di reazione valutate all'istante di tempo precedente i . Noto il valore di $[A]_i$, si calcolano le concentrazioni di etanolo $[B]_i$, di estere $[Q]_i$ e della somma di monogliceridi, digliceridi e glicerolo $[P]_i$ attraverso i bilanci di materia relativi a ciascuno *step*.

Ad esempio, nelle Figure 4.34 e 4.35 è riportato un confronto tra l'andamento al 1° step dei trigliceridi e degli esteri ottenuto sperimentalmente e quello ottenuto integrando il modello (1% di biocatalizzatore).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

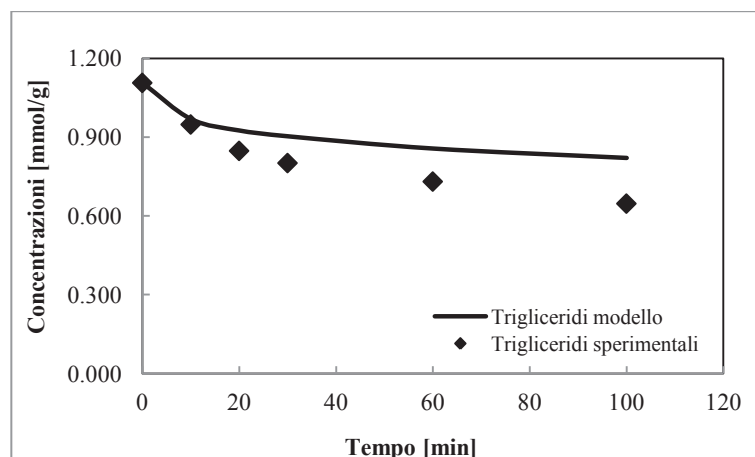


Fig. 4.34 - Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico e i valori sperimentali della concentrazione dei trigliceridi (prova all'1%, 1° step).

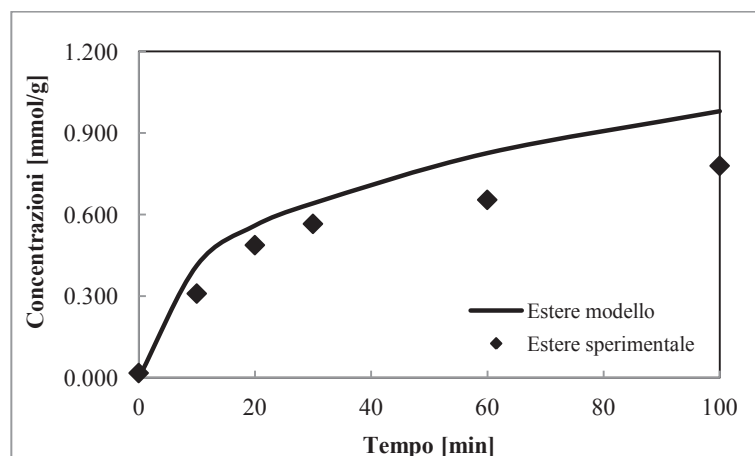


Fig. 4.35 - Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico e i valori sperimentali della concentrazione degli esteri (prova all'1%, 1° step).

Dal confronto tra le previsioni teoriche del modello e i dati sperimentali si nota che il modello predice il comportamento del sistema nei minuti iniziali, mentre si allontana da quello che è stato ottenuto sperimentalmente man mano che la reazione evolve.

Un metodo di determinazione dei parametri più accurato è sicuramente utile per avere un miglior fitting con i dati sperimentali. Bisogna considerare anche che le concentrazioni di etanolo e glicerolo non sono state determinate sperimentalmente, ma mediante dei bilanci di materia ottenuti approssimando i pesi molecolari. Di conseguenza, i coefficienti delle correlazioni tra etanolo e trigliceridi e tra glicerolo e trigliceridi potrebbero essere diversi da quelli reali.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

4.7.3.2 Prove di reazione in tre step da 180 minuti ciascuno con *Epobond P. cepacia* a partire da olio esausto

La velocità di reazione, per ogni *step*, può essere scritta nella forma generica:

$$-r'_A = \frac{\alpha C_A C_B - \beta C_P C_Q}{C_A^2 + \gamma C_A + \delta}$$

Applicando il metodo differenziale, si ottiene:

$$C_A(t) \text{ nota} \Rightarrow -r'_A{}^{SP} = -\frac{dC_A(t)}{dt} \Rightarrow -r'_A{}^{SP} = \frac{-r'_A{}^{SP}}{[E_0]} = \frac{\alpha C_A C_B - \beta C_P C_Q}{C_A^2 + \gamma C_A + \delta}$$

Anche in questo caso si minimizzerà la seguente quantità:

$$S = \sum_i \left((-r'_{Ai}{}^{SP}) - (-r'_{Ai}{}^{CALC}) \right)^2$$

Utilizzando come stima dei parametri i valori ottenuti negli studi precedenti per gli oli vegetali freschi, si ottengono i parametri riportati nella Tabella 4.5.

Tab. 4.5 - Parametri cinetici per il modello *Ping Pong bi bi* (Epobond P. cepacia su oli esausti).

	PRIMO STEP	SECONDO STEP	TERZO STEP
α	$4.03 \cdot 10^{-3}$	$2.72 \cdot 10^{-4}$	$1.50 \cdot 10^{-3}$
β	$4.19 \cdot 10^{-4}$	$9.08 \cdot 10^{-5}$	$5.14 \cdot 10^{-5}$
γ	0	0	0.013
δ	7.306	18.228	26.37
R^2	0.95	0.94	0.95

Dai risultati ottenuti si nota un ottimo accordo con i punti sperimentali. Per questi motivi e per quanto già detto precedentemente la scelta ricade sul meccanismo *Ping Pong bi bi* per la descrizione della reazione di transesterificazione.

Il modello appena valutato può essere utilizzato sia nel caso in cui venga contemplata una possibile generica inibizione da substrato e da prodotto, ma anche nel caso in cui in aggiunta fosse presente una inibizione competitiva sull'enzima da parte dell'etanolo. Infatti, dalle espressioni dei parametri del modello, si vede che tale distinzione può essere fatta solo all'interno degli stessi parametri.

Questo modello è stato poi validato, cercando di riprodurre l'andamento della reazione dopo aver inserito le condizioni operative e iniziali delle prove sperimentali nel reattore batch da laboratorio.

Per fare ciò si è partiti dall'equazione di progetto del reattore batch nel quale è stata condotta la reazione di transesterificazione:

$$-\frac{dC_A(t)}{dt} = -r_A$$

Sostituendo al posto di r_A l'equazione del modello cinetico da validare e applicando il metodo di Eulero per la risoluzione dell'equazione differenziale si ottiene:

$$C_A(t_{i+1}) = C_A(t_i) - \frac{AC_A(t_i)C_B(t_i) - BC_P(t_i)C_Q(t_i)}{C_A^2(t_i) + DC_A(t_i) + E} \cdot [E_0] \cdot \Delta t$$

$$C_B(t_i) = aC_A(t_i) + b$$

$$C_P(t_i) = cC_A(t_i) + d$$

$$C_Q(t_i) = eC_A(t_i) + q$$

Gli andamenti trovati per i reagenti e i prodotti sono stati diagrammati in funzione del tempo e sono stati confrontati con quelli sperimentali.

Nelle figure 4.36-4.38 si riportano gli andamenti sperimentali e quelli calcolati dal modello per ciascuno step per la prova condotta con olio esausto 1 come fonte di trigliceridi e il 3% di biocatalizzatore.

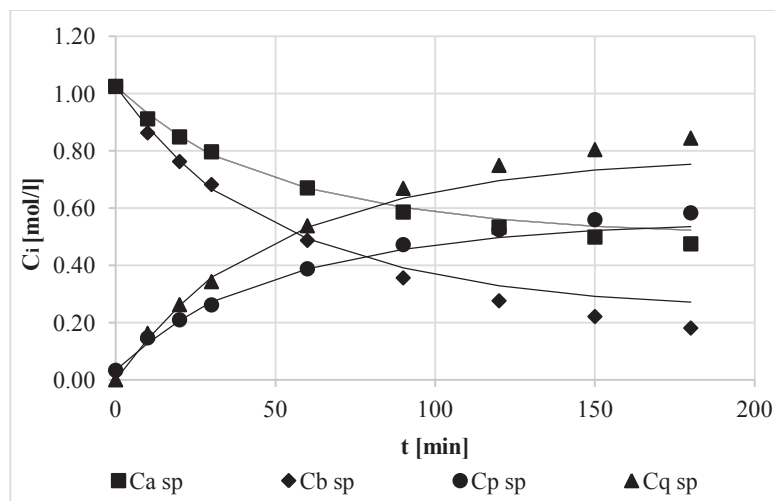


Fig. 4.36 - Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico (linea continua) e i valori sperimentali (punti) nel reattore batch con *Epobond P. cepacia* al 3% a partire da olio esausto 1 – 1° step.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIA – Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi
 Capitolo 4 – Elaborazione del modello cinetico

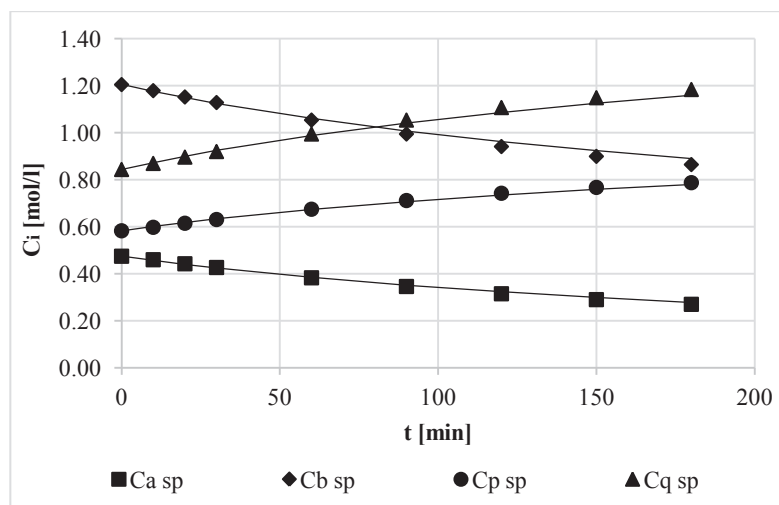


Fig. 4.37 - Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico (linea continua) e i valori sperimentali (punti) nel reattore batch con *Epobond P. cepacia* al 3% a partire da olio esausto 1 – 2° step.

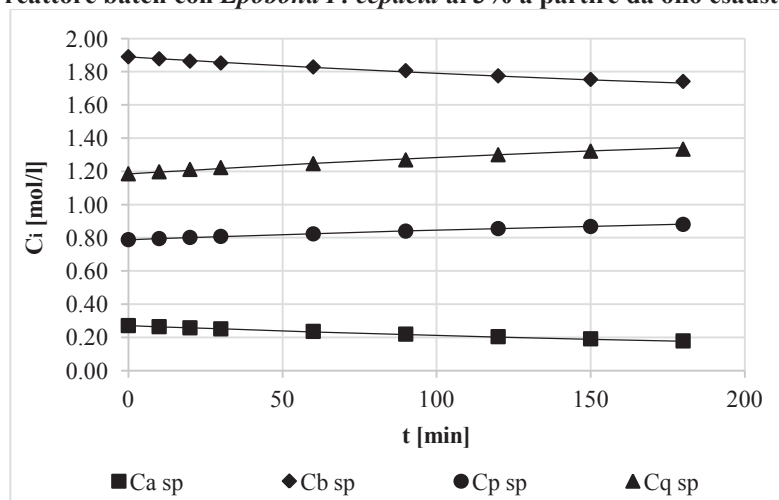


Fig. 4.38 - Confronto tra le previsioni teoriche del modello cinetico (linea continua) e i valori sperimentali (punti) nel reattore batch con *Epobond P. cepacia* al 3% a partire da olio esausto 1 – 3° step.

Dai risultati ottenuti si evince l'ottimo riscontro esistente tra i dati ottenuti con il modello ed i punti sperimentali. Andamenti del tutto analoghi sono riscontrati per tutte le prove, con diversa concentrazione di biocatalizzatore e diverso tipo di olio.

Parte IIB

**PRODUZIONE DI BIOGAS
MEDIANTE DIGESTIONE ANAEROBICA
DI BIOMASSE DI SCARTO**

Capitolo 1

Il biogas: stato dell'arte

1.1 Cos'è il biogas?

Il biogas è una miscela di metano CH₄ (50-75%) e anidride carbonica CO₂ (25-50%) con un potere calorifero di circa 23 MJ/Nm³. Il biogas contiene anche tracce di vapor d'acqua, azoto, idrogeno solforato e ammoniacca. Grazie alle sue caratteristiche, il biogas può essere:

- sottoposto a combustione diretta in caldaia con produzione di sola energia termica, a combustione in motori azionanti gruppi elettrogeni per la produzione di energia elettrica o a combustione in cogeneratori per la produzione combinata di energia elettrica e termica;
- immesso in rete dopo opportuna purificazione;
- usato nel settore dell'autotrazione come metano al 95%.

Una semplice analisi basata su dati di poteri calorifici è mostrata in Tabella 1.1:

Tab. 1.1 – Potere Calorifico Inferiore di vari combustibili (*La digestione anaerobica di rifiuti e biomasse, Programma sviluppo rurale regione Lombardia, 2007-2013*).

Combustibile	p.c.i [kcal/kg- kcal/m ³]
Gas di petrolio liquefatti	11000
Benzina per auto	10500
Combustibile per aerei	10400
Gasolio	10200
Petrolio grezzo	10000
Olio combustibile	9800
Litantrace	6800-9000
Antracite	8000-8500
Gas naturale	8300
Carbone di legna	7500
Coke	7000
Lignite	4000-6200
Biogas	4000-4500
Torba	3000-4500
Gas tecnico di cokeria	4300
Legna da ardere	2500-4500
Gas tecnico di altoforno	900

1.2 Come si ottiene il biogas? La digestione anaerobica

1.2.1 Fasi della digestione anaerobica

La sostanza organica, costituita prevalentemente da carboidrati, proteine e lipidi, è demolita secondo i percorsi metabolici sintetizzati nella Figura 1.1.

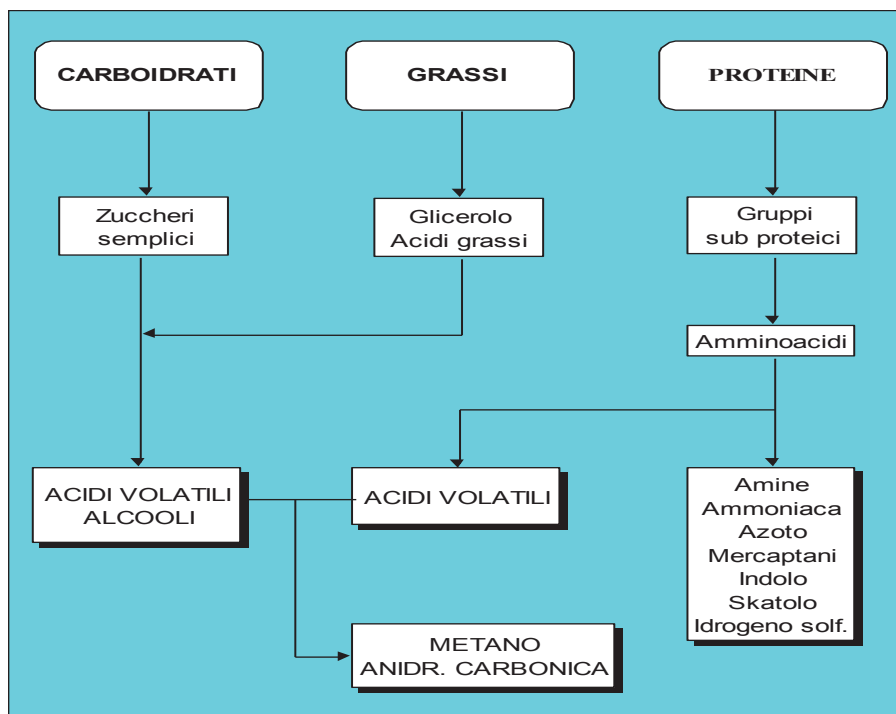


Fig. 1.1 - Percorsi metabolici delle diverse sostanze organiche.

In particolare, il processo di digestione anaerobica si articola in quattro fasi: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi, secondo lo schema riportato nella Figura 1.2. L'intero processo avviene grazie alla presenza di ceppi batterici, che in condizioni di anaerobiosi, svolgono la loro attività microbica. In particolare, la digestione anaerobica richiede la presenza, nell'ambiente di reazione, di una catena trofica anaerobica costituita da almeno quattro gruppi microbici fermentanti: batteri idrolitici, batteri acidificanti, batteri acetogeni e batteri metanigeni (*Mata-Alvarez et al., 2000*), la cui azione nelle diverse fasi è ancora meglio specificata in Figura 1.3. La degradazione dei nutrienti costituenti la matrice organica avviene grazie all'interazione tra questi diversi ceppi di procarioti: ciascun gruppo microbico opera sui prodotti intermedi del processo di digestione elaborati dal metabolismo del gruppo precedente.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
 Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

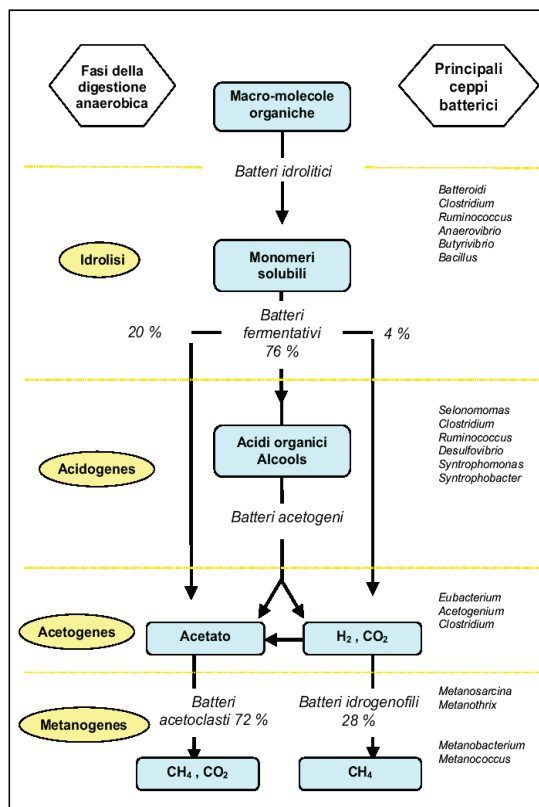


Fig. 1.2 - Ceppi batterici coinvolti nelle diverse fasi della digestione anaerobica.

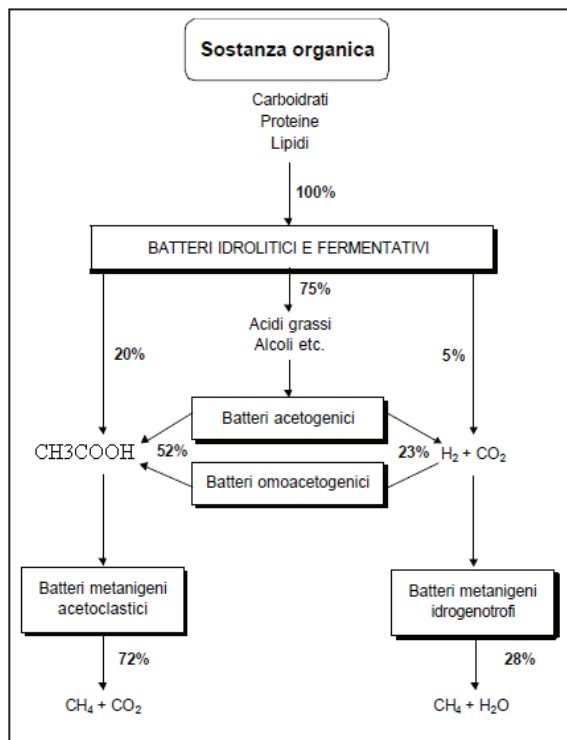


Fig. 1.3 - Schema del percorso metabolico della produzione di biogas da matrici organiche.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

Nella prima fase si realizza l'idrolisi dei substrati complessi con una conseguente acidificazione dell'ambiente di reazione per via della formazione di acidi grassi volatili, alcoli e chetoni. I batteri idrolizzanti sono in grado di agire essi stessi sulla matrice organica oppure mediante la produzione di enzimi extracellulari (*Batstone et al., 2002*). In entrambi i casi si ottengono oligomeri e monomeri che vengono ossidati dai microorganismi acidogenici con conseguente produzione di piruvato. Quest'ultimo viene poi trasformato in acidi grassi volatili, in particolare propinato e butirrato.

Nella seconda e terza fase, gli acidi grassi prodotti, in seguito a ulteriori reazioni, formano principalmente acido acetico, acido formico, biossido di carbonio e idrogeno molecolare (*Angelidaki et al., 1999*). Ciò può realizzarsi con un numero di step diversi a seconda che gli acidi grassi di partenza sono a catena lunga (>5C) o a catena corta (<5C).

Infine, nella quarta fase ha luogo la metanogenesi vera e propria, durante la quale si ha la sintesi di metano a partire dall'acetato, a opera di batteri acetoclasti, o dal biossido di carbonio grazie alla presenza di idrogeno che viene utilizzato come co-substrato, da parte di batteri idrogenofili. Le due alternative non avvengono in egual misura, ma prevale il meccanismo di dismutazione anaerobica dell'acido acetico. Con la loro attività, i due ceppi di batteri metanigeni svolgono due importanti funzioni nell'ambito della catena trofica anaerobica: da un lato degradano l'acido acetico e quello formico a CH₄ eliminando gli acidi dal mezzo e impedendo quindi l'inibizione dei fenomeni di degradazione di substrati organici per eccesso di acidità, e dall'altra mantengono la concentrazione di H₂ a bassi livelli così da consentire la conversione degli acidi grassi a catena lunga e degli alcoli ad acetato ed H₂.

I ceppi batterici coinvolti sono presenti nelle deiezioni animali, si sviluppano dalla fermentazione delle sostanze vegetale o possono essere selezionati e caricati nella miscela di reazione qualora non si disponga di idonea biomassa per produrli nel digestore.

1.2.2 Biochimica della digestione anaerobica

I batteri anaerobi coinvolti nel processo, consumano parte del substrato per ottenere l'energia necessaria per il proprio metabolismo sotto forma di energia chimica, accumulata attraverso la sintesi di molecole quali l'ATP. Trattandosi di un processo di ossidazione, la produzione di queste ultime avviene mediante una serie di reazioni di ossido-riduzione in cui gli elettroni

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

perduti dalla sostanza organica in digestione sono ceduti a un accettore finale che, in caso di anaerobiosi, è rappresentato da alcuni elementi costituenti della sostanza organica stessa. La stessa ossidazione è catalizzata da enzimi specifici e avviene in presenza di co-enzimi quali il NAD^+ e NADP^+ (Stafford *et al.*, 1981).

I diversi meccanismi di degradazione di proteine, acidi grassi e zuccheri vengono di seguito illustrati attraverso due esempi.

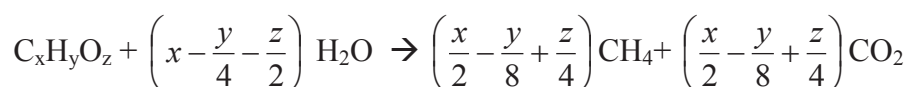
Per uno zucchero come il glucosio si assume la trasformazione dapprima in acido acetico, a opera di microrganismi acetogeni, e quindi in CH_4 e CO_2 (Vismara *et al.*, 1997). La reazione globale è:



Nel caso di proteine, come ad esempio la cisteina, si ha:

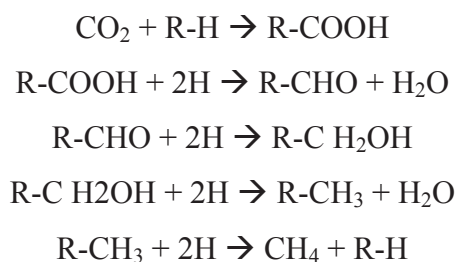


Infine, l'equazione complessiva di degradazione di un acido grasso è:



Per quanto concerne invece la formazione del metano si hanno due possibili meccanismi alternativi:

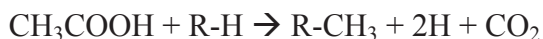
riduzione del carbonio dell'anidride carbonica

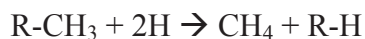


riassunte in:



transmetilazione di molecole con gruppo metilico





riassunte in:



In definitiva, la produzione di metano a partire da anidride carbonica e acido acetico può essere schematizzata in Figura 1.4:

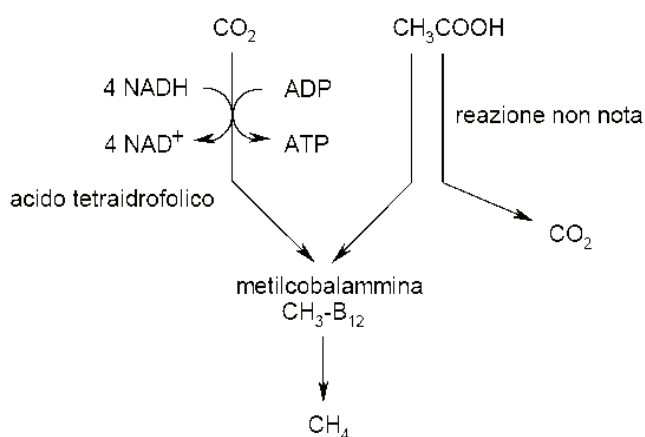


Fig. 1.4 - Metanogenesi partendo da CO₂ e CH₃COOH.

1.2.3 Cinetiche microbiologiche di reazione

I coefficienti cinetici delle diverse fasi del processo di digestione anaerobica vengono frequentemente riportati in letteratura con riferimento a colture pure di microrganismi in presenza di singoli substrati: pertanto il loro impiego, risulta limitato nel caso in cui si operi la digestione anaerobica di substrati organici complessi attraverso l'uso di biomasse batteriche autonomamente insediatesi nel reattore di digestione.

In ogni caso in letteratura sono reperibili un'ampia gamma di dati ed attendibili intervalli di valori dei coefficienti cinetici per un processo di digestione anaerobica. Di seguito, vengono riportati i modelli cinetici e gli intervalli dei valori dei coefficienti cinetici che descrivono i processi di digestione mesofila (maggiormente diffusi a livello industriale).

Il processo di idrolisi è considerato dalla maggior parte degli autori come lo stadio limitante dell'intero processo di digestione anaerobica. La fase di idrolisi è tipicamente descritta da una cinetica di primo ordine (*Vavilin et al., 1996*), indipendente dalla concentrazione di batteri idrolizzanti:

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

$$R_{XS} = -K \cdot S$$

dove R_{XS} è la velocità specifica di idrolisi; K è la costante cinetica di idrolisi e S è la concentrazione di substrato.

Nel caso di matrici complesse occorre inoltre considerare non solo la composizione chimica, ma anche altre caratteristiche quali il grado di complessità delle catene polimeriche costituenti il substrato e le sue dimensioni granulometriche (*Gunaseelan, 1997*). Ne consegue che la definizione di coefficienti particolarmente significativi è piuttosto difficile.

Il processo acidogenico è descritto, dal punto di vista cinetico, attraverso il modello di Monod la cui relazione generale è:

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S} - K_d$$

dove μ è la velocità di crescita dei microrganismi per una data concentrazione di substrato S ; μ_{MAX} è la massima velocità di crescita dei microrganismi; S è la concentrazione del substrato; K_S è il coefficiente di semisaturazione, corrispondente alla concentrazione di substrato S alla quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima; K_d è il coefficiente di decadimento dei microrganismi.

In relazioni di questo genere, S rappresenterà di volta in volta i differenti substrati che possono essere utilizzati nel processo acidogenico: zuccheri, acidi grassi o aminoacidi.

La fase di acetogenesi consiste nell'ossidazione anaerobica di acidi grassi a catena lunga (LCFA) oppure corta (VFA) per formare acido acetico. A seconda del substrato utilizzato si riscontrano differenti valori delle costanti cinetiche di reazione, espresse dall'equazione di Monod.

Il processo metanigeno a opera di batteri acetoclastici è ben simulato da una cinetica di Monod che può essere soggetta a inibizione da substrato (eccesso di acetato nel mezzo). La relazione di Monod nel caso di inibizione assume la forma analitica:

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S \cdot (1 + I \cdot K_I) + S}$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

dove μ è la velocità di crescita dei microrganismi per una data concentrazione di substrato S; μ_{MAX} è la massima velocità di crescita dei microrganismi; S è la concentrazione del substrato; K_S è il coefficiente di semi-saturazione, corrispondente alla concentrazione di substrato S alla quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima; I è la concentrazione della specie inibente a contatto con i microrganismi; K_I è il coefficiente di semisaturazione, relativo alla concentrazione di inibente I, in corrispondenza della quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima.

1.2.4 Prodotti della digestione anaerobica

La digestione anaerobica è, quindi, un processo biochimico che permette la trasformazione di un substrato organico, costituito da macromolecole, in prodotti più semplici tra cui metano, anidride carbonica e un digestato residuo (Siddharth, 2006), come riportato in Figura 1.5.

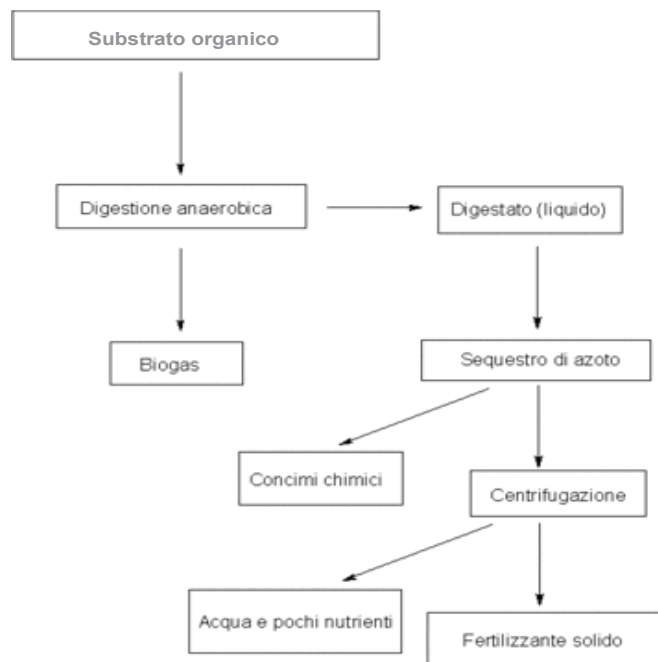


Fig. 1.5 - Prodotti e sottoprodotti della digestione anaerobica (adattato da Siddhart et al., 2006).

La relazione stechiometrica complessiva dell'intero processo è:



Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

Il biogas prodotto dal processo di digestione anaerobica consiste di due componenti principali: il metano e l'anidride carbonica. Il primo, essendo insolubile, abbandona la fase liquida passando a quella gassosa; il secondo, per via dell'instaurarsi di un equilibrio tra fase liquida e gassosa, contribuisce alla formazione di acido carbonico nel mezzo liquido determinando assieme all'ammonio, un sistema tampone.

Affinché il processo di fermentazione avvenga correttamente è necessario che all'interno del digestore siano presenti gli elementi necessari al nutrimento dei batteri. Tra questi elementi devono essere presenti: carbonio, azoto, fosforo e zolfo. Il carbonio è necessario perché è l'elemento che assieme all'idrogeno costituisce il metano stesso; la sua presenza è garantita dal fatto che è l'elemento principale delle sostanze organiche. L'azoto è indispensabile per la produzione delle proteine; se non ve ne è a sufficienza i batteri non potranno utilizzare tutto il carbonio e la resa in metano sarà bassa. Il rapporto tra le concentrazioni di carbonio e azoto, indicato con C/N, non deve mai superare il valore di 35, con un ottimo di 30.

In Tabella 1.2 sono riportati valori tipici del rapporto C/N per alcuni substrati utilizzabili per la conversione in metano.

Tabella 1.2 - Valori tipici del rapporto C/N di alcuni substrati utilizzabili per la produzione di biogas.

Substrato	C/N	Substrato	C/N	Substrato	C/N
<i>Rifiuti animali</i>		Animali da cortile	15	Segatura	350
Urina	0.8	<i>Vegetali</i>		Farina di soia	5
Sangue	3	Erba	12	Farina cotone	5
Farina d'ossa	3.5	Fieno	19	Farina arachidi	36
Residui pesce	5.1	Trifoglio	27	Paglia di avena	48
Residui di carne	5	Erba medica	18	Senape	26
Siero di latte	35	Residui di cavoli	12	Paglia di grano	135
<i>Escrementi</i>		Residui pomodori	12	Fanghi di fogna	
Bovini	25	Alghe	19	Attivati	6
Cavallo	25	Cipolle	15	Freschi	11
Maiale	20	Foglie di patate	15	Letame bovino	30

Per la crescita dei batteri sono indispensabili anche il fosforo e, in misura molto ridotta, lo zolfo; tuttavia, mentre un eccesso di fosforo non genera problemi, un eccesso di zolfo è nocivo perché porta alla produzione di idrogeno solforato (H₂S). Il rapporto ottimale tra le concentrazioni di carbonio e fosforo C/P è di 150, quello tra carbonio e zolfo dovrà essere molto più elevato.

1.2.5 Fattori che influenzano la digestione anaerobica

Vi sono dei fattori che incidono sul processo di digestione anaerobica, globalmente o in una delle sue fasi. La loro influenza deve essere tenuta in considerazione se si vuole ottimizzare il processo di digestione anaerobica garantendo le migliori rese possibili.

1.2.5.1 Temperatura

Si è osservato che in anaerobiosi si ha attività microbica in un range di temperatura che varia da 5°C a 70°C. In base all'intervallo di temperatura ottimale di crescita, i batteri possono essere distinti in:

- ✓ *psicrofili*, temperature ottimali al di sotto di 20°C ;
- ✓ *mesofili*, temperature ottimali comprese tra 20°C e 45°C;
- ✓ *termofili*, temperature ottimali al di sopra dei 45°C.

Una variazione di temperatura di esercizio del processo, comporta non solo un cambiamento nelle specie batteriche coinvolte ma anche una variazione nella velocità di reazione relativa a una data popolazione microbica (*Gallert & Winter, 1997*).

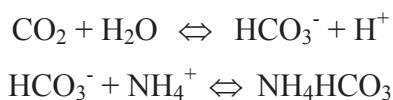
È evidente che un adeguato valore di temperatura migliora l'habitat per i microorganismi così come è altrettanto importante tener conto che ciascuno di essi opera in modo efficace in intervalli di temperatura specifici. La velocità di digestione dipende dalla temperatura mediante una correlazione simile all'equazione di Arrhenius (*Khanal et al., 2008*):

$$r_T = r_{30} * 1.11^{(T-30)}$$

Prendendo a riferimento il tasso di digestione a 30°C. Naturalmente lo start-up del processo è lo stadio più lento essendo i batteri più soggetti a variazioni di carico di substrato ed effetti di tossicità.

1.2.5.2 pH

Il pH condiziona fortemente la velocità di reazione, inibendo o favorendo l'azione degli enzimi necessari alla degradazione. Ogni microorganismo è attivo in un limitato intervallo di pH, al di fuori del quale si ha un rallentamento della velocità di reazione e, quindi, una diminuzione dell'attività microbica. Inoltre, esso influenza la forma in cui i composti del substrato risultano essere disponibili per i microrganismi: per un valore di pH compreso tra 6 e 8 l'acido acetico necessario per la metanogenesi si trova in forma non dissociata risultando effettivamente disponibile per i batteri acetoclastici a una concentrazione tale da evitare fenomeni di inibizione da eccesso di substrato. Infatti, può capitare che in corrispondenza di un incremento del carico organico le aumentate capacità idrolitiche e acidificanti del sistema determinino uno sbilanciamento della popolazione batterica a favore della componente acidogenica e quindi a sfavore della componente metanigena (*Zhang et al., 2005*). Si avrà, pertanto, una fase transitoria in cui si osserverà un incremento di concentrazione degli acidi grassi volatili. In questi casi risulta fondamentale la capacità tamponante del sistema, che deve essere in grado di neutralizzare l'abbassamento di pH determinato dall'accumulo degli acidi organici. L'alcalinità di un digestore anaerobico è determinata essenzialmente dalla presenza di un sistema tampone dovuto alla coesistenza di ammoniaca, originata dalla degradazione di proteine, e di bicarbonato, derivante dalla dissoluzione del biossido di carbonio nel mezzo (*Stafford, 1981*). L'interazione del biossido di carbonio con la fase liquida e la conseguente formazione del sistema tampone determinato dalla contemporanea presenza di acido carbonico e ammonio prendono il nome di sistema calco-acetico. Si ha, in generale, la formazione di NH_4HCO_3 :



La presenza di questo sale disciolto in soluzione porta a un'elevata alcalinità del mezzo con conseguente controllo del processo anche nel caso di un accumulo di acidi grassi volatili. Relativamente ai range ottimali per i diversi tipi di microorganismi, quelli acetogeni prediligono un pH un po' acido 5.5-6 pH, mentre quelli metanogeni 6.8-7.5 pH. Per tale motivo può essere considerato ottimale per l'intero processo di digestione anaerobica un pH

pari a 7. Al di sotto del 6.6 pH i metanogeni sono particolarmente inibiti (*Metcalf & Eddy, 2002*).

1.2.5.3 Substrato

La composizione del substrato e, quindi, la concentrazione di alcuni intermedi metabolici può inibire taluni stadi del processo. Ad esempio, concentrazioni di propinato nel digestore superiori a 3g/l risultano tossiche per il ceppo batterico. L'accumulo di aminoacidi e zuccheri possono inibire la fase idrolitica del processo di digestione poiché vanno a interferire con la produzione e il funzionamento degli enzimi idrolitici. Un'eccessiva concentrazione di idrogeno molecolare, invece, può ostacolare la produzione di acido acetico. La presenza di proteine solforate nel substrato, può favorire la produzione di acido solfidrico, il quale risulta tossico per i batteri metanigeni. Si è osservato che concentrazioni di azoto ammoniacale tra 1500-3000 mg/l inibiscono la produzione di metano se il pH è inferiore a 7.5, mentre concentrazioni superiori a 3000 mg/l risultano tossiche in ogni caso (*Vidal et al., 2000*).

La presenza di ioni metallici risulta essere tossica a causa dell'interazione di questi con i gruppi sulfidrilici degli enzimi (*Vasconcelos et al., 2002*). In particolare, si ha una riduzione della produzione di acidi grassi volatili, e conseguentemente di metano, nel caso di concentrazioni relativamente elevate di ferro, zinco, rame, cromo e cadmio. Secondo un approfondito studio circa gli effetti della presenza di metalli pesanti sul funzionamento di un digestore anaerobico, è stato rilevato che essi sono una delle maggiori cause di arresto di processi metabolici. L'effetto tossico è legato principalmente all'inibizione dell'attività enzimatica dovuta alla sostituzione degli ioni metallici all'interno dei gruppi molecolari specifici costituenti le strutture enzimatiche.

Nelle Tabelle 1.3 e 1.4 vengono riportati i tipi di sostanze e ioni che possono alterare o inibire la digestione anaerobica.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

Tabella 1.3 - Sostanze tossiche per la digestione anaerobica.

Sostanza	Limite di tossicità	Condizioni ottimali	Limite di tollerabilità
Acido solforico	200mg/kg TS	8 – 22 mg/kg TS	
Ammoniaca	3000 mg/l	200-1500mg/l	
NaCl			250-500mg/l
Cloroformio	2.5mg/l		
Fenolo		< 2000mg/l	
Formaldeide		< 400mg/l	
Zinco	160mg/l		
Rame	170mg/l		

Tabella 1.4 - Ioni inibitori o stimolanti per la digestione anaerobica.

Ioni	Stimolante mg/l	Deb. Inibente mg/l	Fort. Inibente mg/l
Na ⁺	100 – 200	3500 – 5500	8000
K ⁺	200 – 400	2500 – 4500	12000
Ca ⁺⁺	100 – 200	2500 – 4500	8000
Mg ⁺⁺	75 – 150	1000 – 1500	3000
NH ₄ ⁺	50 – 200	1500 – 2000	3000 (tossico)
S ⁼	-	Meno di 200	200

1.2.5.4 Agitazione

L'agitazione in un digestore anaerobico garantisce un'omogeneità del substrato, dei microrganismi e della temperatura assicurando che ogni zona del reattore si trovi nelle medesime condizioni operative. Essa, inoltre, facilita il passaggio in fase gas dei metaboliti di reazione. La miscelazione comunemente viene promossa da un dispositivo meccanico posto all'interno dell'ambiente di reazione. Non è necessario avere una miscelazione continua: può essere sufficiente un'agitazione giornaliera, per esempio 3-6 volte al giorno della durata di 1 ora.

1.3 Da cosa si ottiene il biogas? Le biomasse di partenza

Il termine biomassa include un vasto numero di materiali, con proprietà anche molto differenti, aventi in comune la loro origine biologica, quindi derivante dal processo di fotosintesi basato sulla conversione dell'energia solare e dell'anidride carbonica dell'atmosfera in molecole organiche complesse, ad alto potere calorifico. La biomassa è dunque una fonte di energia rinnovabile che si presta a essere facilmente impiegata per la combustione, negli stessi sistemi di conversione elettrica sviluppati per i combustibili fossili. Rispetto a questi ultimi, presenta il vantaggio di restituire all'atmosfera la sola anidride carbonica sequestrata precedentemente con i processi di fotosintesi.

La produzione di biogas mediante digestione di biomassa algale o codigestione di deiezioni animali e scarti vegetali costituisce un metodo innovativo e utile per ricavare energia con i vantaggi di ricavare energia da biomasse di scarto e di non dover ricorrere a tecniche di smaltimento, ma a soli eventuali pre-trattamento per rendere lo scarto digeribile anaerobicamente.

In Tabella 1.5 si riporta la resa media in biogas per tipologia di substrato, come contenuto di solidi totali.

Tab. 1.5 - Resa in biogas (m³ per ton di solidi volatili) di biomasse e scarti organici.

Materiali	m³ biogas/t SV
Deiezioni animali (suini, bovini, avicunicoli)	200 - 500
Residui colturali (paglia, colletti barbabietole..)	350 - 400
Scarti organici agroindustria (siero, scarti vegetali, lieviti, fanghi e reflui di distillerie, birrerie e cantine..)	400 - 800
Scarti organici macellazione (grassi, contenuto stomacale ed intestinale, sangue, fanghi di flottazione...)	550 - 1000
Fanghi di depurazione	250 - 350
Frazione organica rifiuti urbani	400 - 600
Culture energetiche (mais, sorgo zuccherino...)	550 - 750

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

Una stima delle biomasse utilizzabili in Italia, espressa in tonnellate per anno (t/a), è la seguente:

- deiezioni animali : 187.000.000 t/a.
- scarti agro- industriali: 12.000.000 t/a.
- scarti di macellazione: 2.000.000 t/a.
- fanghi di depurazione: 2-3.000.000 t/a.
- frazione organica dei R.U.: 9.000.000 t/a.
- residui colturali: 10.000.000 t SS/a
- colture energetiche: 230.000 ettari

La scelta di una fonte piuttosto che un'altra si effettua sulla base della resa di metano, la facilità nel reperirla, il valore economico di questa e la sua attitudine alla lavorazione.

Il substrato da utilizzare per il processo di digestione, può essere caratterizzato in termini di solidi totali (TS), di solidi totali volatili (TVS), oppure come domanda chimica di ossigeno (COD) o domanda biochimica di ossigeno a 5 giorni (BOD₅):

- **TS** (solidi totali): contenuto in sostanza secca di un campione, determinato per essiccamento in stufa a 105°C per 24 ore;
- **TVS** (solidi totali volatili): massa di sostanza secca volatilizzata in seguito alla combustione a 550°C fino a peso costante;
- **COD** (domanda chimica di ossigeno): quantità di ossigeno consumata per l'ossidazione della sostanza organica. Viene determinata utilizzando un forte agente ossidante (in genere dicromato di potassio) in ambiente acido;
- **BOD₅** (domanda biochimica di ossigeno a 5 giorni): quantità di ossigeno consumata in 5 giorni, in condizioni controllate, per l'ossidazione biologica della sostanza organica.

1.4 Impianti di produzione di biogas

Il biogas viene prodotto in digestori, che di fatto sono bioreattori in cemento o in acciaio, operati in aerobiosi, evitando quindi qualsiasi immissione d'aria dall'esterno, garantendo una minima sovrappressione, conseguente alla produzione del biogas. Il digestore è operato in continuo o in fed-batch e le condizioni operative di pH sono mantenute fra 6.5 e 7.5.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

In Figura 1.6 viene riportato lo schema dell'intero processo da cui si evince che a valle della digestione anaerobica, oltre al biogas prodotto, il digestato residuo viene separato nelle due frazioni liquide, utilizzabile per irrigazione e solido riutilizzabile come fertilizzante biologico.

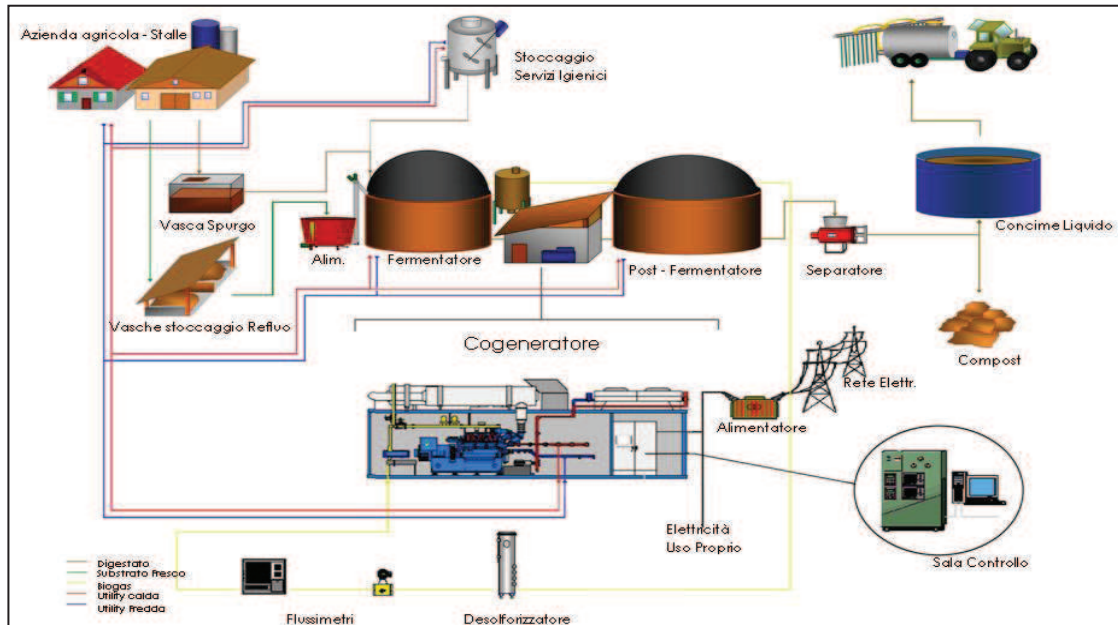


Fig. 1.6 - Schema del processo di digestione anaerobica.

1.4.1 Parametri di gestione del processo

Per una corretta gestione di un processo di digestione anaerobica è necessario definire e tenere sotto controllo dei parametri di riferimento. Di primaria importanza sono i tempi di permanenza della biomassa nel digestore, la concentrazione microbica e la resa di biogas prodotto.

Il *tempo medio di residenza idraulico* (HRT) è il rapporto tra volume del reattore V [m^3] e portata di alimentazione Q [$m^3/giorno$]. Rappresenta quindi il tempo, espresso in giorni, di permanenza di ciascun elemento fluido all'interno del digestore:

$$HRT = \frac{V}{Q}$$

Il *tempo medio di residenza dei fanghi* (SRT) è il rapporto tra la massa totale dei solidi volatili nel reattore e la portata di solidi estratta dallo stesso:

$$SRT = \frac{V \cdot X}{W}$$

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

dove V è il volume reattore [m^3], X è la concentrazione dei solidi volatili nel reattore [$kgTVS/m^3$] e W è la portata di sostanza volatile estratta dal reattore [$kgTVS/giorno$].

Il *carico organico volumetrico* (OLR) è il rapporto tra la quantità di substrato alimentata e il volume del reattore. In genere ci si riferisce al volume utile del reattore e la biomassa può essere espressa in diversi modi (TS, TVS):

$$OLR = \frac{Q \cdot S}{V}$$

dove Q è la portata in alimentazione [$m^3/giorno$], S è la concentrazione di substrato nella portata in ingresso al reattore [kg/m^3] e V è il volume del reattore [m^3].

Il *fattore di carico organico* (CF) è il rapporto tra la quantità di substrato in ingresso al reattore e la quantità di sostanza volatile per unità di tempo:

$$CF = \frac{Q \cdot S}{V \cdot X}$$

dove Q è la portata in alimentazione [$m^3/giorno$], S è la concentrazione di substrato nella portata in ingresso al reattore [kg/m^3], V è il volume del reattore [m^3], X è la concentrazione dei solidi volatili nel reattore [$kgTVS/m^3$].

La *produzione specifica di gas* (SGP) è la quantità di biogas prodotta per quantità di sostanza volatile alimentata al reattore. Tale parametro dipende strettamente dalla biodegradabilità del substrato:

$$SGP = \frac{Q_{biogas}}{Q \cdot S}$$

dove Q_{biogas} è la portata del biogas prodotto [$m^3/giorno$]; Q è la portata in alimentazione [$m^3/giorno$]; S è la concentrazione di biomassa nella portata in ingresso al reattore [kg/m^3].

La *velocità di produzione del biogas* (GPR) è la portata di biogas prodotta rispetto al volume del reattore:

$$GPR = \frac{Q_{biogas}}{V}$$

dove Q_{biogas} è la portata di biogas prodotto [$m^3/giorno$] e V è il volume del reattore [m^3].

1.4.2 Tipi di impianti di produzione del biogas

Esistono varie tipologie di impianti idonei alla produzione di biogas e indirizzati a trattare matrici organiche differenti, liquide o solide. Quelli di uso e applicazione più frequenti sono assimilabili a tre distinte tipologie, aventi ciascuna caratteristiche particolari e per questo adatte a specifiche realtà aziendali (*Chynoweth et al., 2003*).

1.4.2.1 Impianto tipo plug-flow

L'impianto plug-flow può essere utilizzato per il trattamento dei liquami zootecnici e dei reflui agro-zootecnici. In ogni caso è necessaria una preventiva separazione dei solidi grossolani, non biodegradabili in tempi tecnici ragionevoli, utilizzando nel processo anaerobico solo la frazione liquida. Il digestore è assolutamente privo di organi di miscelazione interni. L'effetto di separazione dei solidi sedimentabili rispetto alla frazione liquida del liquame, dovuto alla mancanza di agitazione nel digestore, provoca un vantaggioso risultato di aumento dei tempi di ritenzione della frazione solida rispetto alla frazione liquida. Tale fenomeno, infatti, consente di allontanare più velocemente dal digestore la frazione liquida, che contiene le sostanze prontamente disponibili per la digestione e di trattenere all'interno del digestore le molecole più complesse per un tempo superiore, permettendo ai batteri di demolirle e renderle comunque disponibili per la trasformazione in biogas. I solidi comunque raggiungeranno la sezione di uscita del digestore sfruttando l'effetto del moto di risalita provocato dal biogas e dalla continua immissione di substrato fresco. In condizioni mesofile occorre un HRT di 18-20 giorni. Tale impianto risulta particolarmente adatto per aziende con allevamenti di medie e grandi dimensioni che intendono ridurre l'impatto ambientale indotto dalla propria attività zootecnica producendo nel contempo energia con lo scopo di utilizzarla quasi totalmente per i propri fabbisogni.

1.4.2.2 Impianto tipo CSTR

Un impianto CSTR è adatto alla digestione anaerobica di deiezioni liquide e solide ed è dotato di un sistema di miscelazione ad elica (*Mata-Alvarez et al., 2000*). Il digestore viene alimentato giornalmente con liquame fresco, mentre il liquame digerito esce dopo un tempo medio di permanenza nella vasca di circa 20/25 giorni. È anche possibile dividere il volume di digestione

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

in due reattori, uno primario e uno secondario, adatti a far avvenire in modo più controllato le fasi acidogena e metanigena. Tale impianto risulta particolarmente adatto ad allevamenti che vogliono gestire i liquami come unico prodotto omogeneo e trarre il maggiore rendimento in termini energetici e quindi economici, poiché grazie al mantenimento di tutta la frazione solida presente nelle deiezioni si incrementa la produzione di biogas. Restano, anche per questo impianto, validi notevoli vantaggi ambientali.

1.4.2.3 Impianto costituito da più bioreattori

Di norma l'impianto prevede due digestori, uno primario e uno secondario. Il digestore primario cilindrico è dotato di un particolare miscelatore ad asse orizzontale che garantisce la completa miscelazione dei liquami e della biomassa ed è alimentato costantemente con liquame fresco e biomassa secondo un piano di carico prestabilito in funzione delle composizioni e caratteristiche dei vari complementi di apporto. Il liquame digerito, dopo un tempo medio di permanenza nella vasca di circa 25 giorni, viene trasferito nel digestore secondario, a sua volta miscelato e in grado di recuperare la residua quantità di biogas. Il tempo di permanenza nel secondo digestore risulta pari a circa 30/40 giorni.

In generale nei processi con un unico bioreattore, le fasi biologiche della digestione, idrolisi/acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi, hanno luogo contemporaneamente. Pertanto, la fase più lenta del processo costituisce l'elemento di dimensionamento del reattore.

Nei processi a due fasi si hanno due reattori distinti, posti in serie tra loro, ciascuno dedicato a una tipologia di reazioni: nel primo hanno luogo i fenomeni di idrolisi/acidogenesi e acetogenesi mentre nel secondo si sviluppa la fase metanigena. Ciò permette di associare opportuni tempi di residenza del substrato nel reattore in virtù delle diverse cinetiche dei ceppi microbici connessi alle due diverse fasi.

La Figura 1.7 riporta una rappresentazione di processi a una e due fasi in reattori completamente miscelati:

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

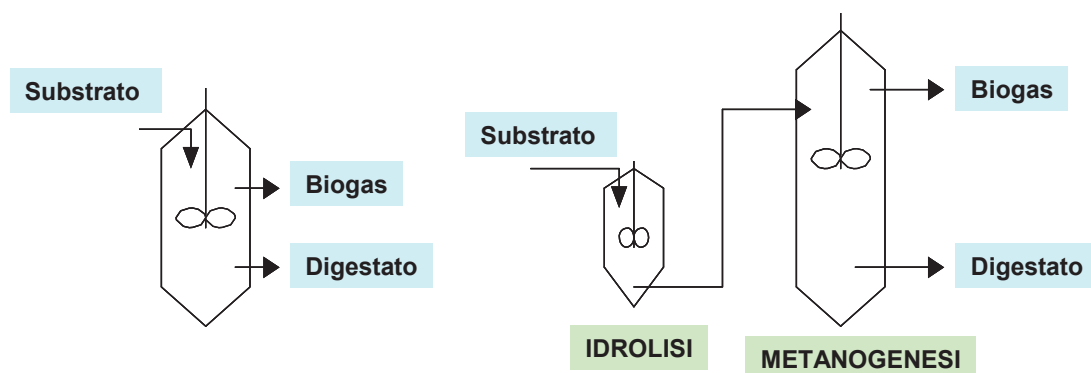


Fig. 1.7 - Processo a una e a due fasi.

1.5 Diffusione degli impianti di biogas in Europa

La produzione di biogas nella UE sta registrando un forte incremento: è raddoppiata negli ultimi quattro anni, con sforzi particolarmente rilevanti compiuti da Gran Bretagna e Germania. Sulla base dell'attuale andamento si stima che la produzione al 2013 raggiungerà i 10 Mtep. Un valore rilevante, ma che tuttavia è molto lontano dagli obiettivi prefissati. Infatti, nel 1997 si fissava a 15 Mtep il valore da raggiungere nel 2010 per i 15 Paesi che allora componevano l'Unione Europea. I metodi attraverso i quali è prodotto il biogas e le tecnologie di valorizzazione impiegate sono variabili da Paese a Paese. Nel 2006 il 58% della produzione primaria di biogas veniva realizzata nelle discariche (rappresentate in verde chiaro in Figura 1.8), il 18% nelle stazioni di depurazione dei rifiuti urbani (verde più scuro) e il 24% da altre fonti (verde scuro) quali impianti in aziende agricole, impianti di digestione anaerobica di rifiuti organici urbani e impianti centralizzati di codigestione che operano su rifiuti e sottoprodotti di diversa provenienza.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

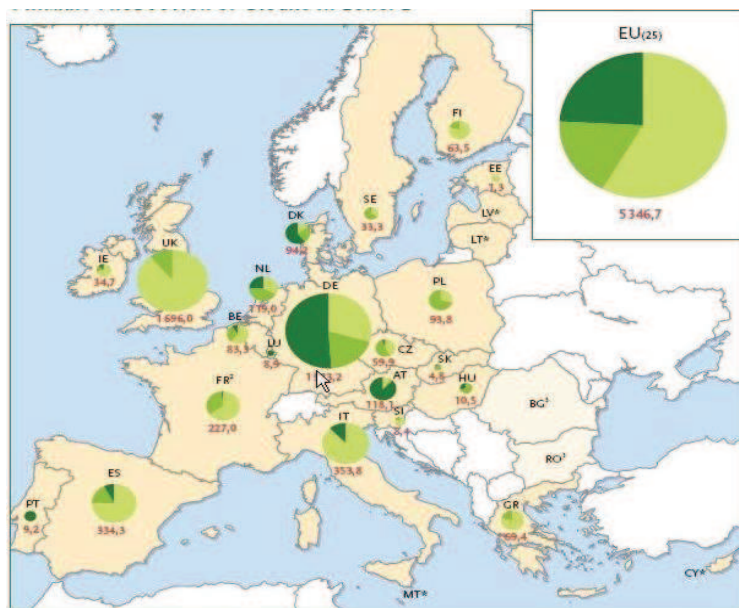


Fig. 1.8 - Substrati da cui si ottiene il biogas nella UE.

Il recupero di biogas dalle discariche per rifiuti rappresenta in Europa, e in particolare in Gran Bretagna, la più importante fonte di energia alternativa da biomasse. In Germania lo sviluppo della produzione di biogas nel 2006 è basata principalmente su 3600 digestori anaerobici agricoli di media e piccola dimensione che operano nella produzione di elettricità in unità di cogenerazione (produzione di elettricità e di calore). Il successo deriva dalla presenza di numerose imprese specializzate in impianti di produzione di biogas. Circa il 94% degli impianti di biogas operano in *codigestione*, trattando assieme ai liquami zootecnici altri substrati organici, scarti dell'agroindustria, scarti domestici e della ristorazione, colture energetiche (mais, barbabietola da foraggio, patate ecc.) e residui colturali. In Danimarca, la produzione di biogas viene realizzata principalmente da 20 impianti consortili di codigestione anaerobica che trattano liquami zootecnici, residui organici industriali. La Svezia ha sviluppato un proprio originale sistema di valorizzazione del biogas. Il settore in questo Paese non è solamente incentrato sulla produzione di energia elettrica e calore attraverso impianti di cogenerazione, ma anche sulla produzione di carburante per veicoli e sull'immissione nella rete del gas naturale. La maggior parte del biogas proviene dagli impianti di depurazione, ma la sua valorizzazione non è solo per la produzione di elettricità e di calore. Il 17% circa del biogas è infatti destinato alla produzione di biocarburanti, percentuale che salirà entro l'anno

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 1 – Il biogas: stato dell'arte

a oltre il 21%. A fine 2005 la Svezia disponeva di 779 autobus a biogas e di oltre 4500 vetture utilizzanti un carburante composto da una miscela di biogas. È in servizio anche un treno alimentato esclusivamente a biogas (*Flaccovio et al., 2007*).

L'Italia in Europa è il terzo produttore di biogas, ma considerando la produzione primaria per 1000 abitanti l'Italia è solamente al dodicesimo posto, con 6.1 tep/1000 abitanti. Secondo le stime ENEA nel 2006 la stragrande maggioranza della produzione di biogas, l'88% era realizzata a partire dalle discariche, ma successivamente hanno cominciato a diffondersi impianti di digestione anaerobica nelle aziende agricole. La Figura 1.8 mostra dove sono localizzati i principali impianti per produrre biogas.

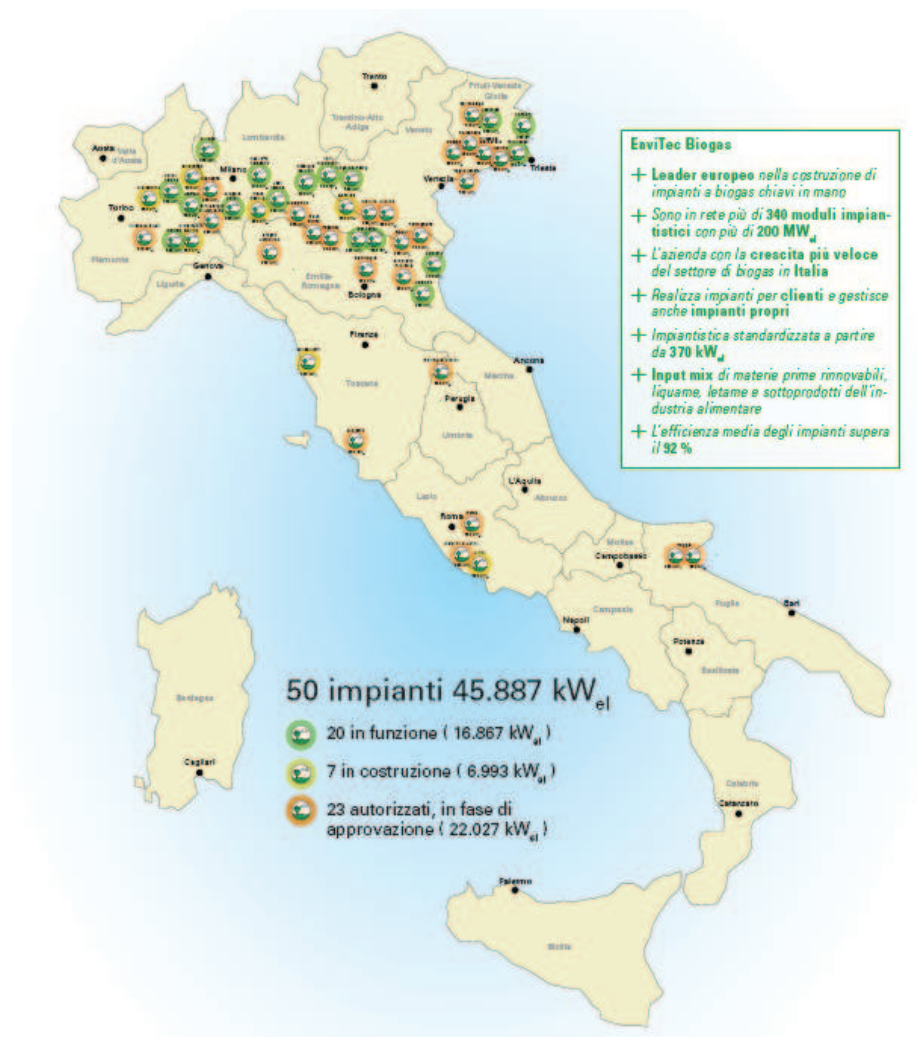


Fig.1.7 - Localizzazione dei principali impianti di biogas italiani (ENEA, Censimento biomasse 2006).

Capitolo 2

Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

2.1 Biogas dalle microalghe

La digestione anaerobica costituisce una tecnica utile alla produzione di energia da alghe, nonché una possibile via per consentire il riciclo dei nutrienti alle unità di coltivazione. Infatti, mentre le microalghe presentano elevate produttività in lipidi rispetto ad altre biomasse, richiedono, tuttavia, l'impiego di ingenti quantità di fertilizzanti, fino a 50-100 volte la quantità richiesta, ad esempio, per la coltivazione della colza, con significativi impatti ambientali ed economici (Halleux et al., 2008). Parimenti, la digestione anaerobica, oltre a ridurre l'impiego dei nutrienti, trasforma i residui dall'estrazione di lipidi (ed eventuali altri prodotti) da un rifiuto da smaltire in una fonte di gas metano combustibile: ciò consente ulteriormente di controbilanciare i costi di produzione di biofuels. I prodotti teorici della digestione da biomassa algale sono CH₄, CO₂ e NH₃, le cui quantità relative dipendono dalla composizione elementare della microalga processata e, quindi, dalla specie impiegata (Sialve et al., 2009). Mediamente è stata osservata una produttività in metano compresa fra il 60 e il 75%, con tempi di residenza di 15-30 giorni e resa in metano pari a 0.3 l_{CH₄}/g alga. Una sintesi dei dati essenziali per alcune specie microalgali è contenuta nella Tabella 2.1.

Tab. 2.1 - Composizione di alcune microalghe e rese teoriche in metano e N-NH₃ dopo la digestione anaerobica (Sialve et al., 2009).

Specie algale	Proteine [%]	Lipidi [%]	Carboidrati [%]	Metano [L CH ₄ /g VS]	N – NH ₃ [mg/g VS]
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18	0.53-0.8	54.3-84.9
<i>Chlamydomonas rein.</i>	48	21	17	0.69	44.7
<i>Chlorella pyr.</i>	57	2	26	0.8	53.1
<i>Chlorella vulg.</i>	51-58	14-22	12-17	0.63-0.79	47.5-54.0

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

<i>Dunaliella sul.</i>	57	6	32	0.68	53.1
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16	0.63-0.74	55.9-66.1
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14	0.47-0.69	42.8-58.7
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	0.59-0.69	46.6-42.2

Aumentando la temperatura fino a 50 °C si favorisce la conversione in metano, mentre la produttività (in termini di riduzione della biomassa) migliora fino a 35 °C. Tuttavia, oltre tale temperatura la biodegradabilità delle alghe aumenta solo del 5-10% rendendo poco conveniente energeticamente un ulteriore riscaldamento.

Altri parametri operativi importanti sono il tempo di residenza (HRT) e la velocità di carica: il primo deve essere sufficientemente alto per consentire lo sviluppo delle reazioni coinvolte, il secondo più contenuto possibile per evitare che si creino resistenze alla rottura delle celle microalgali e alla bioconversione della materia organica. In tal senso, l'applicazione, prima del trattamento, di processi di estrazione (di lipidi o altre sostanze) che alterino lo stato fisico delle celle, agevola la digestione. La Tabella 2.2 mostra i risultati della digestione anaerobica di alcune specie microalgali, in termini di resa in metano e percentuale di metano nel biogas, con riferimento alle condizioni di temperatura, tempo di residenza nel digestore (HRT) e velocità di carico come parametri operativi (Sialve et al., 2009).

Tab. 2.2 - Dati relativi alla digestione anaerobica di alcune microalghe (Sialve et al., 2009).

Substrato	T [°C]	HRT [giorni]	Velocità di carico [g _{secco} /NL giorno]	Resa in CH ₄ [NL CH ₄ /g _{secco}]	CH ₄ [%]
Fango di <i>Chlorella sc.</i>	35-50	30	1.44 – 2.89	0.17 – 0.32	64
<i>Spirulina</i>	35	28	1	0.42	72
<i>Dunaliella</i>	35	28	0.91	0.32	
<i>Tetraselmis</i>	35	14	2	0.31	72
<i>Tetraselmis</i> (secca)	35	14	2	0.26	72-74
<i>Tetraselmis</i> (secca) + NaCl 35 g/l	35	14	2	0.25	72-74
<i>Chlorella vulg.</i>	28-31	64		0.31 – 0.35	68-75
<i>Spirulina max.</i>	35	33	0.97	0.26	68-72
<i>Chlorella</i> + <i>Scenedesmus</i>	35	10	2-6	0.09 – 0.136	69

La coltivazione delle alghe sotto stress nutritivo, in particolar modo in carenza di azoto, favorisce la produzione di metano: è infatti aumentata la produzione di lipidi che hanno stechiometricamente rese superiori rispetto a proteine e carboidrati. L'estrazione di lipidi per la produzione di biofuel mostra un impatto positivo sul bilancio energetico: la somma del

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

contenuto energetico dei lipidi e del metano prodotto dalla digestione dei residui dell'estrazione è superiore rispetto alla digestione diretta (*Illman et al., 2000*).

Tuttavia, a causa della diminuita produzione di metano (avendo sottratto i lipidi) si riscontra un eccesso di ammonio che può costituire un elemento inibitore della digestione: per ridurne la concentrazione è necessario operare una co-digestione con un substrato povero di azoto, al fine di regolare, come anzidetto il rapporto C/N a valori ottimali per la digestione, ovvero tra 20 e 30 (*Sialve et al., 2009*): vi sono evidenze sperimentali date dalla co-digestione di residui della carta (*Yen & Brune, 2007*).

Laddove si vuole utilizzare biomassa algale, si può, quindi, sia trattare la biomassa tal quale sia ciò che residua dopo l'estrazione della frazione lipidica per la produzione di biodiesel.

Dal momento che le microalghe non contengono amminoacidi solforati, non si riscontra la presenza di H₂S tra i prodotti; è tuttavia ragionevole riscontrare nel biogas la presenza di ammoniaca NH₃ considerato l'elevato contenuto di proteine. La rimozione dell'NH₃ può consentirne il reimpiego nell'impianto di coltivazione e altresì libera il metano predisponendolo a un ulteriore impiego a scopi energetici. Sono, tuttavia, presenti in commercio turbine almeno fino ad 1MW (Capstone o Turbec) capaci di impiegare biogas tal quale con efficienze elettriche fino al 30% e termiche fino al 70%.

Il contenuto di energia del biogas prodotto dalla digestione anaerobica varia tra 16200 kJ m³ e 30600 kJ m³ in base alla natura della biomassa di partenza. Tipicamente la resa di biogas è di 0.15-0.65 m³ per kg di biomassa secca. Assumendo valori medi del contenuto di energia e della resa, la produzione di biogas da biomassa microalgale dopo l'estrazione dell'olio fornisce almeno 9360 MJ di energia per ton³, sufficiente a sostenere energeticamente il processo di produzione del biodiesel dalle microalghe (*Chisti, 2008*). Inoltre, la biomassa residua dopo la digestione anaerobica può essere ulteriormente processata per ottenere fertilizzanti (*Harun et al., 2010*).

Non esistono ancora oggi impianti di produzione di biogas da microalghe su scala industriale, mentre esistono impianti che usano macroalghe come biomassa di partenza. Un esempio è rappresentato dall'impianto della National Oceanographic and Atmosphere Administration a Galverston, nel Texas (Figura 2.1).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

In Giappone la ricerca sulla produzione di energia dalla biomassa marina è stata condotta già dal 1981 al 1983, impiegando la specie *Lamniaria japonica*. Tali studi sono riaffiorati in tempi più recenti e fertili per la materia, riproponendo la coltivazione di macroalghe marine presso impianti dedicati off-shore col fine di produrre elettricità mediante i biogas prodotti da digestione anaerobica. In prossimità di questi le alghe sono, quindi, raccolte e inviate a terra mediante il trasporto via nave. Per sostenere la richiesta di nutrienti è stato proposto il pompaggio di acqua marina dalle profondità, dove si riscontra una concentrazione maggiore di sostanze che ausiliano la crescita della biomassa. L'invio delle macroalghe prodotte alla digestione anaerobica ne tollera l'elevata umidità (che raggiunge anche il 90% in massa del raccolto, ipotizzando un sito dedicato alla coltivazione di *Lamniaria japonica*) e apre le porte alla conversione di biogas in elettricità.

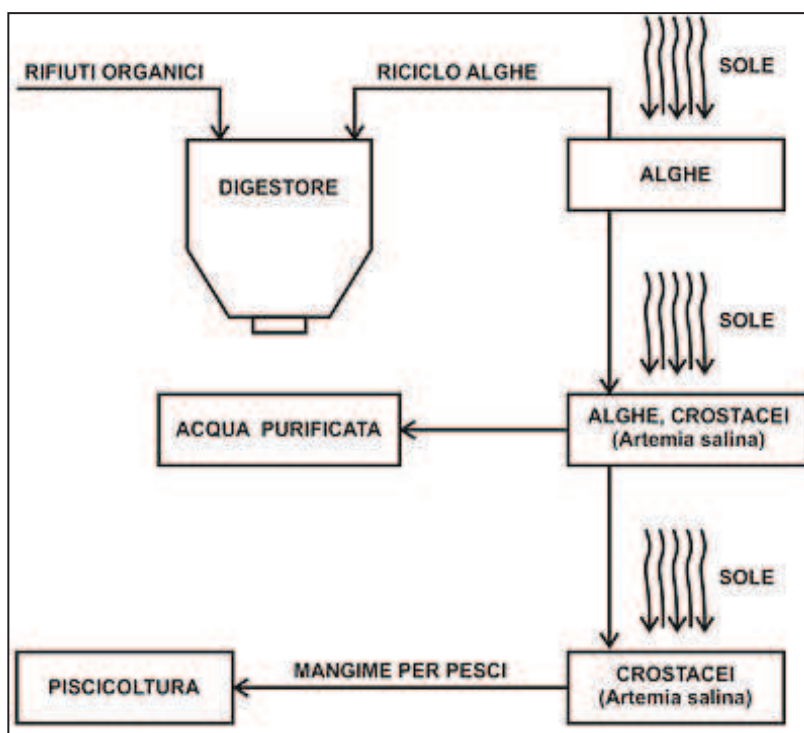


Fig. 2.1 - Schema di impianto della National Oceanographic and Atmosphere Administration a Galverston, nel Texas: mediante la luce solare e le alghe, i rifiuti nutrono i crostacei e purificano l'acqua.

In letteratura (Chynoweth et al., 1993) sono riportate rese in metano nell'intorno di $0.25-0.28 \text{ Nm}^3=\text{Kg}_{\text{secco}}$ per la specie *Laminaria japonica* e $0.39-0.4 \text{ Nm}^3=\text{Kg}_{\text{secco}}$ per *Macrocystis pyrifera*, $0.26-0.38 \text{ Nm}^3=\text{Kg}_{\text{secco}}$ per *Sargassum*. L'efficienza della bioconversione (ovvero la quantità di energia recuperata nella forma di metano rispetto a quella immessa nella forma di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

macroalga) presenta variabilità in funzione del tempo di ritenzione, con picchi dopo 7 settimane nell'intorno del 60%. Ulteriori dati sono contenuti nella Tabella 2.3. Uno studio, basato su tali presupposti, ha stimato che la produzione di 1Mt di macroalghie in prossimità di nove siti dedicati lungo le coste giapponesi, potrebbe consentire la generazione di oltre 1000 GWh/anno, con una mitigazione della CO₂ pari a 1.04 Mt/anno (Mazzitelli, 2010).

Tab. 2.3 - Biodegradabilità mediante digestione anaerobica di macroalghie marine (Chynoweth et al., 1993).

Specie	Efficienza di conversione [% kg secco]	Resa in Metano [Nm ³ CH ₄ /kg secco]
<i>Gracilaria</i>	50 – 62	0.25 – 0.31
<i>Laminaria</i>	46 – 60	0.23 – 0.30
<i>Macrocystis</i>	34 – 80	0.14 – 0.40
<i>Sargassum</i>	12 – 30	0.06 – 0.19
<i>Ulva</i>	62	0.31

2.2 Descrizione dei digestori presenti nel Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie (UNICAL) e realizzazione di nuovi digestori in scala da laboratorio

Presso il Laboratorio di Fenomeni di Trasporto e Biotecnologie sono stati messi a punto, negli anni scorsi, dei digestori in scala da laboratorio e pilota per la conduzione di prove di codigestione di deiezioni animali e rifiuti di origine vegetale, quali sansa di olive e pastazzo di arance residuo dell'industria agrumaria (Aversa et al., 2008).

Un sistema impiegato in passato è riportato in Figura 2.2, ove il sistema di digestori è montato solidalmente con una ghiera collegata a singoli miscelatori a palette, così da avere la stessa agitazione nei singoli bireattori.



Fig. 2.2 - Sistema di bioreattori solidali.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Tale sistema è costituito da 5 contenitori in vetro dotati di tappo a chiusura ermetica aventi capacità di 1 litro. Sul tappo sono presenti due fori dai quali è possibile effettuare il prelievo del biogas (mediante una siringa munita di ago) e del liquido. All'interno di ogni reattore è calettato un albero in acciaio, attrezzato con due eliche in alluminio al fine di miscelare il substrato. Il movimento delle eliche è assicurato da un sistema composto da un coperchio in bronzo lucidato a specchio e da un organo meccanico che, attraverso una catena, permette il movimento degli agitatori. Dopo aver valutato che le prove di digestione hanno una durata non inferiore a 15 giorni, avere 5 digestori consente di condurre più prove di fermentazione in parallelo e quindi, a parità di tempo, di effettuare uno studio al variare di più condizioni operative. In tale sistema sono stati condotti test sperimentali su diverse alimentazioni, ottenute variando la percentuale di pastazzo d'arance fino al 50%. Si è osservato che l'alimentazione col 15% di pastazzo mostra un incremento significativo in biogas.

Tale apparato di digestione possiede tutti i requisiti tecnici necessari per la conduzione delle prove di interesse (produzione preliminare di biogas dalle microalghe in scala da laboratorio) cioè sistema meccanico di agitazione, punto di prelievo del liquido e punto di prelievo del gas. Il sistema considerato presenta, però, un grande difetto: non è provvisto di nessun dispositivo che permetta il controllo della temperatura. Tale parametro è di importanza fondamentale poiché influenza l'attività dei microrganismi fermentanti e quindi la resa del biogas. Pertanto, tali digestori sono ottimi se la temperatura di esercizio è prossima a quella ambiente, poco efficienti per temperature di lavoro molto diverse da 25°C (nelle prove da realizzare $T \approx 37^\circ\text{C}$).

In Figura 2.3 è riportato il sistema utilizzato per testare la codigestione di letame e sansa in proporzioni variabili. Il sistema è costituito da due bioreattori in metallo da 15 litri, termostati mediante serpentina posta all'esterno del digestore. I due digestori sono attraversati da un albero ruotante cui sono calettate delle palette, per garantire una agitazione uniforme, per come regolato dal motore, che consente di garantire una agitazione di 15 rpm per 15 min con intervallo di 1 ora e 45 minuti. Il gas viene raccolto in due serbatoi da 100 litri collegati a tenuta con il digestore. Il sistema è corredato da una termo criostato per regolare la temperatura del digestore, unità di controllo e regolazione pH e sistema di prelievo campioni. Il gas prodotto viene misurato mediante misuratore portatile, che consente di monitorare CH_4 e CO_2 .

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali



Figura 2.3 - Digestori da laboratorio per la produzione di biogas mediante co-digestione di letame e sansa di olive.

La digestione viene condotta simultaneamente nei due bioreattori: nel primo viene caricato il solo letame, nel secondo la miscela letame più sansa. Sono state variate le proporzioni relative tra i due substrati e in Tabella 2.4 viene riportato il risultato relativo alla prestazione più significativa, relativa al 5% di sansa che porta un incremento di oltre il 30% in metano (Calabrò *et al.*, 2011).

**Tab. 2.4 - Valutazione comparativa delle prestazioni dei due digestori.
Sansa C/N = 69.53, Reflui bovini C/N =25.16.**

Condizioni operative	Bioreattore 1	Bioreattore 2
Letame caricato, % sul totale	100	95
Sansa caricata, % sul totale	0%	5
Temperatura di lavoro, °C	37	37
pH	7.80	7.58
Biogas, moli	8,44	11,21
BioMetano, moli	5.51	7.63
Biogas, N-litri	189.26	251.49
BioMetano, N-litri	123.65	171.01
Biometano, % giornaliera massima	81.5	88
Biometano, % giornaliera media	63	68
H ₂ S, ppm	2926	1890
Incremento in produttività di Biometano, %		33
Incremento in produttività di Biogas, %		38

Un terzo sistema di digestione (Figura 2.4) è costituito da tre bioreattori, ognuno dei quali presenta un volume di 23.7 dm³. Il prelievo del gas si effettua mediante la valvola posta nella parte superiore dei serbatoi. Per evitare che all'interno del sistema si raggiunga la pressione di bollo, è stata applicata una PSV che sfiata il gas contenuto quando la pressione raggiunge le 8 atm. Nei tre digestori vi è un sistema di agitazione costituito da un albero rotante al quale sono calettate delle pale. L'albero rotante è posto in senso trasversale rispetto all'asse del tank

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

poiché, dato che è più facile confinare un liquido che un gas, si evitano dei problemi di tenuta derivanti dalla necessità di praticare dei fori nei serbatoi. A circa 5 cm dalla base, sono presenti delle valvole a saracinesca che consentono il prelievo del liquido per eventuali analisi. Per regolare la temperatura della miscela reagente, ogni digestore è stato avvolto con un tubo in PVC, che forma all'incirca 30 spire, attraversato da un'utility calda.



Fig. 2.4 - Sistema di digestori in scala semi-pilota.

Infine, in laboratorio è presente un digestore in scala pilota (Figura 2.5).

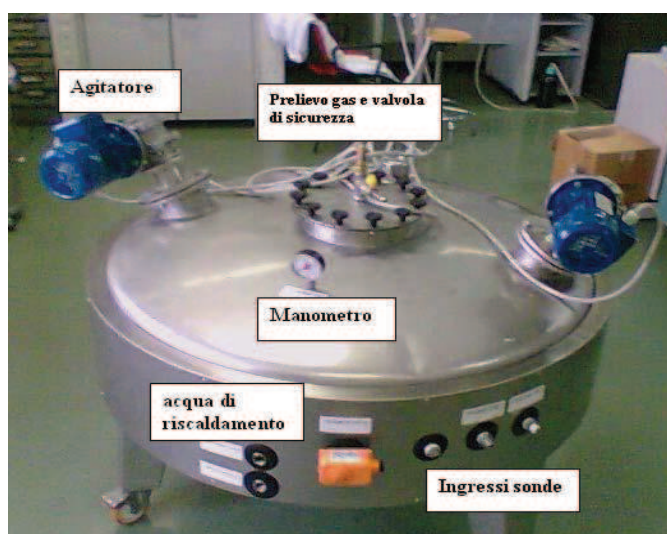


Fig. 2.5 - Digestore in scala pilota.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

La miscela di reazione viene caricata attraverso un oblò del diametro di 30 cm posto nella parte superiore del reattore. Sulla “finestra” di carico vi sono due valvole: una consente il prelievo del gas e l'altra (PSV) permette di operare in condizioni di sicurezza evitando che il digestore possa collassare per elevata pressione. Lo scarico del liquido si effettua per mezzo di una valvola a saracinesca posta sotto la camera di reazione. L'esigenza della miscelazione è soddisfatta dalla presenza di due agitatori meccanici. Tutto il reattore è realizzato in acciaio inox ed è, quindi, idoneo a trattare sia eventuali substrati acidi che prodotti di reazione gassosi “aggressivi” come l'idrogeno solforato. La superficie laterale del reattore è coibentata con uno spessore di isolante pari a 4 cm, per ridurre al minimo le perdite di calore; in tal modo l'utility circolante in tubi posti lungo il perimetro del digestore (per evitare di intralciare il sistema di agitazione) e avente come scopo il controllo della temperatura, scambia calore quasi esclusivamente con il substrato. La rilevazione della temperatura, pressione e pH, avviene mediante apposita strumentazione posta sul reattore.

Tuttavia, l'impiego degli ultimi tre sistemi di digestione descritti è stato escluso per la produzione di biogas da microalghe in scala da laboratorio essenzialmente per i seguenti motivi:

- ✓ l'obiettivo della sperimentazione consiste anche nel condurre delle prove in continuo e questi sistemi non si prestano a tale utilizzazione;
- ✓ impossibilità di realizzare delle sperimentazioni in parallelo (nel caso del digestore in Figura 2.5);
- ✓ è richiesta una quantità di substrato di diverse decine di kg quando la disponibilità per la conduzione delle prove è di poche centinaia di g.

Tra tutti i sistemi di digestione analizzati, potrebbe trovare applicazione per il raggiungimento degli obiettivi prefissati quello riportato in Figura 2.2. Occorre, però, apportare delle modifiche di funzionamento al fine di evitare l'inconveniente sul controllo della temperatura descritto precedentemente. A tale scopo si è pensato di eliminare il sistema di agitazione annesso ai bioreattori sostituendolo con una miscelazione promossa esternamente mediante un sistema di shaking presente in un bagno termostato. Così facendo, la problematica riguardante la temperatura di esercizio sarebbe risolta.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Un altro miglioramento apportato al sistema riguarda le modalità di prelievo sia del liquido che del gas. Mentre in origine c'erano due fori sul tappo, si è pensato di eliminarne uno e di fare entrambi i prelievi da un unico punto, riducendo in tal modo la probabilità di avere problemi di tenuta. L'idea è stata, quindi, quella di comporre dei bioreattori il cui schema è mostrato in Figura 2.6.

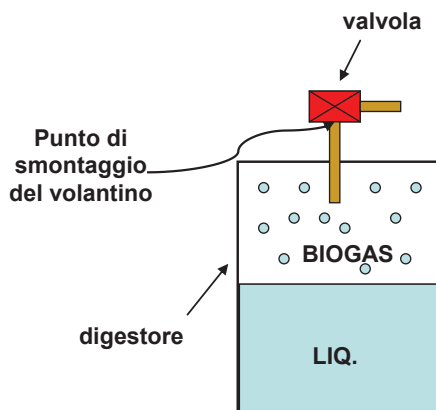


Fig. 2.6 - Schema di un digestore anaerobico in scala da laboratorio per la produzione di biogas dalle microalghe.

Tali sistemi possono funzionare in una configurazione continua o batch. I prelievi di gas e di liquido si eseguono attraverso la valvola a T presente nella parte superiore del reattore, la quale presenta il volantino smontabile. Tale sistema è stato collaudato da un punto di vista meccanico e tecnico mediante prove che simulavano la digestione anaerobica con lo scopo di individuare eventuali punti critici non emersi in fase di progettazione. Attraverso queste prove si ha avuto modo di verificare il funzionamento degli strumenti di misura (pressione, pH e composizione del gas). Conseguentemente è verificata la sua tenuta mediante prove di sovrappressione interna. I diversi sistemi sono stati poi alloggiati nel bagno termostato in condizioni di temperatura e agitazione controllate (Figura 2.7).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali



Fig. 2.7 - Digestori da laboratorio in esercizio.

Riassumendo, il sistema progettato consente di:

- fissare un grado opportuno di agitazione al fine di rendere omogenea la miscela di reazione e, quindi, di consentire una distribuzione uniforme del pH e della temperatura;
- gestire le variazioni del pH nella miscela di reazione attraverso il corpo della valvola;
- controllare la temperatura, mediante un bagno termostato;
- garantire la tenuta sia lato gas che lato liquido;
- effettuare dei prelievi, senza modificare la tenuta del reattore, sia di gas che di liquido.

2.3 Sperimentazione in laboratorio con una microalga povera di lipidi (*Spirulina maxima*)

2.3.1 Substrato della digestione anaerobica

La specie di microalga sottoposta alle prove preliminari di digestione anaerobica è la *Spirulina maxima*, un'alga verde-azzurra procariota, caratterizzata da filamenti elicoidali. Questa microalga è una ricca fonte di proteine, vitamine, acidi grassi (acido palmitico, acido linoleico e acido γ -linoleico) e carboidrati; per questo il principale uso che ne viene fatto è come integratore alimentare.

La sperimentazione è stata condotta anche su macroalghe essiccate povere di lipidi (*Wakame*, *Nori* e *Kombu*). La *Wakame* è un'alga bruna con un contenuto medio di proteine del 23% e di grassi dell'1%. Anche l'alga *Kombu* (*Laminaria Japonica*) appartiene alla classe delle alghe

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

brune e ha un tenore di lipidi dello 0.8%. Infine la *Nori* è un'alga rossa appartenente al genere *Porphyra* con un contenuto di lipidi pressoché trascurabile.

In Tabella 2.5 è riportata la composizione chimica di tutte le alghe (micro e macro) utilizzate nella sperimentazione preliminare:

Tab. 2.5 - Composizione chimica delle alghe usate.

	<i>Spirulina maxima</i>	<i>Nori</i>	<i>Wakame</i>	<i>Kombu</i>
CARBOIDRATI (% w/w)	10	70	76	89
PROTEINE (% w/w)	86	30	23	10.2
LIPIDI (% w/w)	4	0	1	0.8

La caratteristica comune alle varie tipologie di alghe usate è il ridotto tenore di lipidi. Nell'ottica dell'intero impianto di lavorazione delle alghe (crescita, raccolta, estrazione dei lipidi) la produzione di biogas rappresenta un potenziale sottoprodotto ottenibile dalle microalghe private dei lipidi. Pertanto, al fine di simulare tale situazione, sono state impiegate matrici microalgali già povere di lipidi. Si evidenzia che la letteratura scientifica riguardante la produzione di biogas mediante digestione anaerobica di substrati algali, fa riferimento solo a varietà di microalghe che hanno un contenuto in lipidi superiore al 20% e, quindi, da questo punto di vista tale sperimentazione rappresenta un primo approccio di analisi.

2.3.2 *Inoculo batterico*

Affinché il processo fermentativo possa iniziare, occorre un inoculo batterico. Nelle prove eseguite è stato utilizzato del letame bovino poiché contiene elevate quantità di microrganismi fermentanti. Quest'ultimo è stato disciolto in acqua; successivamente la sospensione di acqua e letame è stata filtrata e la soluzione ottenuta ha rappresentato il solvente nel quale introdurre le alghe. Una parametro da non trascurare nella sperimentazione è il tempo che intercorre tra la raccolta e l'utilizzazione del letame, poiché quest'ultimo è oggetto di fenomeni chimici e fisici che tendono a modificare in numero e in qualità le popolazioni batteriche in esso contenute e ciò influenza la digestione anaerobica.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

2.3.3 Condizioni operative

Le condizioni operative rivestono un ruolo di primaria importanza per lo svolgimento di una regolare attività microbica e quindi per una buona riuscita del processo. Per tali ragioni, la loro scelta non deve essere assolutamente arbitraria ma fondata su nozioni teoriche e sperimentali. Al fine di poter stabilire quali siano i valori da imporre al pH e alla temperatura è necessario conoscere in che misura queste due variabili influenzano lo sviluppo microbico.

Da un approfondito studio condotto su vari articoli scientifici, emerge che il valore di pH a cui si consiglia di operare è compreso tra 6 e 7, mentre la temperatura ottimale suggerita è 37°C.

La portata di substrato è stata scelta pari a 0.5 g/giorno, valore scelto in base a criteri di similitudine con altri casi analoghi presenti in letteratura. Alcuni articoli scientifici suggeriscono di alimentare al bioreattore oltre al substrato anche del glucosio, nei primi giorni in proporzione 1:1 e poi via via minore. Questa procedura, secondo quanto affermato da vari ricercatori, consentirebbe un repentino sviluppo dei microrganismi, avendo quest'ultimi a disposizione, sin da subito, una fonte di nutrimento "semplice". Per valutare l'influenza del glucosio sulla produttività di biogas, si è deciso di condurre alcune prove adottando tale accorgimento.

2.3.4 Piano sperimentale

Inizialmente sono state condotte delle prove qualitative in digestori del volume totale pari a 1060 ml nelle condizioni riportate in Tabella 2.6.

Tab. 2.6 - Prove preliminari qualitative.

	Volume inoculo	Alimentazione
Digestore 1	250 ml	0.5 g/d glucosio
Digestore 2	250 ml	0.5 g/d glucosio per 3 giorni + 0.25 g/d glucosio e 0.25 g <i>S. maxima</i> per successivi 5 giorni + 0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 3	250 ml	0.5 g/d glucosio per 3 giorni + 0.25 g/d glucosio e 0.25 g <i>S. maxima</i> per successivi 5 giorni + 0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 4	250 ml	0.5 g/d glucosio per 3 giorni + 0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 5	250 ml*	0.5 g/d <i>S. maxima</i>

* Acqua senza inoculo batterico

Successivamente sono stati condotti due cicli di prove "quantitative" in digestori del volume totale di 550 ml, nelle condizioni operative riportate nelle Tabelle 2.7 e 2.8.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Tab. 2.7 - Prove quantitative (I ciclo).

	Volume inolculo	Alimentazione
Digestore 1	250 ml	0.25 g/d glucosio per 3 giorni + 0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 2	250 ml	0.5 g/d glucosio per 3 giorni + 0.25 g/d glucosio e 0.25 g <i>S. maxima</i> per successivi 5 giorni + 0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 3	250 ml	0.5 g/d glucosio per 3 giorni + 0.25 g/d glucosio e 0.25 g <i>S. maxima</i> per successivi 5 giorni + 0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 4	250 ml	0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 5	250 ml	0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 6	250 ml	/

Tab. 2.8 - Prove quantitative (II ciclo).

	Volume inolculo	Alimentazione
Digestore 1	250 ml	10 g <i>S. maxima</i> (batch)
Digestore 2	250 ml	0.5 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 3	250 ml	1 g/d <i>S. maxima</i>
Digestore 4	250 ml	10 g <i>Nori</i> (batch)
Digestore 5	250 ml	10 g <i>Wakame</i> (batch)
Digestore 6	250 ml	10 g <i>Kombu</i> (batch)
Digestore 11	500 ml	1 g/d <i>S. maxima</i>

2.3.5 Risultati e discussione

2.3.5.1 Prove qualitative

Le prove qualitative (Tabella 2.6) sono state preliminari alla sperimentazione e hanno permesso di valutare l'effettiva produzione di biogas da un substrato povero di lipidi e i tempi necessari. In Figura 2.8 è riportato l'andamento nel tempo del pH nei cinque digestori.

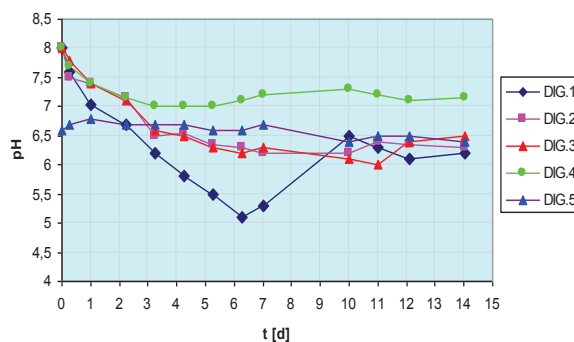


Fig. 2.8 - Andamento del pH nel tempo nei digestori usati per le prove preliminari qualitative.

Nella prima fase del processo fermentativo (idrolisi e acidificazione) il valore del pH tende a diminuire in quanto la velocità di produzione di acidi, ad esempio CH_3COOH derivante dalla

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

degradazione di zuccheri e proteine, risulta essere maggiore di quella di consumo degli stessi. In conseguenza di ciò, è stato necessario riportare il pH al valore ottimale mediante aggiunta di una soluzione di bicarbonato di sodio. Dal terzo giorno in poi, ad eccezione del Digestore 1, in cui alimentando quotidianamente glucosio si ha un'elevata produzione di acido acetico e quindi un maggiore accumulo che richiede più giorni per esser smaltito, il pH assume un valore pressoché costante, perché si ha la formazione di un sistema tampone costituito da acido carbonico e carbonato di ammonio. Nel quarto digestore, il pH tende a 7 in quanto, non avendo previsto un transitorio nella variazione di alimentazione del substrato da glucosio ad alghe, non si forma un'elevata quantità di CH_3COOH derivante dall'idrolisi del glucosio (molto probabilmente il pH si sarebbe abbassato dopo il tredicesimo giorno per via dell'idrolisi delle alghe). Il pH del Digestore 5 si mantiene costante al valore iniziale di circa 6.5. Ciò significa che in questo digestore non avviene alcun tipo di reazione. Tale risultato conferma le previsioni in merito, poiché la presenza di un inoculo batterico è indispensabile per l'avvio del processo di fermentazione.

In Figura 2.9 si riporta la composizione del biogas prodotto nei cinque digestori in funzione del tempo:

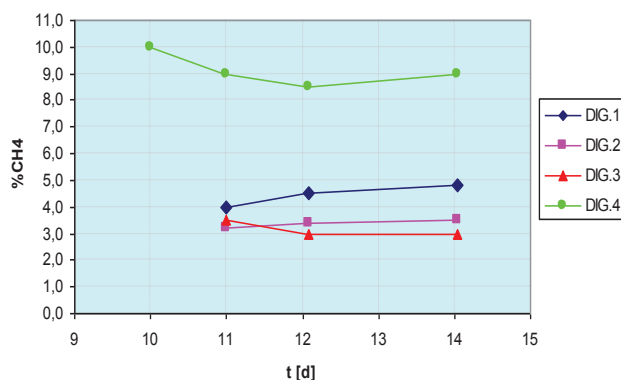


Fig. 2.9 - Andamento della percentuale di metano nel biogas prodotto nei digestori anaerobici.

La produzione di metano si registra a partire dal decimo giorno di digestione. Le prove sono state interrotte appena si ha avuto la certezza della presenza del biogas in ogni reattore.

2.3.5.2 Prove quantitative (I ciclo)

Gli andamenti del pH nei vari digestori in funzione del tempo sono riportati nelle Figure 2.10-2.12. Analogamente a quanto riscontrato nelle prove preliminari, anche in questo caso si ha

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

che nella prima fase del processo fermentativo (idrolisi e acidificazione) il valore del pH tende a diminuire in quanto la velocità di produzione di acidi, ad esempio CH_3COOH derivante dalla degradazione di zuccheri e proteine, risulta essere maggiore di quella di consumo degli stessi. Nei digestori 4 e 5 la variazione di pH risulta meno accentuata rispetto a quella che si registra nelle altre prove (infatti il pH non scende mai al di sotto di 6.5). Il motivo di questo risultato è connesso alla qualità dell'alimentazione ai reattori; mentre negli altri casi il substrato algale era accompagnato da una quantità variabile di glucosio (utilizzato per agevolare la riproduzione della popolazione batterica), nei digestori 4-5 l'alimentazione, sin dal primo giorno, era costituita da sole alghe. Dalla biochimica del processo si apprende, infatti, che il glucosio (e gli zuccheri in generale) si converte quasi interamente in acido acetico durante il processo idrolitico e ciò è causa di una maggiore acidità. In ogni caso, per riportare il pH al valore ottimale, si è addizionata, in volume variabile, una soluzione di bicarbonato di sodio. Tutte le curve tendono a un valore di pH pari a 6.5, per via della formazione di un sistema tampone costituito da acido carbonico e carbonato di ammonio che mantiene costante il pH.

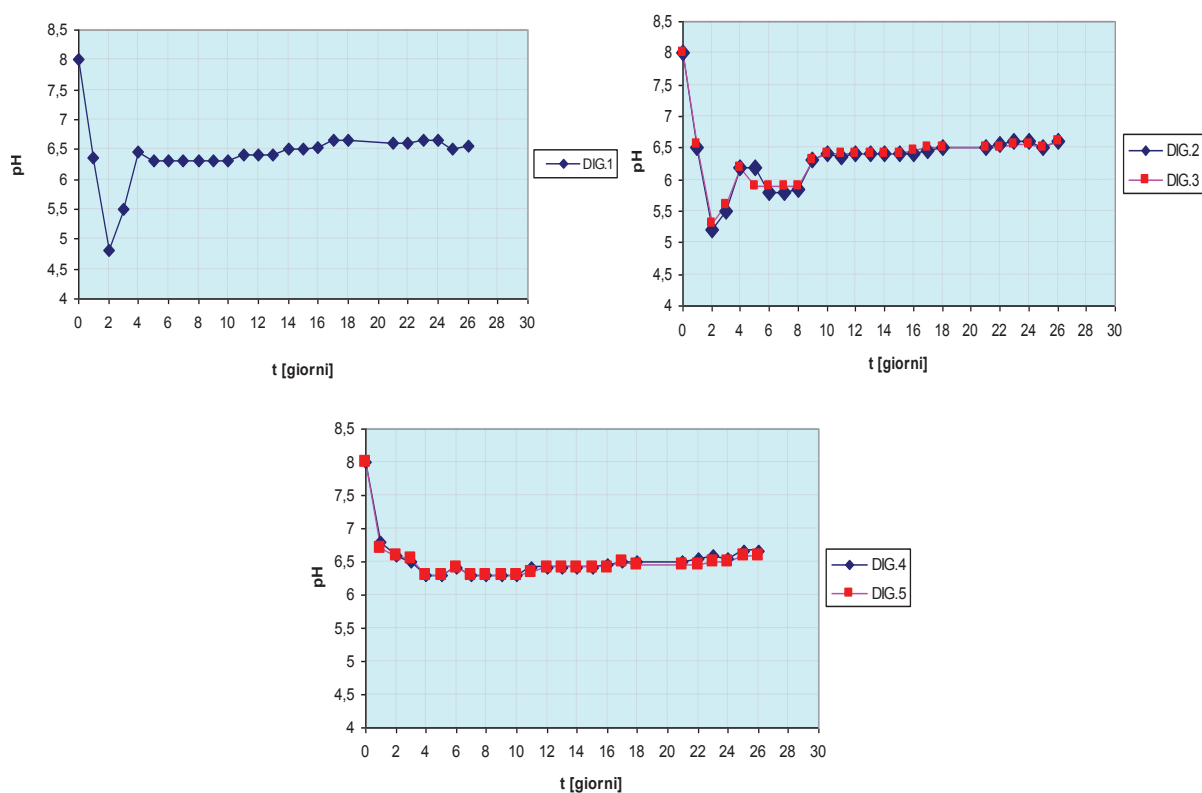


Fig. 2.10-2.11-2.12 - Andamento del pH nel tempo (prove quantitative, I ciclo).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Nelle Figure 2.13-2.15 sono riportati gli andamenti della produttività di metano nei vari digestori in funzione del tempo. In tutti i digestori, la produzione di metano si registra dopo il decimo giorno di fermentazione poiché nella prima settimana di digestione le fasi biologiche preponderanti sono idrolisi e acidogenesi. I valori di pH che tendono a diminuire durante questo periodo di tempo, confermano quanto affermato. A causa dell'alimentazione temporanea di glucosio, si realizza una produzione di CH_3COOH , derivante dall'idrolisi del glucosio, tale da provocare un'inibizione, per eccesso di substrato, dei microrganismi metanigeni. Ecco perché nei digestori 1, 2 e 3 si assiste a una produzione "stazionaria" di CH_4 fino a circa il quindicesimo giorno. A questo punto risulta chiaro che la presenza di glucosio, anziché fornire un contributo positivo nella sintesi di biogas, rallenta il processo biochimico. La fase metanigena è a regime dopo circa venti giorni dall'avvio dei reattori e, alimentando in modo continuo $500 \text{ mg}_{\text{ALGHE}}/\text{d}$, la quantità di metano che si ottiene è circa $13 \text{ mg}/\text{d}$ cioè solo il 2.5% della massa iniziale si converte a CH_4 .

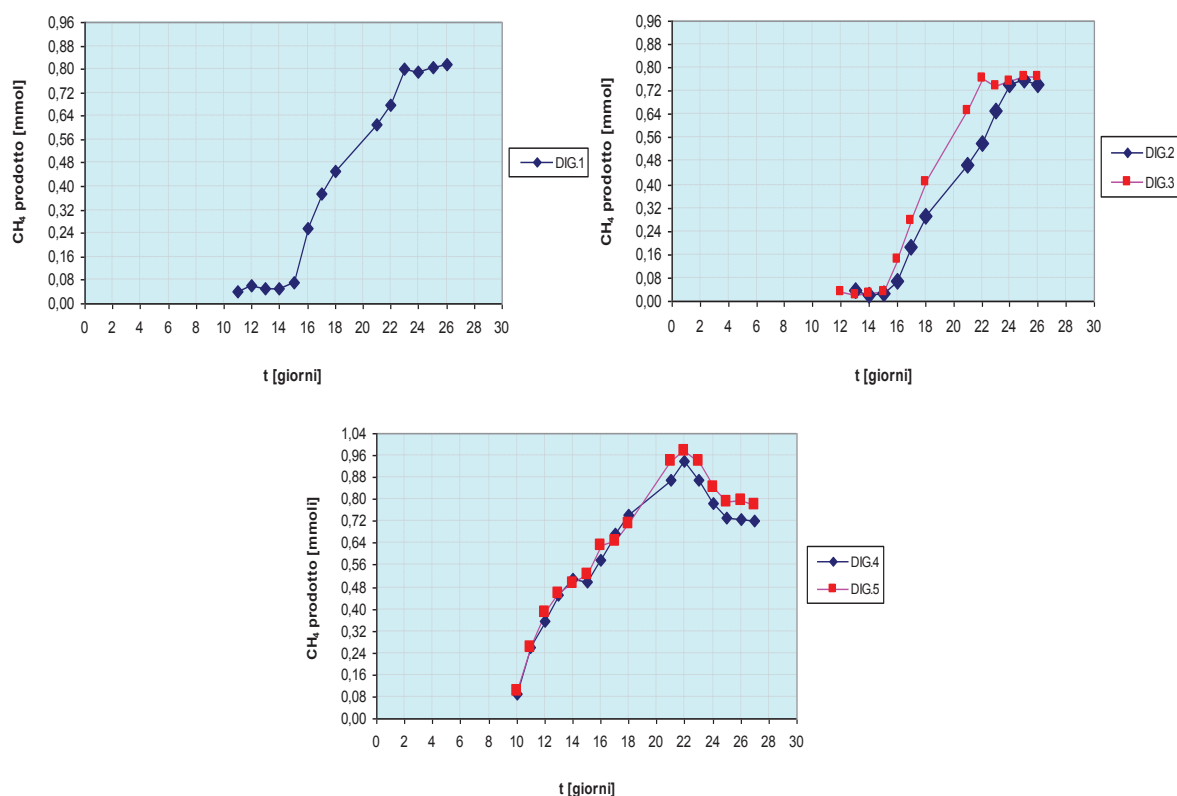


Fig. 2.13-2.14-2.15 - Andamento della quantità di metano prodotto nel tempo (prove quantitative, I ciclo).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Nelle Figure 2.16-2.18 sono riportati gli andamenti della produttività di anidride carbonica nei vari digestori in funzione del tempo. Gli andamenti grafici della produttività di anidride carbonica rispecchiano le aspettative in virtù delle considerazioni fatte circa la variazione di pH e la produttività di metano nei digestori. Infatti, nei primi giorni di esercizio la produttività di CO_2 tende ad aumentare per via del processo idrolitico che interessa il substrato (l'anidride carbonica rappresenta il principale prodotto di idrolisi insieme all'acido acetico) mentre dal decimo giorno in poi, quando la fase di idrolisi è a regime, la CO_2 prodotta è costante. Nei digestori 2 e 3 si ha la presenza di un massimo della produttività e poi un andamento costante. Ciò avviene perché questi digestori, avendo avuto come alimentazione una miscela costituita da substrato algale e glucosio, in proporzioni variabili, per un periodo complessivo di circa otto giorni, hanno prodotto quantità sempre crescente di CO_2 (derivante sempre dall'idrolisi del glucosio) fino al momento in cui si sono alimentate solo alghe. Da questo punto in poi la produttività ha cominciato a decrescere e ad assumere un valore quasi costante.

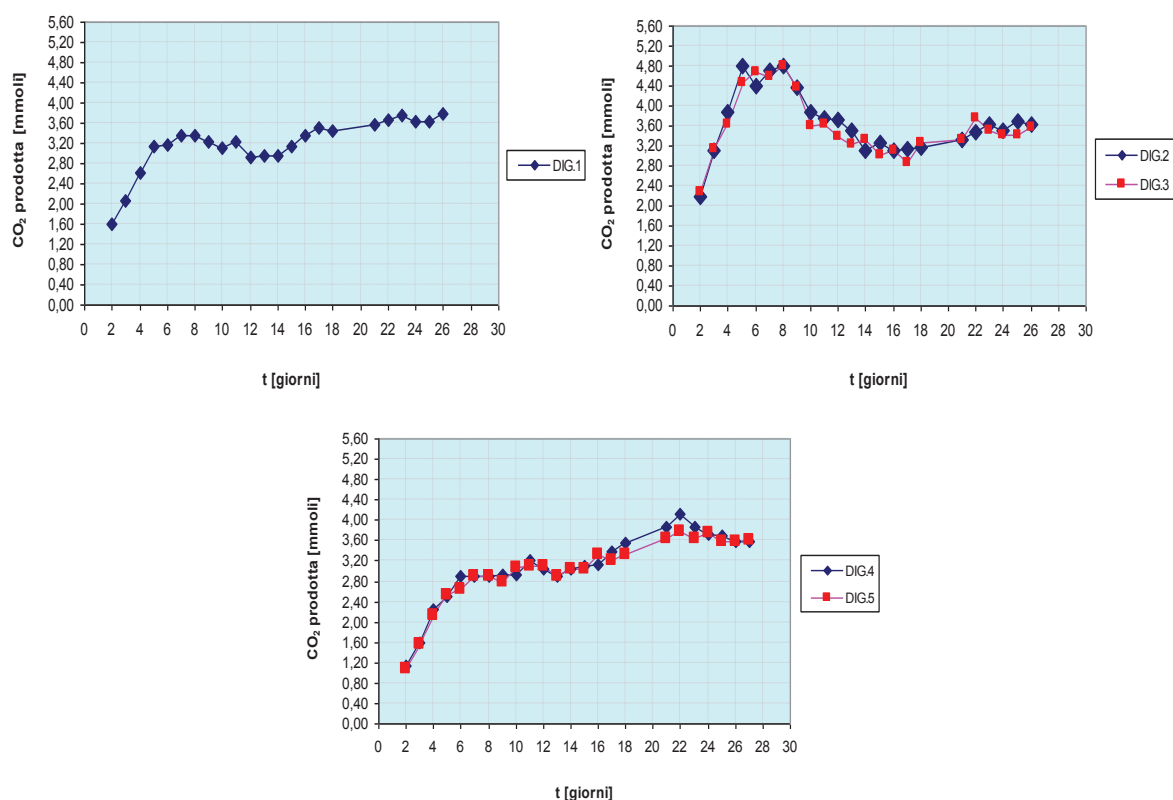


Fig. 2.16-2.17-2.18 - Andamento della quantità di anidride carbonica prodotta nel tempo (prove quantitative, I ciclo).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

La seguente Figura 2.19 evidenzia come in nessuno dei digestori si registra una percentuale in metano superiore al 20%. Quando i reattori raggiungono condizioni stazionarie di funzionamento la composizione del biogas è 18% CH₄ e 82% CO₂.

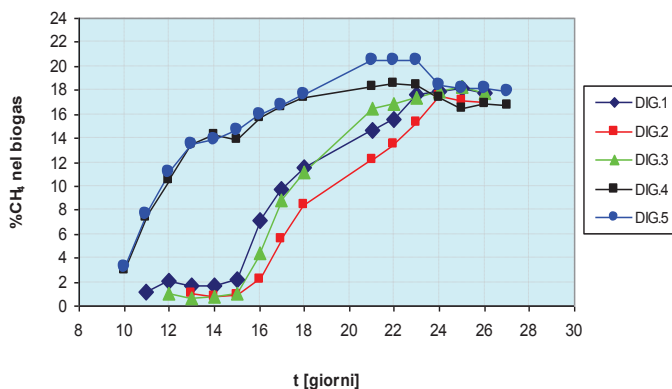


Fig. 2.19 - Composizione del biogas nei vari digestori (prove quantitative, I ciclo).

La qualità del biogas è abbastanza scadente se confrontata con quella ottenibile utilizzando come substrato reflui zootecnici oppure pastazzo di agrumi in cui il metano costituisce più del 60% della miscela gassosa. Le cause di tale risultato possono essere ricondotte alla composizione chimica del substrato cioè della *Spirulina maxima*. Essa, infatti, è una varietà di microalga povera di lipidi e ricca in proteine. Dato che i lipidi partecipano, in misura pari al 30%, alla produzione di metano durante la fase di metano genesi, ne consegue che nel caso della *Spirulina maxima* questo contributo viene meno.

Per essere sicuri che la soluzione usata come inoculo non contribuisca essa stessa alla produzione di metano, è stata condotta una prova in cui si usa solo l'inoculo (Digestore 6). Il monitoraggio quotidiano del pH e del gas ha messo in evidenza come la soluzione di inoculo non porti ad alcuna produzione di metano e che quindi il metano rilevato negli altri digestori è dovuto esclusivamente alla digestione anaerobica delle microalghe.

2.3.5.3 Prove quantitative (II ciclo)

Per quanto riguarda il pH, si osserva che, in analogia a quanto registrato nelle prove precedenti, la prima fase del processo fermentativo (idrolisi e acidificazione) è caratterizzata da una diminuzione del pH, per via della produzione di CH₃COOH derivante dalla degradazione di zuccheri e proteine.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

La quantità di metano prodotto nei digestori 2, 3 e 11 (in cui è alimentata quotidianamente *Spirulina maxima* in concentrazione 0.5 g/d in 250 ml di inoculo, 1 g/d in 250 ml di inoculo e 1 g/d in 500 ml di inoculo, rispettivamente) è riportata nelle Figure 2.20-2.22. La produzione di metano si registra dopo circa il quarto giorno di fermentazione, a differenza di quanto accadeva nel primo ciclo di prove in cui per i primi 10 giorni l'unico prodotto era la CO₂. Bisogna considerare che per questo ciclo di prove è stato usato un inoculo preparato da un letame diverso rispetto a quello usato nel ciclo precedente. La fase metanigena è a regime dopo circa dodici giorni nel digestore 2 e venti giorni nel digestore 3 dall'avvio dei reattori. Nel digestore 11, invece, la fase stazionaria è raggiunta dopo circa una settimana. Facendo un confronto tra i risultati ottenuti dai digestori 4 e 5 del primo ciclo di prove e il digestore 2 del secondo ciclo (operanti alle medesime condizioni) si osserva che a regime si riscontra una differenza di produttività di circa il 20%.

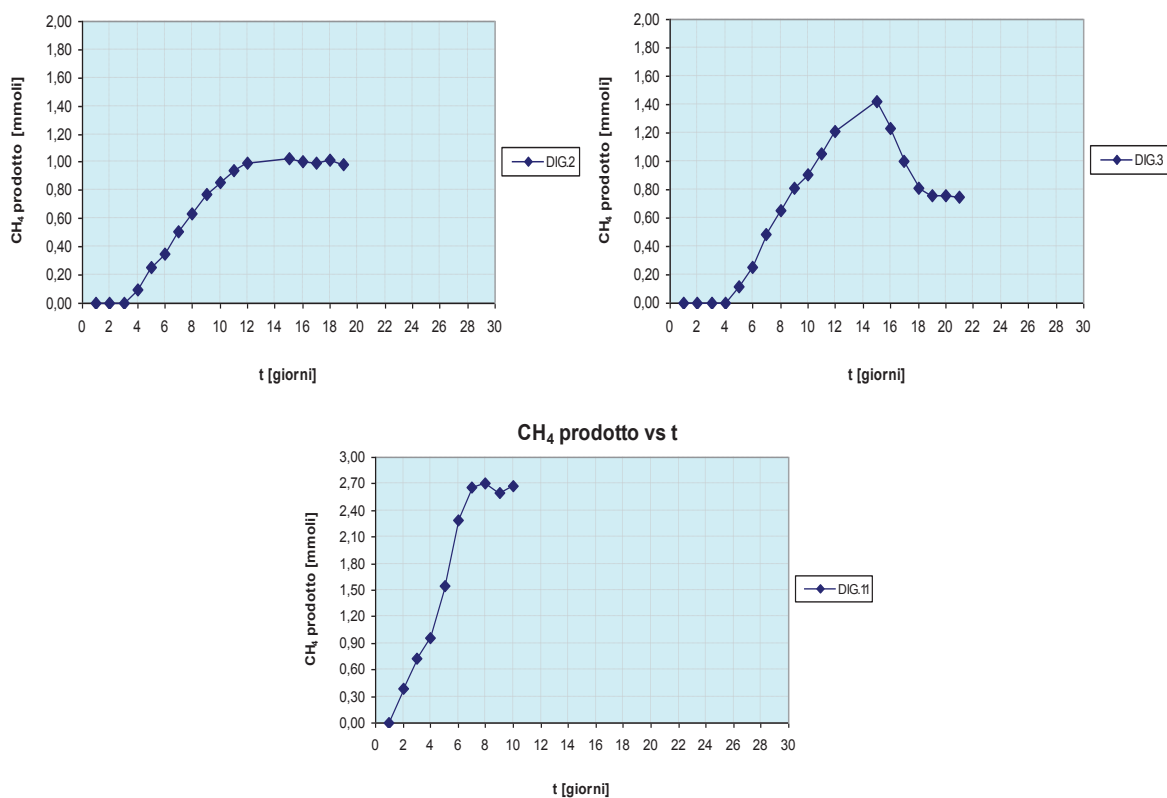


Fig. 2.20-2.21-2.22 - Andamento della produzione di metano nei digestori con alimentazione di microalga *Spirulina maxima* continua (prove quantitative, II ciclo).

Dall'andamento in Figura 2.21 emerge che lo stadio limitante, nelle condizioni in cui si opera, è la fase idrolitica. Infatti, nei primi giorni di fermentazione si ha un accumulo di acido

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

acetico (principale prodotto dell'idrolisi insieme alla CO_2) poiché la fase metanigena non parte sin da subito. Appena ha luogo quest'ultima fase, i batteri fermentanti, trovando le condizioni ambientali adatte, si riproducono al punto tale da consumare in pochi giorni l'accumulo di acido acetico (per formare metano). Dal ventesimo giorno in poi la produttività di metano è analoga a quella che si ha a regime in Figura 2.20. Quanto asserito, è confermato dall'esito dell'analisi eseguita sul digestore 11 (Figura 2.22) in cui, raddoppiando tutti i parametri caratterizzanti il reattore (volume inoculo, portata alimentazione, ecc.) si ottiene una produzione di metano, a regime, più che doppia rispetto a quella del digestore 2.

La Figura 2.23 evidenzia come in nessuno dei digestori continui si registri una percentuale in metano superiore al 30% nel biogas prodotto.

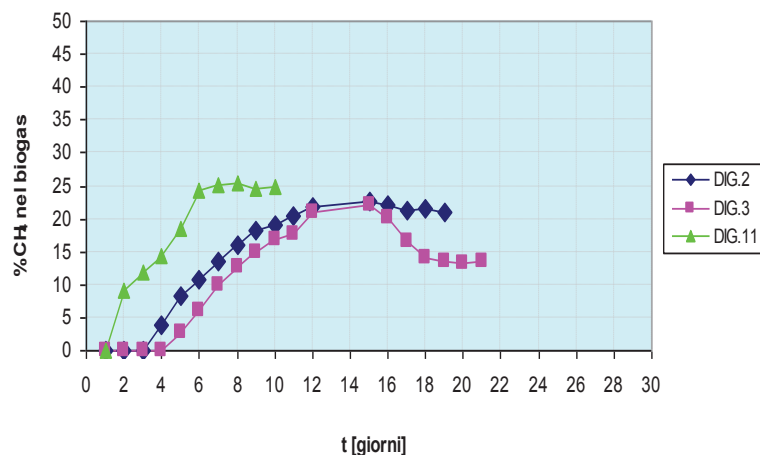


Fig. 2.23 - Composizione del biogas nei digestori 2, 3 e 11 (Prove quantitative, II ciclo).

Nelle Figure 2.24-2.26 sono, invece, riportati gli andamenti della quantità di metano prodotto nei digestori 4, 5 e 6 in cui sono state alimentate le macroalghe (*Nori*, *Wakame* e *Kombu* rispettivamente) – opportunamente triturate – all'inizio del processo che, quindi, è stato condotto in modalità batch.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

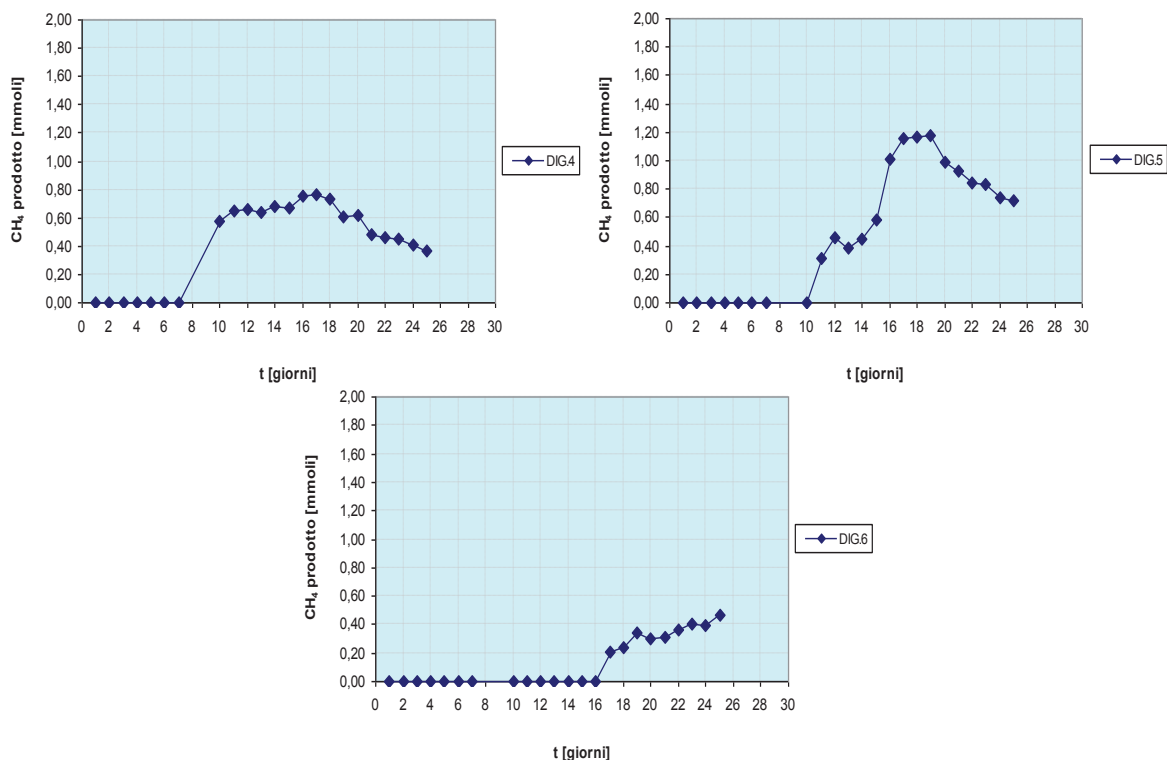


Fig. 2.24-2.25-2.26 - Andamento della produzione di metano nei digestori con macroalghe (prove quantitative, II ciclo).

La produzione di metano ha un andamento prima crescente e poi decrescente; questo è dovuto al fatto che inizialmente i batteri metanigeni hanno a disposizione in elevate quantità acido acetico che, col passare dei giorni, comincia a diminuire per via del progressivo esaurirsi della fase idrolitica. Da notare che si ha produzione di metano dopo circa 10 giorni, poiché occorre un tempo di digestione più lungo trattandosi di alghe strutturalmente complesse. In nessuno dei casi, tuttavia, il metano supera il 15% del biogas totale prodotto.

2.4 Ottimizzazione delle condizioni operative mediante le reti neurali

La sperimentazione preliminare sulla digestione anaerobica ha rappresentato il punto di partenza per la modellazione e l'implementazione di un metodo predittivo per il processo studiato. In particolare, si è fatto ricorso alle reti neurali artificiali, cioè sistemi di elaborazione dell'informazione che cercano di simulare, all'interno di un sistema informatico, il funzionamento dei sistemi nervosi biologici (*Dayhoff & DeLeo, 2001*). Per la loro programmazione è stato necessario uno studio dettagliato del cervello umano e la comprensione della sua complessa attività. Il sistema nervoso è costituito da un gran numero

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

di cellule nervose connesse tra loro in una complessa rete. Ogni neurone è collegato mediamente con una decina di migliaia di altre cellule nervose. Si hanno, quindi, centinaia di miliardi di legami. In una rete neurale artificiale vi sono delle unità che ricevono informazioni dall'ambiente, altre che emettono risposte nell'ambiente e altre ancora - non sempre presenti - che comunicano solamente con le unità all'interno della rete (Figura 2.27): esse sono definite rispettivamente unità di ingresso (input), unità di uscita (output) e unità nascoste (hidden). Ciascuna unità svolge un'operazione molto semplice che consiste nel diventare attiva se la quantità totale di segnale che riceve supera una certa soglia di attivazione. Se diventa attiva, essa emette a sua volta un segnale che viene trasmesso lungo i canali di comunicazione fino alle altre unità cui essa è connessa. Dal punto di connessione l'impulso può essere trasformato in segnale inibitorio o eccitatorio aumentandone o diminuendone nel contempo l'intensità.

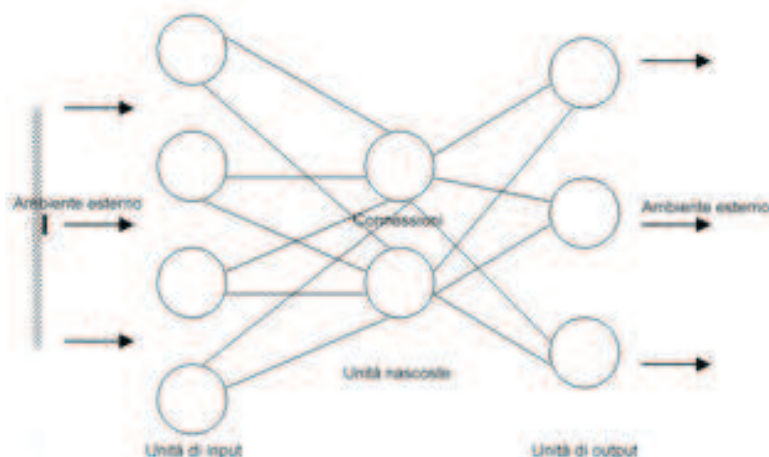


Fig. 2.27 - Schema di una rete neurale artificiale.

Il legame input-output, ovvero la funzione di trasferimento della rete, non viene programmato ma è semplicemente ottenuto da un processo di apprendimento basato su dati empirici, che può essere:

- *supervisionato* (supervised learning), qualora si disponga di un insieme di dati per l'addestramento (o training set) comprendente esempi tipici di ingressi con le uscite corrispondenti: la rete cerca di generare la relazione che li lega. Successivamente, segue la fase di addestramento mediante un opportuno algoritmo, il quale usa tali dati allo scopo di modificare i pesi e altri parametri della rete stessa in modo tale da minimizzare l'errore di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

previsione relativo all'insieme di addestramento (*Qdais et al., 2010*). Se l'addestramento ha successo, la rete impara a riconoscere la relazione incognita che lega le variabili d'ingresso a quelle d'uscita ed è, quindi in grado di fare previsioni anche laddove l'uscita non è nota a priori; in altri termini, l'obiettivo finale dell'apprendimento supervisionato è la previsione del valore dell'uscita per ogni valore dell'ingresso, basandosi soltanto su un numero limitato di esempi di corrispondenza (vale a dire, coppie di valori input-output). Per fare ciò, la rete deve essere, infine, dotata di un'adeguata capacità di generalizzazione, con riferimento a casi a essa ignoti. Ciò consente di risolvere problemi di regressione o classificazione;

- *non supervisionato* (unsupervised learning), basato su algoritmi d'addestramento che modificano i pesi della rete facendo esclusivamente riferimento a un insieme di dati che include le sole variabili d'ingresso. Tali algoritmi tentano di raggruppare i dati d'ingresso e di individuare pertanto degli opportuni gruppi rappresentativi dei dati stessi, facendo uso tipicamente di metodi topologici o probabilistici. L'apprendimento non supervisionato è anche impiegato per sviluppare tecniche di compressione dei dati;
- *per rinforzo* (reinforcement learning), nel quale un opportuno algoritmo si prefigge lo scopo di individuare un certo modo di operare, a partire da un processo di osservazione dell'ambiente esterno; ogni azione ha un impatto sull'ambiente e l'ambiente produce una retroazione che guida l'algoritmo stesso nel processo di apprendimento. Tale classe di problemi postula un agente, dotato di capacità di percezione, che esplora un ambiente nel quale intraprende una serie di azioni. L'ambiente stesso fornisce in risposta un incentivo o un disincentivo, secondo i casi. Gli algoritmi per il reinforcement learning tentano in definitiva di determinare una politica tesa a massimizzare gli incentivi cumulati ricevuti dall'agente nel corso della sua esplorazione del problema. L'apprendimento con rinforzo differisce da quello supervisionato poichè non sono mai presentate delle coppie input-output di esempi noti, nè si procede alla correzione esplicita di azioni subottimali.

Si possono identificare più tipi di architettura di rete neurale, come ad esempio:

- ✓ reti completamente connesse (non stratificate): in una rete completamente connessa ogni neurone è connesso (in modo bidirezionale) con tutti gli altri (Figura 2.28). Le connessioni tra i neuroni di una rete completamente connessa sono rappresentate mediante una matrice

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

quadrata W , di dimensione pari al numero di neuroni, il cui generico elemento w_{ij} rappresenta il peso della connessione tra il neurone i ed il neurone j .

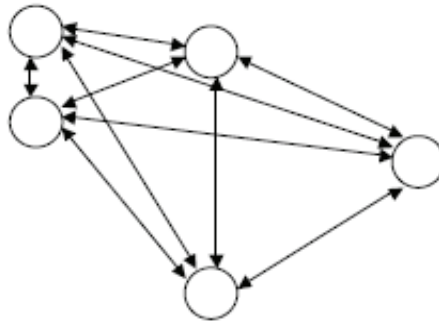


Fig. 2.28 - Rete completamente connessa.

- ✓ Reti stratificate: nelle reti stratificate si individuano degli strati di neuroni tali che ogni neurone è connesso con tutti quelli dello strato successivo (Figura 2.29), ma non esistono connessioni tra i neuroni all'interno dello stesso strato, né tra neuroni di strati non adiacenti. Il numero di strati e il numero di neuroni per strato dipendono dallo specifico problema che si intende risolvere.

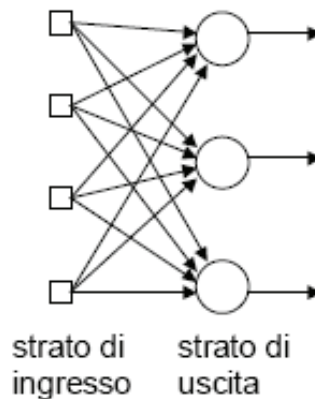


Fig. 2.29 - Rete stratificata.

Dato che nello strato di ingresso non avviene alcuna computazione (i neuroni di ingresso devono semplicemente passare allo strato successivo i segnali ricevuti dall'ambiente esterno), la rete nella figura precedente viene di solito considerata come una rete con un solo strato. Inoltre, dato che i segnali viaggiano dallo strato di ingresso verso lo strato di uscita, si parla di rete *feedforward* (Gevrey et al., 2003).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Nella figura 2.30 viene mostrata una rete stratificata feedforward contenente uno *strato nascosto*, cioè uno strato i cui neuroni non comunicano direttamente con l'esterno. In generale, possono esserci uno o più strati nascosti. I neuroni nascosti permettono alla rete di costruire opportune rappresentazioni interne degli stimoli in ingresso in modo da facilitare il compito della rete.

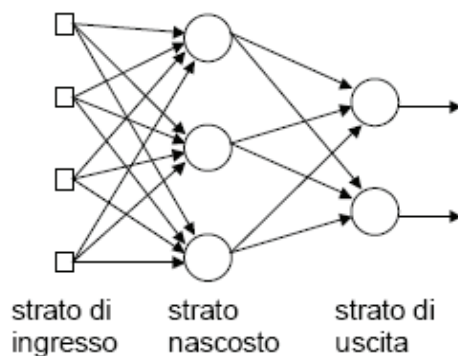


Fig. 2.30 - Rete stratificata feedforward.

Le connessioni tra i neuroni di una rete stratificata sono rappresentate mediante tante matrici quante sono le coppie di strati adiacenti. Ogni matrice contiene i pesi delle connessioni tra le coppie di neuroni di due strati adiacenti.

Da un punto di vista industriale, le reti neurali risultano efficaci quando si dispone di dati storici che possono essere trattati con gli algoritmi neurali. Ciò è di interesse per la produzione perché permette di estrarre dati e modelli senza effettuare ulteriori prove e sperimentazioni.

Tuttavia, i modelli prodotti dalle reti neurali, anche se molto efficienti, non sono spiegabili in linguaggio simbolico umano: i risultati vanno accettati “così come sono”, da cui anche la definizione inglese delle reti neurali come *black box*. Necessitano di una fase di addestramento che fissi i pesi dei singoli neuroni e questa fase può richiedere molto tempo, se il numero dei record e delle variabili analizzate è molto grande.

Prima di procedere con la modellazione vera e propria occorre compiere la scelta in merito alla percentuale di dati, tra quelli a disposizione, da usare per la fase di training e per la fase di test. Le prestazioni della rete dipenderanno fortemente dall'allenamento della stessa. Infatti, è la fase di training a dare la forma definitiva alla rete mentre la fase di test rappresenta solo

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

una valutazione delle sue capacità predittive. Purtroppo, a tal fine, non esistono delle regole dalla valenza generale e quindi bisogna eseguire una stima che tenga conto del contesto specifico del problema (tipo di dati, dimensione del campione, ecc.). Molti autori utilizzano circa il 70% e il 30% di quelli a disposizione per la fase di training e di test rispettivamente. La quantità di dati, in valore assoluto, da fornire come input alla rete neurale non è un parametro determinabile secondo criteri universali, ma dipende dalla situazione specifica. In generale, più dati si hanno a disposizione più il modello sarà accurato (*Zhang et al., 1998*).

La tecnologia delle reti neurali artificiali è stata applicata grazie all’ausilio del Toolbox Neural Network di Matlab. Tale strumento include diverse regole d’apprendimento già implementate e consente il disegno e la simulazione della rete neurale senza entrare nel merito degli algoritmi.

La scelta dell’architettura della rete è stata realizzata attraverso una tecnica *trial and error* cioè finché non si è registrata un’accuratezza dell’approssimazione dei dati sperimentali ritenuta accettabile si è modificato il numero di neuroni artificiali. Se una rete è caratterizzata da un eccessivo numero di unità nascoste, si può riscontrare:

- un aumento del tempo di addestramento;
- un aumento del rischio che la soluzione della rete rimanga intrappolata in un minimo locale della superficie dell’errore (si ricorda che le funzioni di attivazione dei diversi neuroni introducono delle “non linearità”);
- riduzione della capacità di generalizzare le informazioni acquisite e, quindi, di prevedere in modo ottimale nuovi valori.

Alla luce di ciò, il margine di errore tollerato tra il valore sperimentale dei dati e la stima del modello in fase di addestramento è del 5%. L’architettura della rete costruita è riportata in Figura 2.31.

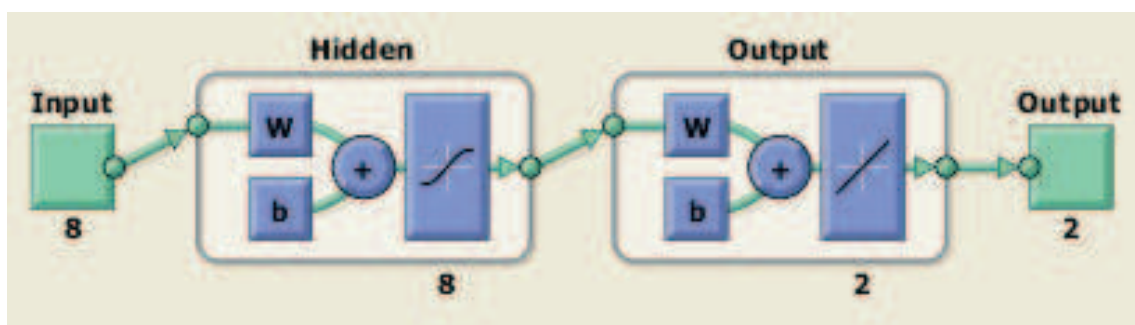


Fig. 2.31 - Architettura della rete neurale.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

L'algoritmo di apprendimento impiegato è la regolarizzazione Bayesiana, particolarmente indicato per evitare l'*overfitting*. I pesi e i bias della rete sono assunti come variabili random che però vengono assegnati sottoforma di distribuzioni statistiche. Come funzione di performance si è fatto riferimento alla somma degli errori al quadrato, SEE, usata tipicamente nelle procedure di fitting.

Un'altra funzione utilizzata per valutare la capacità della rete di rappresentare i dati di input è *plotregression*; la quale ha permesso di effettuare una regressione lineare dei punti ottenuti riportando su un grafico (Figura 2.32) gli outputs forniti dal toolbox in funzione degli outputs sperimentali per ogni fase della costruzione della rete. Dal valore del coefficiente di correlazione e verificando che le due rette si sovrappongono, la rete è stata ritenuta idonea per il problema in esame.

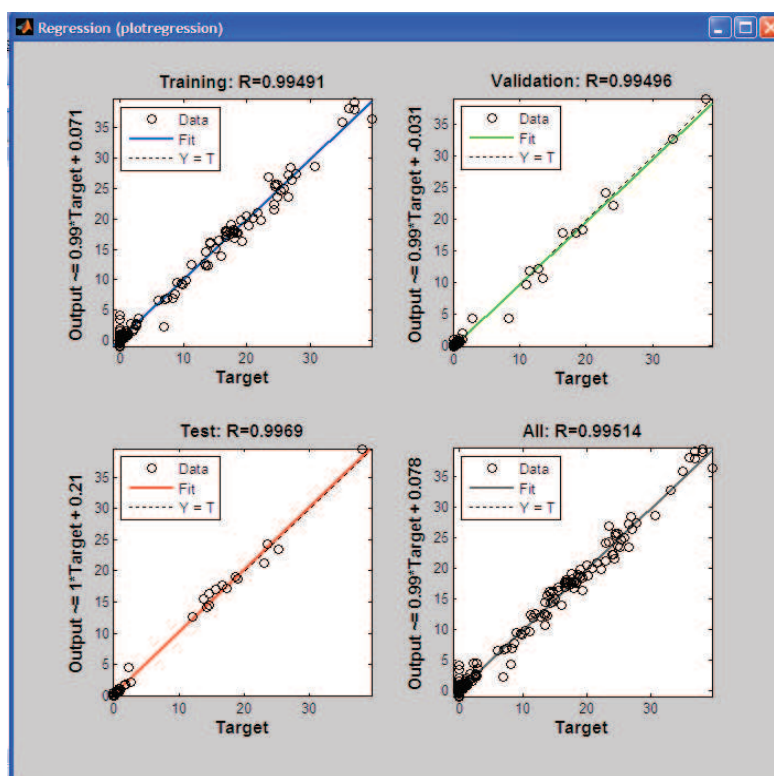


Fig. 2.32 - Output della funzione *plotregression* di MATLAB.

Di seguito si riportano i risultati della modellazione inerenti sia la produttività di metano che la composizione del biogas nei digestori continui in scala da laboratorio (Figure 2.33 e 2.34):

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

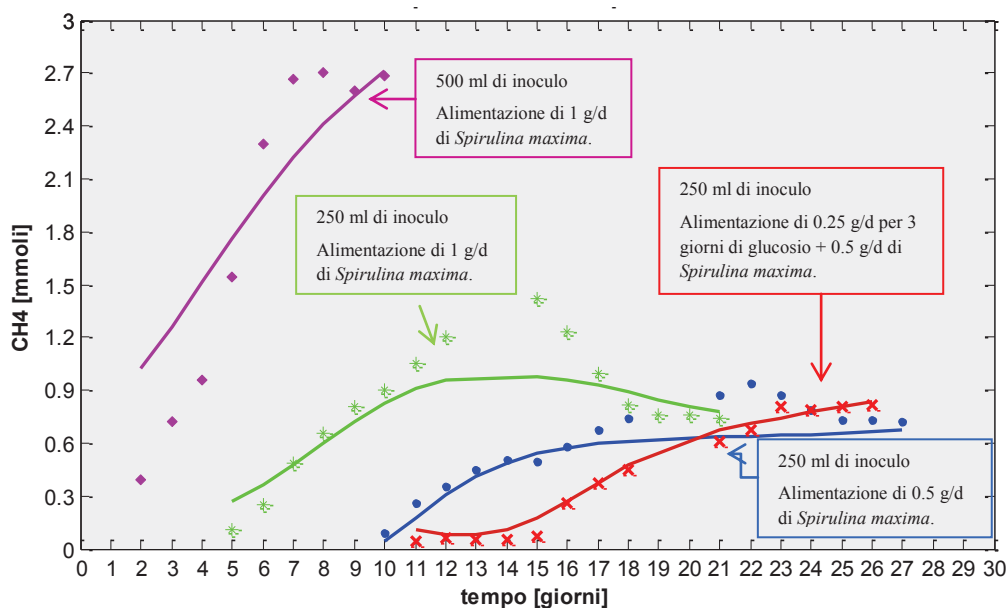


Fig. 2.33 - Confronto tra dati sperimentali e risposta della rete neurale in termini di quantità di metano prodotto.

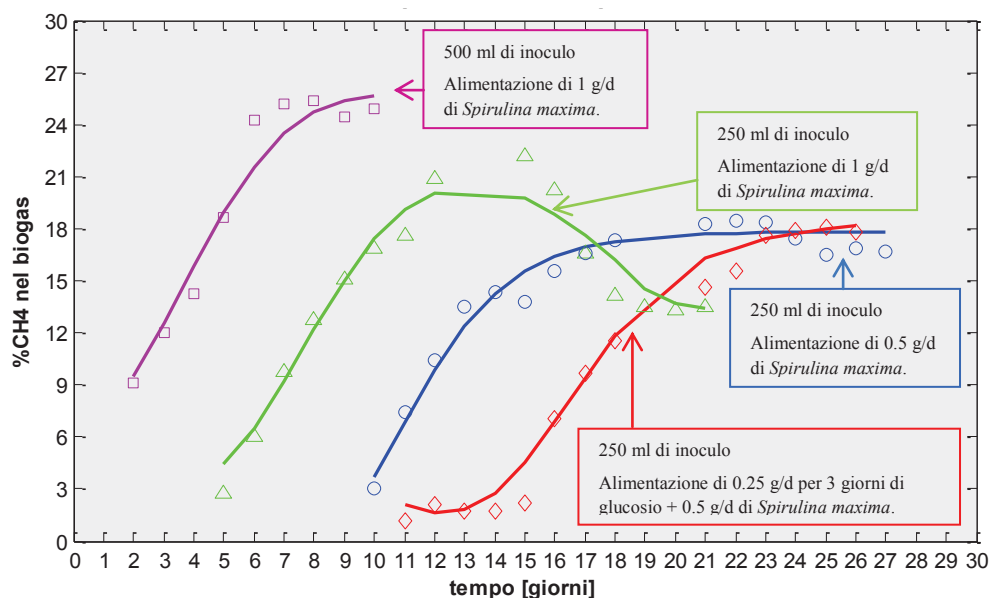


Fig. 2.34 - Confronto tra dati sperimentali e risposta della rete neurale in termini di percentuale di metano nel biogas prodotto.

I dati sperimentali si prestano a essere modellati con un buon livello di accuratezza mediante la tecnologia delle reti neurali artificiali. A questo punto sono state sfruttate le capacità predittive della rete per trovare le condizioni operative ottimali (Tabella 2.9) che consentono di ottenere la massima resa in biogas evitando, quindi, che la fase di idrolisi vincoli la produttività del processo.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

Tab. 2.9 - Condizioni operative che rendono massima la produttività del processo.

<i>Alimentazione: 0.25 g/d Spirulina maxima</i>
<i>Massa inoculo: 800 g</i>
<i>pH inoculo: 6.9</i>

Dopo una serie di tentativi, attraverso i quali sono stati variate la portata in alimentazione e la massa di inoculo iniziale, si è raggiunto l'obiettivo prefissato.

A questo punto è stata fatto un test nelle condizioni ottimali previste dalle reti neurali, per verificare sperimentalmente la previsione. La previsione (curva) e la verifica (punti) del modello sono riportate nelle figure 2.35 e 2.36. A regime si ha una produzione di metano pari a 3.6 mmoli/d. La composizione (in CH₄) del biogas è del 63% (circa il 15% in più rispetto a quella prevista dalla rete neurale). La portata totale di gas prodotto è 0.15 g/d; pertanto, il 60% dell'alimentazione si converte a biogas.

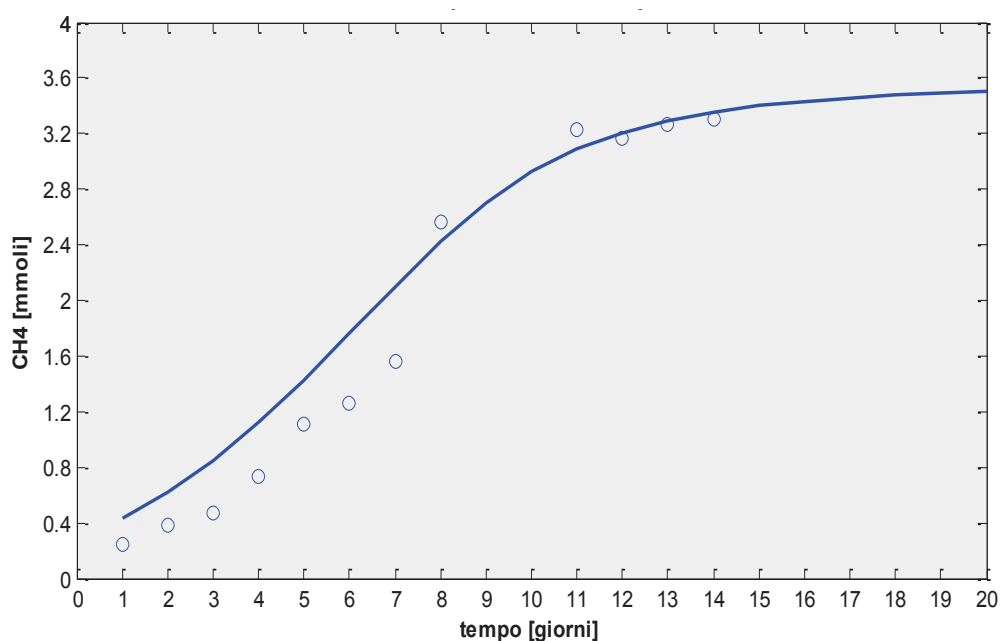


Fig. 2.35 - Andamento del CH₄ prodotto nel tempo nelle condizioni ottimali (Tabella 2.9): punti sperimentali (cerchietti) e previsione della rete neurale (linea continua).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto Capitolo 2 – Produzione di biogas da microalghe povere di lipidi e modellazione mediante reti neurali

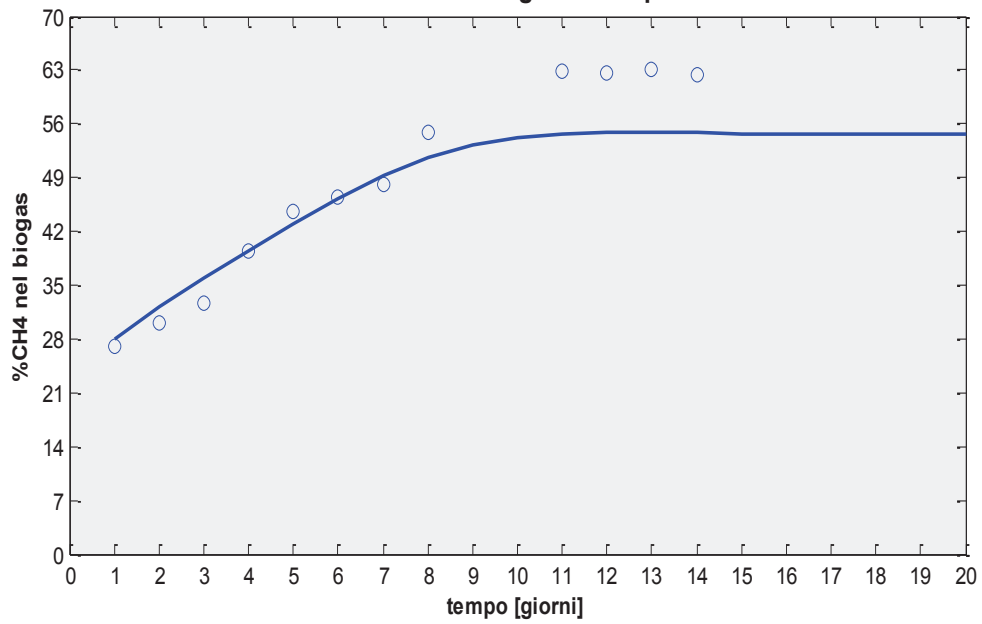


Fig. 2.36 - Andamento della percentuale di CH₄ nel biogas prodotto nel tempo nelle condizioni ottimali (Tabella 2.9): punti sperimentali (cerchietti) e previsione della rete neurale (linea continua).

Capitolo 3

Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

3.1 Stato dell'arte

Un problema non trascurabile della digestione anaerobica di microalghe è il basso rapporto carbonio/azoto (C/N). Tale rapporto si aggira intorno al valore di 6 ed è minore di quello ottimale necessario ad avere una buona resa in metano (20-30) (Park & Li, 2012). Inoltre, un basso rapporto C/N si traduce in un alto contenuto di azoto ammoniacale totale (TAN) e di acidi grassi volatili (VFA), entrambi potenziali inibitori del processo di digestione anaerobica perché agiscono negativamente sull'azione dei batteri metanigeni. Per tale motivo, si è ritenuto utile studiare e avviare sperimentalmente una co-digestione di microalghe con un altro substrato ricco in carbonio, in modo da aumentare il rapporto C/N fino a valori ottimali e migliorare la performance della digestione. Possibili substrati in processi di co-digestione anaerobica possono essere i residui della lavorazione della carta, gli scarti di lavorazione dell'industria agroalimentare e le matrici vegetali (Figura 3.1).

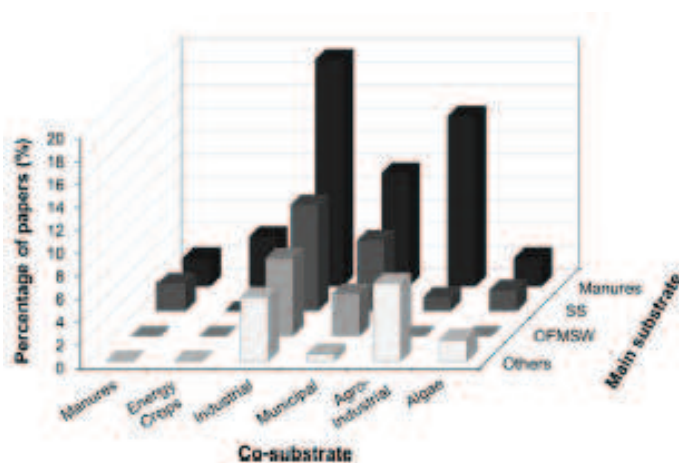


Fig. 3.1 - Differenti substrati e co-substrati maggiormente usati (Alvarez et al., 2014).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

Tra i possibili co-substrati delle microalghe sono stati selezionati i residui della lavorazione della carta, che rappresentano un rifiuto da smaltire per l'azienda Grafiche Femia, capofila del progetto PON01_02061.

Preliminarmente, è stato fatto un attento lavoro di ricerca bibliografica e studio della letteratura scientifica a riguardo, ma sono pochissimi i lavori su questo argomento. Tra questi, il contributo più interessante per i nostri scopi è il lavoro di Yen & Brune (2007), in cui i substrati di partenza sono:

- microalghe appartenenti a ceppi misti di *Scenedesmus* spp. e *Chlorella* spp., provenienti da un sistema di acquacoltura;
- carta proveniente da un laboratorio e destinata ad essere riciclata.

A partire da questi substrati, la co-digestione è stata portata avanti in digestori di laboratorio con un volume di 4 litri, mediante un'alimentazione semi-continua di substrato una volta al giorno (con relativa rimozione dello stesso volume di effluente). Il piano sperimentale ha previsto essenzialmente 3 set di prove:

- 1) digestione anaerobica di microalghe senza l'aggiunta di carta; le microalghe sono state alimentate a concentrazioni crescenti (2, 4 e 6 g VS/l al giorno), determinando un aumento del metano prodotto; tuttavia, aumentano contemporaneamente i valori di VFA e TAN ed è ragionevole pensare che; continuando ad aumentare la concentrazione di microalghe in alimentazione, si possa raggiungere la concentrazione limite al di sopra della quale VFA e TAN risulteranno tossici per la digestione.
- 2) Co-digestione anaerobica di microalghe e carta, al variare del rapporto relativo dei due substrati; mantenendo una concentrazione totale di 4 g VS/l alimentati ogni giorno, è stato variata la % di microalghe dallo 0% al 100% (e quindi la complementare quantità di carta dal 100% allo 0%). Il rapporto ottimale si è rivelato essere quello relativo all'alimentazione del 50% di microalghe e del 50% di carta. Infatti, quando si alimentano quantità maggiori di carta (75% e 100%) si osserva una diminuzione della produzione di metano e CO₂ e un forte aumento dei VFA. Si ritiene molto interessante il risultato sperimentale relativo alla sola digestione della carta (0% microalghe e 100% carta): nonostante il rapporto C/N sia stato abbassato mediante l'aggiunta di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

NH_4Cl come fonte di azoto fino al valore di 21.5, la quantità di metano prodotta risulta addirittura inferiore a quella ottenuta a partire dalle sole microalghe con un rapporto C/N pari a 6.7. Questo porta a un'importante considerazione: il parametro C/N è importante ma, se si lavora con microalghe, non è l'unico da prendere in considerazione per massimizzare la quantità di metano prodotto. Infatti, le microalghe forniscono non solo l'azoto necessario alla digestione e assente nella carta, ma anche tutta una serie di nutrienti utili in fase di digestione.

- 3) Co-digestione anaerobica di una fissata quantità di microalghe (2 g VS/l al giorno) e di una quantità variabile di carta dal valore di 0 g VS/l al giorno al valore di 4 g VS/l al giorno. Tali prove hanno mostrato che la massima produzione di metano si ha quando si alimentano 2 g VS/ l al giorno di microalghe e 3 g VS/l al giorno di carta, quindi in corrispondenza di un rapporto percentuale pari al 40% di microalghe e al 60% di carta.

Da questo studio è emerso un valore ottimale C/N pari a 20-25. Inoltre, l'aumento dell'attività cellulare è utile alla biodegradabilità dei fanghi algali che non solo favorisce l'apporto di nutrienti nel digestore ma migliora anche la velocità di produzione del metano.

3.2 Programmazione sperimentale

Sulla base dei risultati sperimentali riportati in letteratura (*Yen & Brune, 2007*), si è deciso di avviare una sperimentazione in scala da laboratorio nei digestori già usati nelle prove preliminari con *Spirulina maxima* (Capitolo 2), secondo il piano sperimentale articolato nelle seguenti fasi:

- a. conduzione in parallelo di prove di co-digestione in batch, a partire da biomassa microalgale proveniente dall'impianto avviato a Marina di Gioiosa Ionica e preliminarmente sottoposta ad estrazione dei lipidi con solvente, e da carta di scarto in quantità variabile; Grafiche Femia, capofila del progetto, è un'azienda grafica che quotidianamente ha l'esigenza di smaltire grandi quantità di carta, per cui è interessante far convergere l'esigenza di smaltire un prodotto di scarto con la possibilità di produrre energia; la produzione di biogas segue, infatti, proprio la logica della valorizzazione di uno scarto da destinare allo smaltimento/trattamento, in modo

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

da trasformare un qualcosa che rappresenta un costo per l'azienda in una risorsa preziosa, fonte di energia;

- b. conduzione in parallelo di prove di co-digestione in modalità fed-batch, a partire da biomassa microalgale secca residua dopo il processo di estrazione dei lipidi e da carta di scarto, in rapporti percentuali diversi (0%-100%; 25%-75%; 50%-50%; 75%-25%; 100%-0%);
- c. individuato il rapporto che garantisce la migliore resa in metano (tra i 5 rapporti indicati sopra), si restringe il range per ottimizzare ulteriormente tale rapporto: se, ad esempio, si otterrà la migliore resa tra il 25% e il 75% di microalghe alimentate, allora si faranno ulteriori prove in questo intervallo (30%-70%; 40%-60%; 60%-40%; 70%-30%);
- d. individuato il rapporto ottimale, si faranno delle prove a parità di tale rapporto ma al variare della concentrazione dei substrati alimentati; se, ad esempio, il rapporto ottimale risulta essere 1:1 (50% di microalghe e 50% di carta), allora si faranno in parallelo prove di digestione alimentando in un digestore 1 g VS/l al giorno di microalghe e 1 g VS/l al giorno di carta, in un altro digestore 2 g VS/l al giorno di microalghe e 2 g VS/l al giorno di carta, in un altro digestore 3 g VS/l al giorno di microalghe e 3 g VS/l al giorno di carta, e così via, fino ad individuare la concentrazione massima che è possibile alimentare per non incorrere in una diminuzione di resa dovuta all'azione inibitoria dei VFA prodotti.

È chiaro che ciascuno dei set di prove appena descritti è legato a quello precedente e i diversi test vanno eseguiti in “cascata”.

3.3 Sperimentazione in laboratorio

Definito il piano sperimentale, è stata avviata in laboratorio la sperimentazione relativa alla digestione di microalghe che provengono dall'impianto di Marina di Gioiosa Ionica. Tali microalghe sono state preliminarmente sottoposte ad estrazione dei lipidi con solvente. L'inoculo batterico è stato fornito dalla Widmer Ecoprojekt ed è formato da una miscela di diversi batteri specifici per la digestione anaerobica (WBC D036). Tale inoculo è stato preparato secondo le indicazioni forniteci e ad esso è stata aggiunta una quantità di biomassa microalgale umida (ottenuta mediante concentrazione per centrifugazione della sospensione di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

partenza) di cui è noto il valore di solidi volatili. Tale valore è stato determinato sperimentalmente mediante la metodica riportata in letteratura (*Standard methods for the examination of water and wastewater*). Insieme alle microalghe è stato anche aggiunto il secondo substrato, carta da imballaggio lasciata macerare in acqua calda fino ad ottenere una poltiglia. Anche per la carta è stato determinato il valore di solidi volatili in modo da avere dei risultati riproducibili che non dipendono dall'umidità iniziale del substrato alimentato. Sono stati, inoltre, determinati i valori di COD (Chemical Oxygen Demand) e di C/N dei substrati di partenza. Avviata la co-digestione in batch, sono stati quotidianamente monitorati i seguenti parametri: pressione, temperatura, pH, composizione % del gas prodotto, VFA e TAN. Per la scelta della carta da utilizzare, sono state condotte delle prove con tre tipologie di carta differenti messe a macerare in acqua (Figura 3.2).

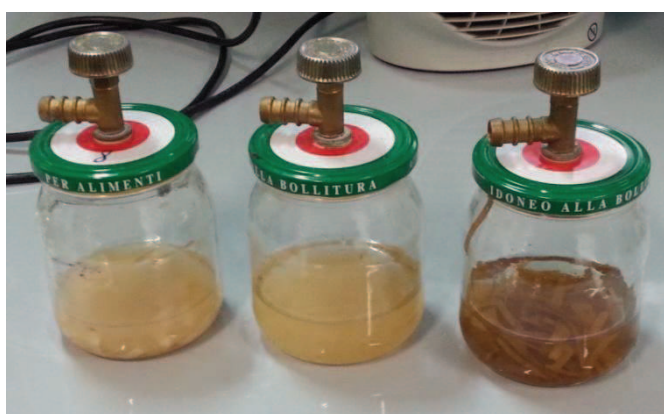


Fig. 3.2 - Analisi del tipo di carta da utilizzare: da destra carta da stampa, fazzoletti e carta da imballaggio.

La carta da imballaggio sarebbe poco disponibile ai batteri e necessiterebbe di tempi molto lunghi per pervenire a una poltiglia morbida. I classici fazzoletti, invece, potrebbero invalidare le prove essendo caratterizzati da sostanze tipo balsami che li rendono morbidi e più adatti alla macerazione immediata. La carta comune di stampante mostra proprietà intermedie, per cui è stata opportunamente triturrata per agevolare la macerazione e successivamente pesata mediante bilancia di precisione per poter avere i quantitativi giusti relazionati alle proporzioni stabilite. Naturalmente è stata realizzata anche una prova di valutazione dei solidi totali presenti nella carta, con essiccazione in muffola. Da queste analisi si è osservata un'invarianza del peso e quindi l'assenza di contenuti di umidità.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

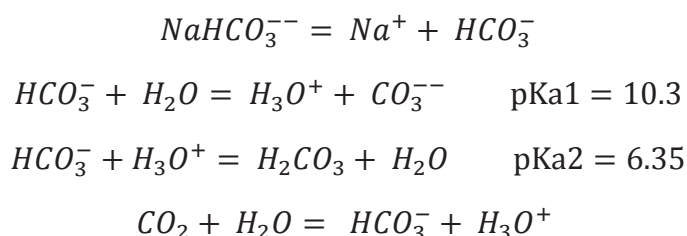
I digestori utilizzati per le prove sono gli stessi di quelli usati nelle prove preliminari di digestione anaerobica di *Spirulina maxima* (Capitolo 2). Le condizioni operative delle prove condotte in parallelo sono riportate in Tabella 3.1.

Tab. 3.1 – Condizioni operative nelle prove di co-digestione anaerobica di microalghe e carta.

	Volume di acqua+alghe	Volume inoculo	Quantità carta	%Carta - %Alghe
Digestore 1	200 ml	125 ml	0.10338 g	50% - 50%
Digestore 2	200 ml	125 ml	0.20596 g	66% - 34%
Digestore 3	200 ml	125 ml	0.41308 g	80% - 20%
Digestore 4	200 ml	125 ml	0.61156 g	88% - 12%
Digestore 5	200 ml	125 ml	0 g	0% - 100%

Questi digestori sono poi stati posti in un bagno termostato a 35°C e agitati in modo blando per tutta la durata del monitoraggio.

Per poter mantenere il pH a valori ottimali è stata utilizzata una base di NaOH. Il fatto di utilizzare una base è perché l'attività microbica è accompagnata da una riduzione del pH. La scelta non è ricaduta sul bicarbonato di sodio poiché bisogna tener conto delle reazioni che potrebbero innescarsi:



Di conseguenza sebbene l'aggiunta della base comporti teoricamente un aumento del pH, in questo caso si realizza una soluzione tampone e il pH non aumenta.

Per quanto riguarda l'analisi del pH per ciascun digestore, è possibile constatare dalla Figura 3.3 che esso è stato mantenuto pressoché costante e pari al valore ottimale.

Nelle Figure 3.4 e 3.6 sono riportati gli andamenti delle rese di metano sia in termini di produzione giornaliera (rese "puntuali") sia in termini di produzione cumulativa nell'intera fase di monitoraggio. Tali risultati sono stati confrontati con quanto ottenuto in letteratura nelle Figure 3.5 e 3.7, mostrando un andamento del tutto analogo.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

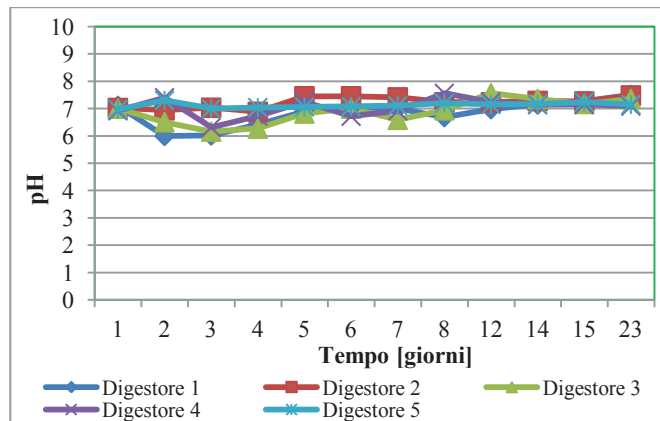


Figura 3.3 - Andamento del pH nei digestori.

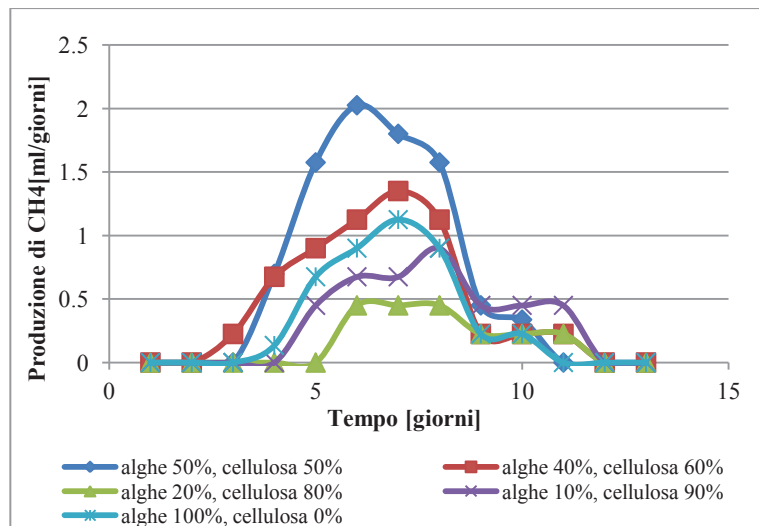


Fig. 3.4 - Resa puntuale di metano nel tempo per ciascun digestore.

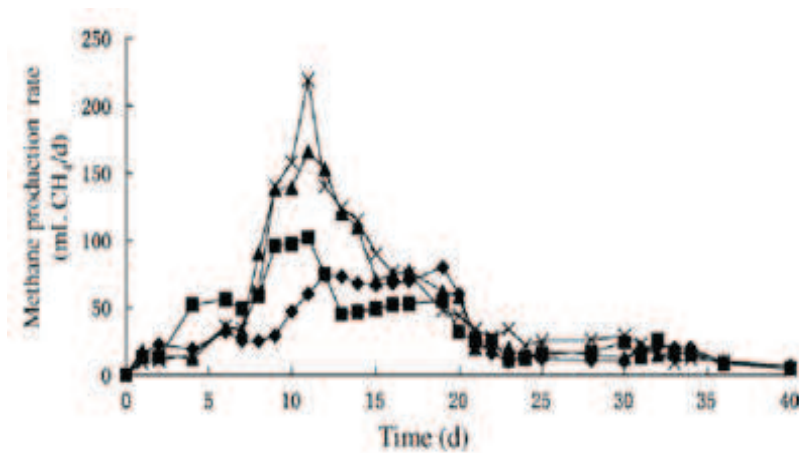


Fig. 3.5 - Resa puntuale di metano all'aumentare del contenuto di NaOH (Yunqin et al., 2009).

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 3 – Produzione di biogas da microalghe in co-digestione con residui di carta

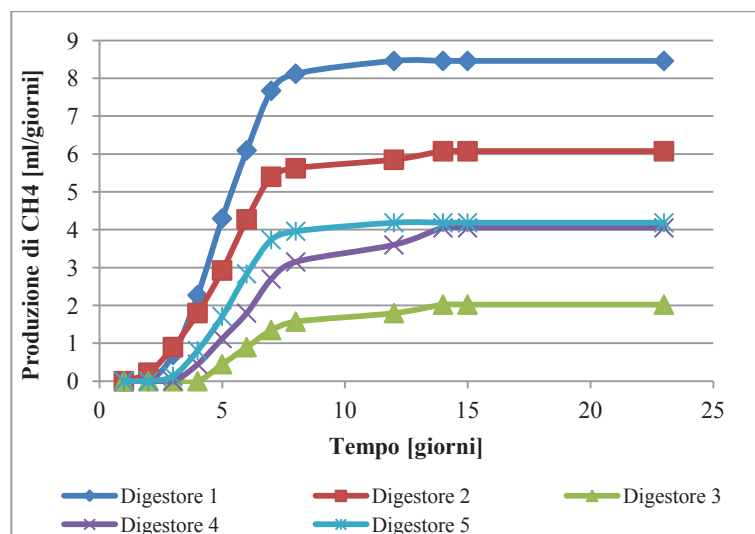


Fig. 3.6 - Resa cumulativa di metano nel tempo per ciascun digestore.

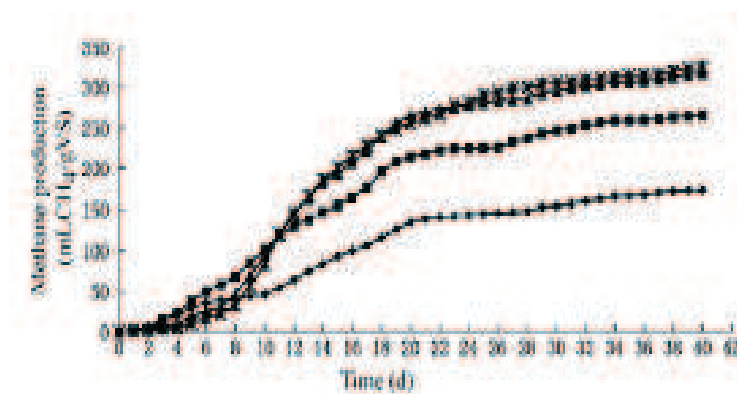


Figura 3.7 - Resa cumulativa di metano all'aumentare del contenuto di NaOH (Yunqin et al., 2009).

Il rapporto microalghe/carta è pari a 1, ovvero 50% di carta e 50% di microalghe, in accordo con quanto trovato da Yen & Brune (2007). Di conseguenza, è evidente la fattibilità nella realizzazione di operazioni di co-digestione, in particolare alimentando un quantitativo di carta di scarto identica alla quantità di biomassa algale in alimentazione al digestore.

Capitolo 4

Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota

4.1 Progettazione di un digestore in scala intermedia

Analogamente a quanto fatto per il sistema di estrazione (Parte IA), anche per il processo di digestione anaerobica è stato realizzato un progetto di massima di un digestore, tenendo conto sia della proporzionalità dei digestori utilizzati per le prove sia delle richieste da soddisfare in modo da combinare questa fase di digestione anaerobica con l'estrazione dei lipidi. Si è visto infatti che, per poter trattare complessivamente 10 kg di biomassa secca al mese nelle operazioni di estrazione, si ottengono giornalmente 200 g di alghe di scarto da poter inviare al digestore insieme a 200 g di carta, in accordo con il rapporto massico di 50% di alghe e 50% di carta.

È necessario quindi impostare dei semplici calcoli per poter definire il volume del digestore richiesto alla realizzazione di questa fase di digestione anaerobica operante in continuo.

Si è visto nel capitolo precedente che il volume totale di ciascun digestore da laboratorio è pari a 500 ml, e con il riempimento si arrivava ad una partizione del volume secondo i valori riportati in parentesi:

$$\begin{cases} V_{H_2O+ALGHE} = 200 \text{ ml} \\ V_{H_2O+BATTERI} = 125 \text{ ml} \\ V_{GAS} = 175 \text{ ml} \end{cases}$$

Dovendo trattare 200 g di alghe sarà necessario disporre di un quantitativo di acqua nel rispetto della proporzionalità mantenuta nelle prove in piccola scala. Infatti nel brodo di coltura si è stabilita una composizione massica per cui il 99.95% rappresenta la frazione di acqua e lo 0.05% è relativa alla frazione di alghe. Da qui, con una semplice proporzione si

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 4 – Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota

ottiene che per le alghe in esame il quantitativo di acqua da assicurare è paria a 400 litri. A questo valore va aggiunto il quantitativo di acqua necessario alla fase batterica.

Infatti, dalle prove condotte in laboratorio il rapporto tra alghe e batteri assicurato in ciascun digestore è pari al rapporto:

$$\frac{massa_{microalghe}}{massa_{batteri}} = \frac{0.1 g}{125 g}$$

Di conseguenza, il quantitativo di batteri da impiegare per 200g di microalghe è pari a 250 kg, ovvero 250 lt di acqua. (Il campione di batteri rispetta il rapporto 1 kg_{batteri}/ 1lt_{H2O})

Una considerazione da fare è che sia le microalghe e sia i batteri una volta messi in acqua non modificano il volume della fase acquosa ragion per cui è corretto assumere che all'intero volume liquido compete un valore di 650 lt.

Il volume relativo al gas, sarà quindi pari a 350 lt. Da ciò si evince che il volume complessivo che il digestore deve assicurare è pari a 1 m³. Assumendo come criterio che il rapporto L/D per il digestore è pari a 1/1.5, le dimensioni da assicurare al digestore sono quelle mostrate nella Tabella 4.1.

Tab. 4.1 - Dimensioni caratteristiche del digestore.

Volume [m³]	1
Altezza [m]	0.83
Diametro [m]	1.24

È stato realizzato un progetto di massima di un digestore in scala intermedia tra quella dei digestori di laboratorio attualmente usati e quella del digestore pilota previsto per l'impianto di Marina di Gioiosa Ionica. Questo permetterebbe di verificare su una scala maggiore la bontà dei risultati sulla co-digestione ottenuti in laboratorio.

Tale digestore in scala "intermedia" deve essere realizzato in acciaio inox, poggiante su un supporto tale da ottenere un'altezza che consenta di realizzare uno scarico di fondo del diametro di ½" (mezzo pollice) dotato di un apposito rubinetto all'inizio dello scarico.

La parte superiore deve essere imbullonata e dotata di guarnizione per la tenuta del gas, sulla quale dovranno essere installati:

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

Capitolo 4 – Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota

- un agitatore a doppia elica, con eliche svirgolettate; l'agitatore sarà azionato da un motore elettrico della potenza di circa 100 W, con numeri di giri regolabili tra 0 e 100 rpm;
- un manometro;
- una valvola a sfera per il prelievo del gas, alla quale verrà collegato un tubicino fino all'analizzatore portatile di biogas;
- un oblò trasparente per verificare lo stato di agitazione.

Nella parte inferiore, invece, devono essere previsti:

- una guida in acciaio, posizionata obliquamente, che peschi nel liquido fino a un'altezza di 4 cm dalla base (come mostrato nel disegno allegato) e all'interno della quale scorra uno stantuffo: nel momento in cui si vorrà alimentare nuova biomassa si rimuove lo stantuffo, si alimenta la biomassa nella guida in acciaio e la si spinge nella fase liquida proprio mediante lo stantuffo, che dovrà arrivare fino alla fine della guida per evitare il ristagno della biomassa all'interno della guida stessa; la parte superiore della guida dovrà essere chiusa con un tappo a tenuta stagna;
- una sonda per la misura della temperatura;
- due resistenze collegate a un controllore di temperatura; in questo caso deve essere prevista la coibentazione del digestore all'esterno. Se questa soluzione dovesse essere difficilmente realizzabile o troppo costosa nell'immediato, si possono comunque prevedere i pozzetti per un eventuale uso futuro delle resistenze e procedere alla termostatazione mediante una camicia esterna opportunamente collegata a un controllore di temperatura. Una soluzione ancora più semplice potrebbe essere l'immersione in una vasca in acciaio inox delle dimensioni opportune in cui la temperatura del liquido sarà controllata mediante un termostato;
- un'apertura laterale con opportuno rubinetto per il prelievo quotidiano di aliquote di biomassa in fase liquida.

Una bozza del disegno è riportata nelle seguenti Figure 4.1 e 4.2.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 4 – Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota

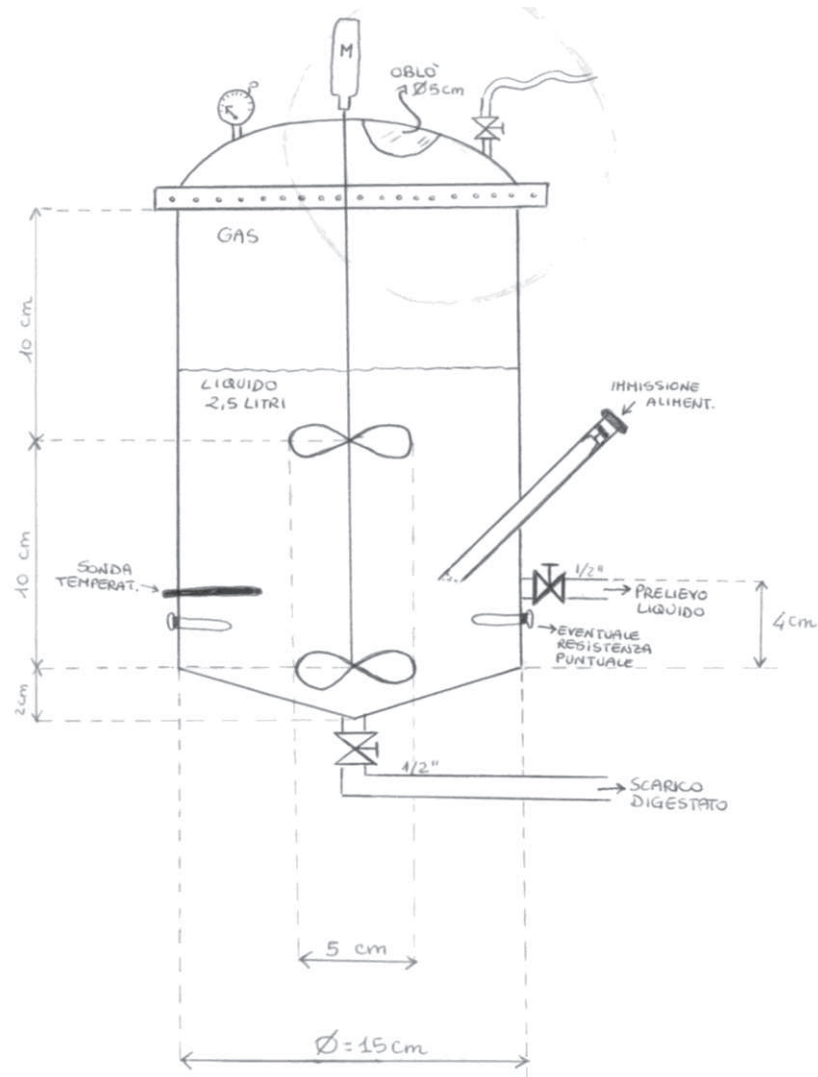


Fig. 4.1 Bozza del disegno del digestore anaerobico in scala “intermedia” – Vista frontale.

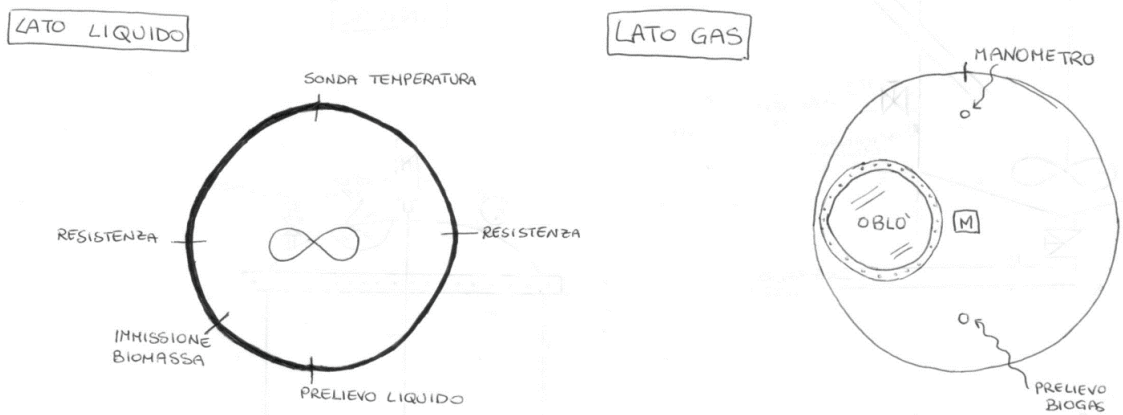


Fig. 4.2 - Bozza del disegno del digestore anaerobico in scala “intermedia” – Vista dall’alto.

4.2 Progettazione del digestore anaerobico prototipale per l'impianto di Marina di Gioiosa Jonica

Lo scale-up del digestore anaerobico in scala intermedia e, quindi, la progettazione del digestore anaerobico previsto per l'impianto prototipale di Marina di Gioiosa Jonica – nell'ambito del progetto PON01_02061 – sono stati effettuati considerando una quantità di biomassa microalgale da digerire pari a 100 kg al giorno. In base alle evidenze sperimentali sul campo e alle caratteristiche attese per avere un processo efficiente, tale biomassa ha un'umidità pari al 10%. Considerando la produttività dell'impianto di Marina di Gioiosa Jonica e assumendo un tempo di detenzione idraulico pari a 35 giorni circa, si è ritenuto più che sufficiente prediligere la configurazione di un digestore monostadio della capacità di circa 3500 litri, agitato e riscaldato. In merito invece alle caratteristiche di costruzione e materiali, l'unità prototipale progettata è prevista da realizzare in acciaio inox AISI 304 di spessore adeguato con fondi bombati e zampe di supporto per ottenere un'altezza minima da terra di 30 cm. Tale altezza dal suolo consentirà di ottenere uno scarico di fondo provvisto di saracinesca a sfera. Il digestore è coibentato ed è costituito dai seguenti elementi principali:

- una portella superiore imbullonata e provvista di guarnizione per tenuta gas, sulla quale è posizionato l'agitatore a doppia elica azionato da un motore elettrico, che è regolato da un variatore di frequenza per quanto riguarda il numero di giri e da un programmatore per quanto riguarda i tempi di azionamento;
- una specula di controllo sulla parte superiore del digestore, provvista di tergicristallo, getto di lavaggio con acqua e lampada di illuminazione a norma anti esplosione, necessaria per verificare lo stato di agitazione;
- la valvola di estrazione del gas (sempre nella parte superiore), collegata allo scarico di condensa mediante un tubo e poi al gasometro;
- un tubo di posizionamento della sonda termostatica nella parte intermedia;
- un tubo per l'immissione dell'alimentazione, collegato a una pompa;
- il tubo di uscita del digestato e di «troppo pieno», con valvole a sfera e presa campioni.

Il sistema di riscaldamento, termostato per regolare la temperatura di digestione, è realizzato con 2 resistenze elettriche con una potenza sufficiente per riscaldare il fluido immesso giornalmente e compensare le perdite per scambio termico con la massa esterna. I tempi di

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
Capitolo 4 – Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota

miscelazione della biomassa nel digestore sono impostati da un programmatore che avvia l'agitatore, ai giri prescelti e programmabili, in funzione delle esigenze di digestione ed immissione. Il programma di alimentazione è stato studiato in modo da inserire piccole quantità ogni ora alternate ad agitazioni e periodi di quiete, nei quali si ottiene una sedimentazione che consente di iniettare la biomassa fresca in una biomassa in digestione ad alto contenuto batterico, evitando *shock* termici che rallenterebbero la reazione complessiva. In altri termini, l'immissione della biomassa fresca avviene dopo un periodo di arresto della agitazione, che determina una sedimentazione della sostanza solida in fermentazione nella parte bassa del digestore, donde un rapido innesco batterico. Dopo l'immissione della materia algale fresca, si effettua una fase di miscelazione seguita da una fase di quiete e di riscaldamento di durata tale da consentire una buona miscelazione e il conseguente innesco della reazione. Il biogas prodotto nel digestore viene prelevato mediante un apposito tubicino, collegato a uno scaricatore di condensa, ed è poi inviato ad un piccolo gasometro, della capacità di 500 litri netti, che lo stocca e pressurizza a 250 mm di colonna d'acqua. Il digestato fuoriuscente dal digestore viene trasferito in una vasca con una capacità di circa 200 litri, dalla quale il digestato viene prelevato per essere analizzato in laboratorio e verificarne le possibili utilizzazioni residuali (ad esempio: produrre un ammendante organico da sperimentare e valorizzare come fertilizzante; ottenere acque di irrigazione; ecc.).

Il progetto esecutivo completo del digestore anaerobico prototipale, così come descritto sopra, è riportato nella seguente Figura 4.3.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE
 Parte IIB – Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto
 Capitolo 4 – Progettazione del digestore anaerobico in scala pilota

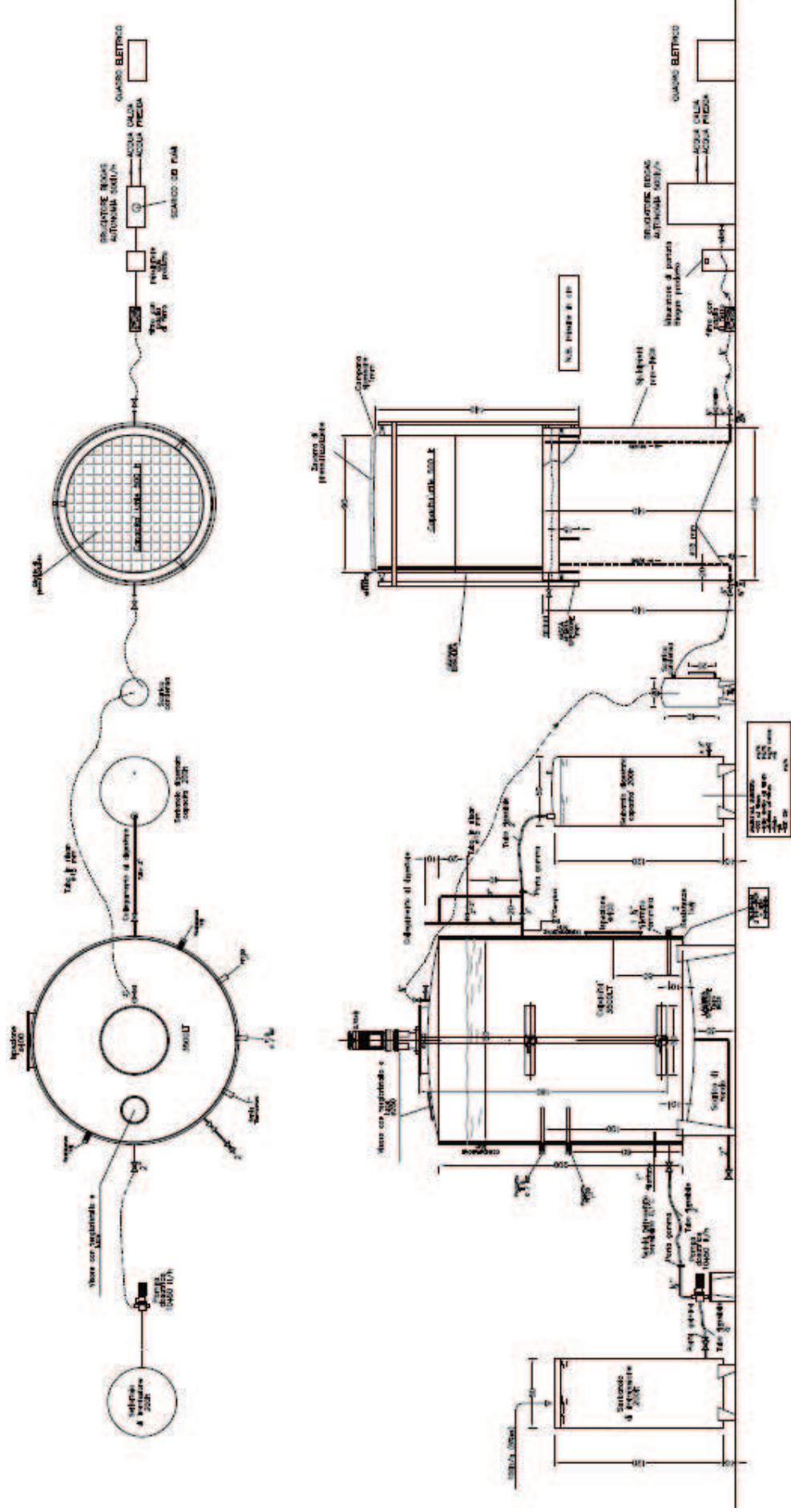


Fig. 4.3 - Progetto esecutivo per la realizzazione di un impianto pilota di digestione anaerobica del pannello residuo dopo l'estrazione dei lipidi dalle microalghe per la produzione di biogas (Tutti i diritti sono riservati e appartenenti al partenariato del progetto PON01_02061).

BIBLIOGRAFIA

Introduzione

- Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C., Lim, J.K., *Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15 (2011) 584-593.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., *Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels?*, Energy. 44 (2012) 158-166.
- Amin, S., *Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae*, Energy Conversion and Management. 50 (2009) 1834-1840.
- Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R., *Sustainable biofuels from algae*, Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change. 18 (2013) 13-25.
- Brennan, L., Owende, P., *Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 557-577.
- Carriquiry, M.A., Du, X., Timilsina G.R., *Second generation biofuels: Economics and policies*, Energy Policy. 39 (2011) 4222-4234.
- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*, Trends In Biotechnology. 26(3) (2008) 126-131.
- Demirbas, A., *Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: a solution to pollution problems*, Applied Energy. 88(10) (2011) 3541-3547.
- Demirbas, A., Demirbas, M.F., *Importance of algae oil as a source of biodiesel*, Energy Conversion and Management. 52 (2011) 163-170.
- Du, Z., Li, Y., Wang, X., Wan, Y., Chen, Q., Wang, C., Lin, X., Liu, Y., Chen, P., Ruan, R., *Microwave-assisted pyrolysis of microalgae for biofuel production*, Bioresource Technology. 102 (2011) 4890-4896.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C., *Microalgae as a raw material for biofuels production*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36 (2009) 269-274.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 1037-1047.
- Hossain, A.B.M.S., Salleh, H., Boyce, A.N., Chowdhury, P., Naqiuddin, M., *Biodiesel fuel production from algae as renewable energy*, American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 4(3) (2008) 250-254.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Huang, H.J., Ramaswamy, S., Al-Dajani, W., Tschirner, U., Cairncross, R.A., *Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: a comparative process and economic analysis*, Biomass Bioenerg. 33 (2009) 234-236.
- Jones, C.S., Mayfield, S.P., *Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy*, Current Opinion in Biotechnology. 23 (2012) 346-351.
- Kumar, K., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F.X., van Langenhove, H., *Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions*, Trends in Biotechnology. 28(7) (2010) 371-380.
- Lam, M.K., Lee, K.T., *Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward*, Biotechnology Advances. 30 (2012) 673-690.
- Li, Q., Du, W., Liu, D., *Perspectives of microalgal oils for biodiesel production*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 80 (2008) 749-756.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N., *Biofuels from microalgae*, Biotechnol. Prog. 24 (2008) 815-820.
- Malcata, F.X., *Microalgae and biofuels: a promising partnership?* Trends in Biotechnology. 29(11) (2011) 542-549.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*, Renewable Energy. 34 (2009) 1-5.
- Netravali, A.N., Chabba, S., *Composites get greener*, Materials Today. 6(4) (2003) 22-29.
- Ormerod, W.G., Freund, P., Smith, A., Davison, J., *Ocean storage of CO₂: IEA Greenhouse Gas R&D Programme* (2002).
- Posten, C., Schaub, G., *Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels – A process view*, Journal of Biotechnology. 142 (2009) 64-69.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., *Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production*, Applied Energy. 103 (2013) 444-467.
- Satyanarayana, K.G., Mariano, A.B., Vargas, J.V.C., *A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials*, International Journal of Energy Research. 35 (2011) 291-311.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe C.J., Lea-Smith, D.J., Smith, A.G., *Biodiesel from algae: challenges and prospects*, Current Opinion in Biotechnology. 21 (2010) 277-286.
- Singh, J., Gu, S., *Commercialization potential of microalgae for biofuels production*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 2596-2610.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Singh, A., Singh Nigam, P., Murphy, J.D., *Renewable fuels from algae: an answer to debatable land fuels*, Bioresource Technology. 102 (2011) 10-16.
- Suali, E., Sarbatly, R., *Conversion of microalgae to biofuels*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 16 (2012) 4316-4342.
- Vieira Costa, J.A., Greque de Morais, M., *The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae*, Bioresource Technology. 102 (2011) 2-9.
- Vijayaraghavan, K., Hemanathan, K., *Biodiesel production from freshwater algae*, Energy Fuels. 23 (2009) 5448-5453.

Parte IIA: Produzione di biodiesel mediante transesterificazione di trigliceridi

- Abigor, R., Uadia, P., Foglia, T., Haas, M., Jones, K., Okpefa, E., Obibuzor, J., Bafor, M., *Lipase-catalyzed production of biodiesel from some Nigerian lauric oils*, Biochem. Soc. Trans. 28 (2000) 979-981.
- Adesanya, V.O., Cadena, E., Scott, S.A., Smith, A.G., *Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system*, Bioresource Technology. 163 (2014) 343-355.
- Agarwal, A.K., Das L.M., *Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines*, Journal of Engineering for Gas Turbines & Power. 123 (2001) 440-447.
- Ajayebi, A., Gnansounou, E., Raman, J.K., *Comparative life cycle assessment of biodiesel from algae and jatropa: A case study of India*, Bioresource Technology. 150 (2013) 429-437.
- Al-Zuhair, S., Dowaidar, A., Kamal, H., *Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase*, Biochemical Engineering Journal. 44 (2009) 256-262.
- Amaro, H.M., Macedo, A.C., Malcata, F.X., *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*, Applied Energy. 88 (2011) 3402-3410.
- Amer, L., Adhikari, B., Pellegrino, J., *Technoeconomic analysis of five microalgae-to-biofuels processes of varying complexity*, Bioresource Technology. 102 (2011) 9350-9359.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N., Mehrotra, R., *Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62(1) (2010) 9-14.
- Banerjee, A., Chakraborty, R., *Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production – a review*, Resources, Conservation and Recycling. 53 (2009) 490-497.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Bélafi-Bakó, K., Kovács, F., Gubicza, L., Hancsók, J., *Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antractica* lipase in a solvent-free system*, Biocatalysis and Biotransformation. 20(6) (2002) 437-439.
- Billaud, F., Dominguez, V., Broutin, P., Buston, C., *Production of hydrocarbons by pyrolysis of methyl esters from rapeseed oil*, JAOCS, 72 (1995) 1149-1154.
- Bisswanger, H., *Enzyme kinetics – Principles and methods*, Wiley-VCH (2002).
- Brentner, L.B., Eckelman, M.J., Zimmerman, J.B., *Combinatorial Life Cycle Assessment to inform process design of industrial production of algal biodiesel*, Environmental Science & Technology. 45(16) (2011) 7060-7067.
- Calabrò, V., Ricca, E., De Paola, M.G., Curcio, S., Iorio, G., *Kinetics of enzymatic transesterification of glycerides for biodiesel production*, Bioprocess Biosyst Eng. 33 (2010) 701-710.
- Campbell, P.K., Beer, T., Batten, D., *Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds*, Bioresource Technology. 102 (2011) 50-56.
- Canakci, K., Van Gerpen, J., *Biodiesel production via acid catalysis*, Transactions of the American Society of Agricultural Engineers. 42 (1999) 1203-1210.
- Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., Wu, Q., *Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides**, J. Chem. Technol. Biotechnol. 84 (2009) 777-781.
- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae*, Biotechnology Advances. 25 (2007) 294-306.
- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*, Trends In Biotechnology. 26(3) (2008) 126-131.
- Collet, P., Lardon, L., Hélias, A., Bricout, S., Lombaert-Valot, I., Perrier, B., Lépine, O., Steyer, J.P., Bernard, O., *Biodiesel from microalgae – Life cycle assessment and recommendations for potential improvements*, Renewable Energy. 71 (2014) 525-533.
- Cvengroš, J., Cvengrošová, Z., *Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids*, Biomass and Bioenergy. 27(2) (2004) 173-181.
- Davis, R., Aden, A., Pienkos, P.T., *Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production*, Applied Energy. 88 (2011) 3524–3531.
- Delrue, F., Setier, P.-A., Sahut, C., Cournac, L., Roubaud, A., Peltier, G., Froment, A.-K., *An economic sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae*, Bioresource Technology. 111 (2012) 191-200.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Demirbas, A., *Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: a solution to pollution problems*, Applied Energy. 88(10) (2011) 3541-3547.
- Demirbas, A., *Importance of biodiesel as transportation fuel*, Energy Policy. 35 (2007) 4661-4670.
- Demirbas, A., *Progress and recent trends in biodiesel fuels*, Energy Conversion and Management. 50 (2009) 14-34.
- Demirbas, A., Demirbas, M.F., *Importance of algae oil as a source of biodiesel*, Energy Conversion and Management. 52 (2011) 163-170.
- De Paola, M.G., Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., Iorio, G., *Factor analysis of transesterification reaction of waste oil for biodiesel production*, Bioresource Technology. 100(21) (2009) 5126-5131.
- Du, W., Xu, Y.-Y., Liu, D.-H., Li, Z.-B., *Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production*, Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic. 37 (2005) 68-71.
- Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yáñez, E.E., Castillo, E.F., Almazan, O., *Biofuels: environment, technology and food security*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 13(6) (2009) 1275-1287.
- Fernandez, R.E., Bhattacharya, E., Chadha, A., *Covalent immobilization of Pseudomonas cepacia lipase on semiconducting materials*, Applied Surface Science. 254 (2008) 4512-4519.
- Fjerbaek, L., Christensen, K.V., Norddhal, B., *A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification*, Biotechnology and Bioengineering. 102(5) (2009) 1298-1315.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., *Biodiesel fuel production by transesterification of oils*, J. Biosci. Bioeng. 92 (2001) 405-416.
- Gallagher, B.J., *The economics of producing biodiesel from algae*, Renewable Energy. 36 (2011) 158-162.
- Gazmuri, A.M., Bouchon, P., *Analysis of wheat gluten and starch matrices during deep-fat frying*, Food Chemistry. 115(3) (2009) 999-1005.
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., Dan Irimie, F., *Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives*, Renewable Energy. 39 (2012) 10-16.
- Haas, M.J., McAloon, A.J., Yee, W.C., Foglia, T.A., *A process model to estimate biodiesel production costs*, Bioresource Technology. 97(4) (2006) 671-678.
- Haik, Y., Selim, M.Y.E., Abdulrehman, T., *Combustion of algae oil methyl ester in an indirect injection diesel engine*, Energy. 36 (2011) 1827-1835.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., Forde, G., *Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility*, Biomass and Bioenergy. 35 (2011) 741-747.
- Hossain, A.B.M.S., Salleh, H., Boyce, A.N., Chowdhury, P., Naquiuddin, M., *Biodiesel fuel production from algae as renewable energy*, American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 4(3) (2008) 250-254.
- Hsu, A.-F., Foglia, T.A., Shen, S., *Immobilization of Pseudomonas cepacia lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix: effectiveness as a biocatalyst*, Biotechnology and Applied Biochemistry. 31(3) (2000) 179-183.
- Hsu, A.-F., Jones, K., Foglia, T.A., Marmer, W.N., *Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel*, Biotechnology and applied biochemistry. 36(3) (2002) 181-186.
- Hsu, A.-F., Jones, K., Marmer, W.N., Foglia, T.A., *Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel*, Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(6) (2001) 585-588.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H., *Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system*, J. Biosci. Bioeng. 91 (2001) 12-15.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., Fukuda, H., *Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a water-containing system without an organic solvent*. J. Biosci. Bioeng. 88 (1999) 627-631.
- Kansedo, J., Lee, K.T., Bhatia, S., *Cerbera odollam (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production*, Fuel. 88 (2009) 1148-1150.
- Kemp, W.H., *Biodiesel, basics and beyond: A comprehensive guide to production and use for the home and farm*, Aztext Pr. 2006.
- King, E.L., Altman, C., *A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions*, The Journal of Physical Chemistry. 60(10) (1956) 1375-1378.
- Kovacevic, V., Wesseler, J., *Cost-effectiveness analysis of algae energy production in the EU*, Energy Policy. 38 (2010) 5749-5757.
- Kulkarni, M.G., Dalai, A.K., *Waste cooking oil an economical source for biodiesel: a review*, Industrial & Engineering Chemistry Research. 45(9) (2006) 2901-2913.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V.K., Banerjee, R., *Enzymatic transesterification of Jatropha oil*, Biotechnology of Biofuels. 2 (2009) 1-7.
- Lam, M. K., Lee, K.T., Mohamed, A.R., *Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review*, Biotechnology Advances. 28(4) (2010) 500-518.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Lam, M.K., Tan, K.T., Lee, K.T., Mohamed, A.R., *Malaysian palm oil: surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 13(6) (2009) 1456-1464.
- Lardon, L., Helias, A., Sialve, B., Stayer, J.P., Bernard, O., *Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae*, Environmental Science & Technology. 43 (2009) 6475-6481.
- Leung, D.Y.C., Wu, X., Leung, M.K.H., *A review on biodiesel production using catalyzed transesterification*, Applied Energy. 87 (2010) 1083-1095.
- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L., Li, Z., *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(1-4) (2006) 58-62.
- Liu, Y., Yan, Y., Hu, F., Yao, A., Wang, Z., Wei, F., *Transesterification for biodiesel production catalyzed by combined lipases: optimization and kinetics*, AIChE Journal. 56(6) (2010) 1659-1665.
- Lopresto, C.G., *Studio cinetico della reazione di esterificazione di acido ottanoico ed esanolo catalizzata da lipasi immobilizzata*, Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Chimica, Università della Calabria (2011).
- Luo, Y., Zheng, Y., Jiang, Z., Ma, Y., Wei, D., *A novel psychrophilic lipase from Pseudomonas fluorescens with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 73 (2006) 349-355.
- Ma, F., Hanna, M.A., *Biodiesel production: a review*, Bioresource Technol. 70 (1999) 1-15.
- Marangoni, A.G., *Enzyme kinetics, a modern approach*, Wiley-Interscience (2003).
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F., *Possible methods for biodiesel production*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 11(6) (2007) 1300-1311.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*, Renewable Energy. 34 (2009) 1-5.
- Miao, X., Wu, Q., *Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil*, Bioresource Technology. 97 (2006) 841-846.
- Mittelbach, M., *Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel*, Bioresource Technology. 56(1) (1996) 7-11.
- Mittlebach, M., *Lipase-catalyzes alcoholysis of vegetable oils*, Eur. J. Am. Oil Chem. Soc. 67 (1990) 168-170.
- Mittelbach, M., Enzelsberger, H., *Transesterification of heated rapeseed oil for extending diesel fuel*, Journal of the American Oil Chemists' Society. 76(5) (1999) 545-550.
- Murthy, G.S., *Overview and Assessment of Algal Biofuels Production Technologies*, in Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes, Elsevier Press (2011) 415-437.

- Nelson L.A., Foglia A., Marmer W.N., *Lipase-catalyzed production of Biodiesel*, J. Am. Oil Chem. Soc. 73 (1996) 1191-1196.
- Noureddini, H., Gao, X., Joshi, S., Wagner, P.R., *Immobilization of Pseudomonas cepacia lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil*, Journal of the American Oil Chemists' Society. 79(1) (2002) 33-40.
- Pencreac'h, G., Leullier, M., Baratti, J.C., *Properties of free and immobilized lipase from Pseudomonas cepacia*, Biotechnology and Bioengineering. 56(2) (1997) 181-189.
- Passell, H., Dhaliwal, H., Reno, M., Wu, B., Amotz, A.B., Ivry, E., Gay, M., Czartoski, T., Laurin, L., Ayer, N., *Algae biodiesel life cycle assessment using current commercial data*, Journal of Environmental Management. 129 (2013) 103-111.
- Peter, F., Preda, G., *Characterisation of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by a kinetic method*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 19 (2002) 467-472.
- Pienkos, P.T., Darzins, A., *The promise and challenges of microalgal-derived biofuels*, Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 3 (2009) 431-440.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O., *The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources*, Bioresource Technology. 102 (2011) 17-25.
- Ponnusamy, S., Reddy, H.K., Muppaneni, T., Downes, C.M., Deng, S., *Life cycle assessment of biodiesel production from algal bio-crude oils extracted under subcritical water conditions*, Bioresource Technology. 170 (2014) 454-461.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., *Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production*, Applied Energy. 103 (2013) 444-467.
- Reetz, M.T., Jaejer, K.-E., *Overexpression, immobilization and biotechnological application of Pseudomonas lipases*, Chemistry and Physics of Lipids. 93(1-2) (1998) 3-14.
- Ricca, E., De Paola, M.G., Calabrò, V., Curcio, S., Iorio, G., *Olive husk oil transesterification in a fluidized bed reactor with immobilized lipases*, Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. 4(3) (2009) 365-368.
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J., *A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution*, Current Opinion in Biotechnology. 19 (2008) 430-436.
- Sander, K., Murthy, G.S., *Life cycle analysis of algae biodiesel*, Int. J. Life Cycle Assess. 15 (2010) 704-714.
- Santori G., Di Nicola, G., Moglie, M., Polonara, F., *A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining*, Applied Energy. 92 (2012) 109-132.

- Satyanarayana, K.G., Mariano, A.B., Vargas, J.V.C., *A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials*, International Journal of Energy Research. 35 (2011) 291-311.
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussnug, J., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*, Bioenergy Research. 1 (2008) 20-43.
- Schulz, T., Pleiss, J., Schmid, R.D., *Stereoselectivity of Pseudomonas cepacia lipase toward secondary alcohols: a quantitative model*, Protein Science. 9 (2000) 1053-1062.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe C.J., Lea-Smith, D.J., Smith, A.G., *Biodiesel from algae: challenges and prospects*, Current Opinion in Biotechnology. 21 (2010) 277-286.
- Shah, S., Sharma, S., Gupta, M.N., *Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil*, Energy Fuels. 18(1) (2004) 154-159.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from algae*, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Report NREL/TP 580-24190 (1998).
- Shieh, C.-J., Liao, H.-F., Lee, C.-C., *Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology*, Bioresource Technology. 88(2) (2003) 103-106.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa T., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., *Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase*, J. Am. Oil Chem. Soc. 76(7) (1999) 789-793.
- Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized Candida antarctica lipase*, J. Am. Oil Chem. Soc. 77 (2000) 355-360.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga Y., *Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing*, Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17(3-5) (2002) 133-142.
- Shirvani, T., Yan, X., Inderwildi, O.R., Edwards, P.P., King, D.A., *Life cycle energy and greenhouse gas analysis for algae-derived biodiesel*, Energy & Environmental Science. 4 (2011) 3773-3778.
- Singh, J., Gu, S., *Commercialization potential of microalgae for biofuels production*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 2596-2610.
- Singh, A., Olsen, S.I., *A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels*, Applied Energy. 88(10) (2011) 3548-3555.
- Singh, A., Singh Nigam, P., Murphy, J.D., *Renewable fuels from algae: an answer to debatable land fuels*, Bioresource Technology. 102 (2011) 10-16.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Stephenson, A.L., Kazamia, E., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G., *Life-Cycle Assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors*, Energy Fuels. 24(7) (2010) 4062-4077.
- Tran, D.-T., Yeh, K.-L., Chen, C.-L., Chang, J.-S., *Enzymatic transesterification of microalgal oil from Chlorella vulgaris ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase*, Bioresource Technology. 108 (2012) 119-127.
- Tyson, K.S., *Biodiesel. Handling and Use Guidelines*, 2001.
- Vasudevan, P.T., Briggs, M., *Biodiesel production – Current state of the art and challenges*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35 (2008) 421-430.
- Vijayaraghavan, K., Hemanathan, K., *Biodiesel production from freshwater algae*, Energy Fuels. 23 (2009) 5448-5453.
- Weyer, K.M., Bush, D.R., Darzins, A., Willson, B.D., *Theoretical maximum algal oil production*, Bioenergy Research. 3 (2010) 204-213.
- Wu, W.H., Foglia, T.A., Marmer, W.N., Philips, J.G., *Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology*, Journal of the American Oil Chemists' Society. 76(4) (1999) 517-521.
- Wu, H., Zong, M., Lou, W., *Transesterification of waste oil to biodiesel in solvent free system catalyzed by immobilized lipase*, Chinese Journal of Catalysis. 11 (2004) 903-908.
- Xie, W., Ma, N., *Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles*, Biomass and Bioenergy. 34 (2010) 890-896.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., *High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters*, Journal of Biotechnology. 126 (2006) 499-507.
- Xu, G.-Z., Zhang, B.-L., Liu, S.-Y., Yue, J.-Z., *Study on immobilized lipase catalyzed transesterification reaction of tung oil*, Agricultural Sciences in China. 5(11) (2006) 859-864.
- Yang, J., Zhang, B., Yan, Y., *Cloning and expression of Pseudomonas fluorescens 26-2 lipase gene in Pichia pastoris and characterizing for transesterification*, Appl. Biochem. Biotechnol. 159 (2009) 355-365.
- Ying, M., Chen, G., *Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing Bacillus subtilis*, Appl. Biochem. Biotechnol. 137-140(1-12) (2007) 793-803.
- Zeng, X., Danquah, M.K., Dong Chen, X., Lu, Y., *Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15 (2011) 3252-3260.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Zhang, J., Chen, S., Yang, R., Yan, Y., *Biodiesel production from vegetable oil using heterogenous acid and alkali catalyst*, Fuel. 89 (2010) 2939-2944.
- Zhang, Y., Dubé, M.A., McLean, D.D., Kates, M., *Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis*, Bioresource Technology. 90 (2003) 229-240.
- Zhao, X., El-Zahab, B., Brosnahan, R., Perry, J., Wang, P., *An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel*, Appl. Biochem. Biotechnol. 43 (2007) 236-243.

Parte IIB: Produzione di biogas mediante digestione anaerobica di biomasse di scarto

- Alvarez, J.M., Dosta, J., Romero-Guiza, M.S., Fonoli, X., Peces, M., Astals, S., *A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 36 (2014) 412-427.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K., *A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas*, Biotechnology and Bioengineering. 63 (1999) 363-372.
- Aversa, M., Ferraro, F., Bertolli, F., Garrafa, L., Curcio, S., Calabrò, V., Iorio, G., *Produzione di Biogas*, Proceedings Convegno GRICU 2008, Crotone, Italia (2008).
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., *The IWA anaerobic digestion Model No 1 (ADM1)*, Water Science and Technology. 45(10) (2002) 65-73.
- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*, Trends In Biotechnology. 26(3) (2008) 126-131.
- Chynoweth, D.P., Turick, C.E., Owens, J.M., Jerger, D.E., Peck, M.W., *Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks*, Biomass and Bioenergy. 5(1) (1993) 95-111.
- Dayhoff, J.E., DeLeo, J.M., *Artificial neural networks*, Cancer – Supplement: Conference on Prognostic Factors and Staging in Cancer Management. Contributions of Artificial Neural Networks and Other Statistical Methods. 91(8) (2001) 1615-1631.
- Flaccovio, D., *Il biogas nel piano di azione nazionale*, www.darioflaccovio.it (2007).
- Gallert, C., Winter, J., *Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 48(3) (1997) 405-410.
- Gevrey, M., Dimopoulos, I., Lek, S., *Review and comparison of methods to study the contribution of variables in artificial neural network models*, Ecological Modelling. 160(3) (2003) 249-264.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Gunaseelan, V.N., *Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review*, Biomass and Bioenergy. 13(1-2) (1997) 83–114.
- Halleux, H., Lassaux, S., Renzoni, R., Germain, A., *Comparative life cycle assessment of two biofuels ethanol from sugar beet and rapeseed methyl ester*, The International Journal of Life Cycle Assessment. 13(3) (2008) 184–190.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 1037-1047.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W., *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium*, Enzyme and Microbial Technology. 27(8) (2000) 631-635.
- Khanal, S.K., *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Inc (2008).
- La digestione anaerobica di rifiuti e biomasse*, Programma sviluppo rurale regione Lombardia, 2007-2013.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., *Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives*, Bioresource Technology. 74(1) (2000) 3-16.
- Mazzitelli, A., *Produzione di energia ed elettricità da alghe*, Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Chimica, Politecnico di Milano (2010).
- Metcalf, Eddy, *Wastewater Engineerig: Treatment and Reuse*. McGraw-Hill (2002).
- Park, S., Li, Y., *Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste*, Bioresource Technology. 111 (2012) 42-48.
- Qdais, H.A., Hani, K.B., Shatnawi, N., *Modeling and optimization of biogas production from a waste digester using artificial neural network and genetic algorithm*, Resources, Conservation and Recycling. 54(6) (2010) 359-363.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., *Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable*, Biotechnology Advances. 27(4) (2009) 409-416.
- Siddharth, S., *Green energy and anaerobic digestion*, Proceedings of the 4th WSEAS Int. Conf. on Heat Transfer, Thermal Engineering and Environment, Elounda, Greece (2006).
- Stafford, D.A., Hawkes, D.L., Horton, R., *Methane production from waste organic matter*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1981).
- Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., van der Berg, C.M.G., *Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of Emiliana huxleyi in natural seawater*, Marine Chemistry. 77(2-3) (2002) 187-210.

Parte II – PROCESSI DI BIOCONVERSIONE

Bibliografia

- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Ya., *A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter*, Bioresource Technology. 56 (2-3) (1996) 229-237.
- Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., Lema, J.M., *Influence of the content in fats and protein on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters*, Bioresource Technology. 74(3) (2000) 231-239.
- Vismara, R., *Microbiologia del processo di digestione anaerobica*. Feltrinelli (1997).
- Yen, H.W., Brune, D.E., *Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane*, Bioresource technology. 98(1) (2007) 130-134.
- Zhang, G., Patuwo, B.E., Hu, M.Y., *Forecasting with artificial neural networks: The state of the art*, International Journal of Forecasting. 14(1) (1998) 35-62.
- Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., Cai, W.-M., *The influence of pH on hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion*, Environmental Technology 26(3) (2005) 329-340.

APPENDICE A

Supervisione di tesi di laurea Corso di laurea in Ingegneria Chimica

Triennale

Loredana Scaramozzino, *Crescita algale in fotobioreattori*, A.A. 2013/2014.

Maria Scaramozzino, *Estrazione dei lipidi dalle microalghe*, A.A. 2013/2014.

Specialistica/Magistrale

Laura Albo, *Analisi sperimentale e modellazione cinetica della trans esterificazione enzimatica con lipasi immobilizzata di oli commerciali con riutilizzo del biocatalizzatore*, A.A. 2012/2013.

Francesca Petrillo, *Studio di tecniche non-convenzionali di estrazione con solvente del limonene dalle bucce di limone*, A.A. 2012/2013.

Tonino Prota, *Analisi sperimentale e applicazione di reti neurali per lo studio del processo di digestione anaerobica di biomasse algali*, A.A. 2012/2013.

Irene Bavasso, *Biofuels da microalghe: analisi sperimentale del processo di estrazione dei lipidi e della co-digestione anaerobica*, A.A. 2013/2014.

Vecchio ordinamento - Ciclo unico

Andrea Brasilero, *Analisi processistica ed economica dell'estrazione di lipidi da microalghe*, A.A. 2011/2012.

Marco Gerace, *Studio delle prestazioni di un biocatalizzatore lipasi da Pseudomonas cepacia nel processo di transesterificazione enzimatica per la produzione di biodiesel*, A.A. 2011/2012.

APPENDICE B

Partecipazione a seminari, workshop, corsi, scuole di dottorato e convegni

Seminari

1. Incontro informativo in preparazione degli “Stati generali del Mezzogiorno” *La tua idea per il Paese* – Technest, Università della Calabria (22/05/2012).
2. *Modellazione numerica 3D di processi idrodinamici* – Prof. E. Napoli, Università della Calabria (24/05/2012).
3. *La proprietà intellettuale: brevetti, marchi e gestione della proprietà intellettuale* – Dott. M. Paturzo, Università della Calabria (25/10/2012).
4. *Industrial vehicle development cycle: requirements and targets* – Dr. S. Donders, Università della Calabria (15/11/2012).
5. *Fundraising e opportunità di finanziamento per la ricerca* – Dott.ssa Tucci, Università della Calabria (04/12/2012).
6. *Sviluppo dell’implementazione parallela di un metodo agli elementi finiti discontinui di Galerkin* – Prof. Bassi, Università della Calabria (06/12/2012).
7. *Cyber crime: diritti e responsabilità delle imprese nell’era digitale* – Avv. A. Greco, Università della Calabria (18/12/2012).
8. *Basic statistical interpretation of analytical results* – P. Billen & K. Wong, KU Leuven (28/05/2014).

Workshop

1. *L’evoluzione della spettroscopia infrarossa* – Thermo Scientific / Dip. DIBEST, Università della Calabria (18/06/2013).
2. *Comsol e la simulazione multifisica* – Ing. C. Cappellini, Università della Calabria (26/11/2013).
3. *Focus in Microscopia* – ZEISS/DIBEST, Università della Calabria (30/01/2014).
4. *Gli strumenti di ottimizzazione di Comsol Multiphysics* – Webinar (26/02/2014).

Corsi

1. *Writing Technical English* – Prof. J. Broughton, Università della Calabria (maggio-giugno 2012).
2. *Progettazione degli esperimenti* – Prof. A. Cossari, Università della Calabria (maggio-giugno 2012).

Scuole di Dottorato

1. GRICU PhD National School 2012: *Transport Phenomena and Separation Process*, Montesilvano (20-23/09/12), le cui lezioni tenute in lingua inglese sono state le seguenti:

- *Introduction to membranes separations* – Prof. G. Sarti, Università di Bologna
- *Overview and future perspectives; membrane crystallization* – Prof. E. Drioli, Università della Calabria
- *Nanofiltration* – Prof. S. Bandini, Università di Bologna
- *Mass transfer in membrane contactors and membrane reactors* – G. Iorio, Università della Calabria
- *Gas separations* – Prof. G. Sarti, Università di Bologna
- *Supercritical extraction* – Prof. E. Reverchon, Università di Salerno
- *Continuous chromatography* – Prof. M. Morbidelli, ETH Zürich/Politecnico di Milano
- *Mass transport in polymeric matrices* – Prof. F. Doghieri, Università di Bologna
- *Stability, aggregation and gelation in colloidal systems* – Prof. M. Morbidelli, ETH Zürich/Politecnico di Milano
- *Mechanics and fluid dynamics of colloidal aggregates* – Prof. M. Vanni, Politecnico di Torino.
- *Polymer rheology* – Prof. G. Ianniruberto, Università di Napoli
- *Research and innovation in sustainable chemistry at Chemtex from Proesa* – Ing. D. Giordano, CTO Chemtex Italia S.p.A.

2. XVII School of Pure and Applied Biophysics - I School of Plant Biology: *Renewable energy and biofuels: a biophysical and biochemical approach*, Venezia (28/01/2012-02/02/2012), le cui lezioni tenute in lingua inglese sono state le seguenti:

- *Biofuels: State of the art/Use of light energy by photosynthetic organisms* – Prof. A. Grossman, Standford (USA).
- *Water splitting in photosynthesis: learning from nature* – Prof. W. Lubitz, Mulheim (Germania).
- *Photovoltaic energy capture* – Prof. M. Masi, Politecnico di Milano.
- *Regulation of photosynthetic light use efficiency and its impact on biomass accumulation in photobioreactors* – Prof. R. Bassi, Università di Verona.
- *The lignocellulosic biomass utilization* – Prof. F. Cervone, Università La Sapienza di Roma.

- *Plant Biotechnology for biofuels* – Prof. M. Pauly, UC Berkeley (USA).
- *Biotechnological and genetic strategies to improve saccharification of plant biomass*– Prof. S. Ferrari, Università La Sapienza di Roma.
- *Photoautotrophic and heterotrophic production of biofuels from algae* – Prof. A. Grossman, Stanford (USA).
- *Algae Metabolic engineering for improved biofuels production* – Prof. O. Kruse, Bielefeld (Germania).
- *Photobioreactors, design and optimization* – Prof. A. Bertucco, Università di Padova.
- *Biological Hydrogen production* – Prof. O. Kruse, Bielefeld (Germania).
- *Lesson from an algal genome* – Dott.ssa E. Corteggiani, Università di Padova.
- *Hydrogenase, structure and function* – Prof. W. Lubitz, Mulheim (Germania).
- *The role of computational methods in the investigation of hydrogenases* – Dott. L. De Gioia (Università di Milano).
- *Hydrogenase maturation mechanisms* – Dott.ssa P. Costantini, Università di Padova.

3. GRICU PhD National School 2014: *Risk Analysis: fundamentals and applications*, Ferrara (15-19/09/2014), le cui lezioni tenute in lingua inglese sono state le seguenti:

- *Introduction to risk management* – Prof. H. Pasman, University of Texas, O' Connor Process Safety Center.
- *Quantitative risk assessment and advanced applications* – Prof. V. Cozzani, Università di Bologna.
- *Runaway reactions* – Prof. R. Andreozzi, Università di Napoli.
- *Fire & Explosion fundamentals* – A. Di Benedetto, Università di Napoli.
- *Large scale explosion* – Prof. E. Salzano, IRC-CNR.
- *Safety and reliability analysis* – Prof. R. Rota, Politecnico di Milano.
- *Quantitative risk assessment and advanced applications* – Prof. G. Uguccioni, D'Apollonia S.p.A.
- *Training on HAZOP* – Prof. G. Uguccioni, D'Apollonia S.p.A.
- *Case history analysis* – Prof. F. Chillè, GEXCON S.p.A.
- *Conclusions and round table* – Prof. G. Spadoni, Università di Bologna.

Convegni

Convegno GRICU 2012. *Ingegneria Chimica: dalla nanoscala alla macroscala*. Montesilvano (PE), 16-19/09/2012.

Convegno Calabria Expo Energia 2014. *La produzione e l'utilizzo di un combustibile da biomassa alternativa basata sulle microalghe*. Rende (CS), 10/10/2014.

APPENDICE C

Presentazioni orali, poster e pubblicazioni

N. Arcuri, V. Calabrò, R. Bruno, C. G. Lopresto, *Problematiche connesse alla progettazione di fotobioreattori per la produzione di biomassa algale da utilizzare per la produzione di biocombustibili*, 67° Convegno Nazionale ATI (Trieste, 11-14 Settembre 2012) [Presentazione Ing. Roberto Bruno].

C. G. Lopresto, N. Arcuri, S. Curcio, P. Perego, V. Calabrò, *Produzione di biodiesel mediante transesterificazione enzimatica di olii*, Convegno Nazionale GRICU 2012 (Montesilvano, 16-19 Settembre 2012) [Poster].

C. G. Lopresto, T. Prota, S. Curcio, N. Arcuri, V. Calabrò, *Biogas production from microalgae*, Scuola di Dottorato *Renewable energy and biofuels* (Venezia, 28 Gennaio- 2 febbraio 2013) [Poster e presentazione orale].

L. Albo, M. G. De Paola, C. G. Lopresto, S. Chakraborty, S. Curcio, G. Iorio, V. Calabrò, *Enzymatic transesterification of waste vegetal oil for the production of biodiesel*, International Conference on Green Technology for Environmental Pollution Prevention and control - ICGTEPC 2014 (India, 27-29 Settembre 2014) [Presentazione orale Prof.ssa Vincenza Calabrò].

C. G. Lopresto, F. Petrillo, A. A. Casazza, B. Aliakbarian, P. Perego, V. Calabrò, *A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction*. Separation and Purification Technology, Available online 28 September 2014; DOI: 10.1016/j.seppur.2014.09.015.

C. G. Lopresto, V. Calabrò, J. M. Woodley, P. Tufvesson, *Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized Candida antarctica lipase B*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Available online 30 September 2014; DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.09.011.