

**F. ZIMBARDI**

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Sezione Supporto Tecnico Strategico  
Centro Ricerche Trisaia, Matera

**E. VIOLA, G. ARCIERI  
V. VALERIO, M. CARNEVALE**

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Divisione Bioenergia, Bioraffineria, Chimica Verde  
Centro Ricerche Trisaia, Matera

# IDEAZIONE E SPERIMENTAZIONE DI SISTEMI INNOVATIVI PER LA DETOSSIFICAZIONE DI BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA FINALIZZATA ALLA CONVERSIONE IN BIOCARBURANTI

RT/2021/6/ENEA



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

F. ZIMBARDI

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Sezione Supporto Tecnico Strategico  
Centro Ricerche Trisaia, Matera

E. VIOLA, G. ARCIERI  
V. VALERIO, M. CARNEVALE

Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili  
Divisione Bioenergia, Bioraffineria, Chimica Verde  
Centro Ricerche Trisaia, Matera

# IDEAZIONE E SPERIMENTAZIONE DI SISTEMI INNOVATIVI PER LA DETOSSIFICAZIONE DI BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA FINALIZZATA ALLA CONVERSIONE IN BIOCARBURANTI

RT/2021/6/ENEA



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

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina [www.enea.it](http://www.enea.it)

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

# IDEAZIONE E SPERIMENTAZIONE DI SISTEMI INNOVATIVI PER LA DETOSSIFICAZIONE DI BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA FINALIZZATA ALLA CONVERSIONE IN BIOCARBURANTI

F. Zimbardi, E. Viola, G. Arcieri, V. Valerio, M. Carnevale

## Riassunto

Il pretrattamento di biomassa lignocellulosica per la sua trasformazione in biofuels e chemicals si basa su processi di trasformazione e separazione condotti a temperature relativamente elevate. Generalmente possono essere prodotte molecole aventi un effetto inibitorio rispetto ai successivi processi di fermentazione. Questi inibitori sono abbastanza facilmente allontanati mediante lavaggi con liquidi che però rimuovono anche i carboidrati solubili. Considerando che gli inibitori sono per lo più molecole a basso peso molecolare, è nata l'idea di provare ad allontanarli sfruttandone la volatilità. In questo lavoro è riportata una tecnica innovativa specificatamente messa a punto dagli autori per rimuovere gli inibitori formati nel pretrattamento di steam explosion di biomasse lignocellulosiche. Si è iniziato realizzando un proof of concept (TRL 2-3) con cui è stato dimostrato come fosse possibile detossificare un substrato lignocellulosico sfruttando la volatilità di alcune classi di inibitori. Il metodo è stato validato e perfezionato in laboratorio (TRL 4) e successivamente dimostrato e qualificato in un ambiente rilevante, anche sotto il profilo industriale, utilizzando una apparecchiatura commerciale operante a valle dell'impianto di pretrattamento steam explosion da 150 kg/h STELE installato nel Centro Ricerche ENEA della Trisaia (MT). È stato quindi raggiunto il TRL 8 in linea con quanto auspicato dal progetto PRIT (Pretrattamento Italiano), finanziato e realizzato nell'ambito del programma Industria 2015, nel cui contesto la ricerca è stata condotta. Sono stati ideati e dimostrati con successo 3 modalità operative: 1) Reattore a letto fisso consistente in un tubo di vetro incamiciato (termostatabile) all'interno del quale è confinato il materiale esploso contenente gli inibitori. 2) Reattore a letto fluidizzato consistente in un tubo di vetro simile al precedente ma oscillante. Infatti, contemporaneamente a un flusso di aria calda, il tubo è sottoposto a un'oscillazione verticale realizzata mediante aggancio con biella a un motore elettrico a numero di giri variabile. 3) Essiccatore pilota a letto fluidizzato.

**Parole chiave:** Detossificazione, steam explosion, inibitori, biomassa, fermentazione.

## Abstract

*The pretreatment of lignocellulosic biomass for its transformation first into carbohydrates and then from these, through fermentation processes, into biofuels and chemicals, often involves the use of high-temperature techniques. This produces compounds derived from degradation processes which are called "inhibitors" because they hinder the microbial fermentation processes. Generally, inhibitors are low molecular weight molecules, therefore volatile. Inhibitors are commonly removed by washing with water; however water also removes the soluble carbohydrates. In this work, a specific and innovative removal technique of these inhibitors is reported. The substrate is biomass pretreated by steam explosion. We started by creating a proof of concept (TRL 2-3) with which it was demonstrated how it was possible to detoxify a lignocellulosic substrate by exploiting the volatility of some classes of inhibitors. The method was validated and perfected in the laboratory (TRL 4) and subsequently demonstrated and qualified in a relevant environment, also from an industrial point of view, using commercial equipment operating continuously downstream of the 150 kg / h steam explosion pretreatment plant STELE installed in the ENEA Research Center in Trisaia (MT). A TRL 8 was therefore achieved, in line with what was hoped for by the PRIT (Pretrattamento Italiano) project, funded and implemented under the 2015 Industry program and in the context of which the research was conducted. Overall, 3 types of equipment have been designed, realized and tested:*

*1) Fixed bed reactor consisting of a jacketed glass tube (thermostatable) inside which the exploded material containing the inhibitors is confined. 2) Fluidized bed reactor consisting in a glass tube similar to the previous one but oscillating. In fact, at the same time as a flow of hot air, the tube is subjected to a vertical oscillation achieved by coupling with a connecting rod to an electric motor with a variable number of revolutions. 3) Pilot fluidized bed dryer.*

**Keywords:** Detoxification, steam explosion, inhibitors, biomass, fermentation.



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. METODOLOGIA SPERIMENTALE</b> .....	<b>10</b>
2.1 PRODUZIONE DEL MATERIALE ESPLOSO .....	10
2.2 DETOSSIFICAZIONE MEDIANTE LAVAGGIO ACQUOSO (METODO CONVENZIONALE) .....	10
2.3 DETOSSIFICAZIONE MEDIANTE ESSICCAZIONE IN STUFA (METODO CONVENZIONALE).....	10
2.4 REALIZZAZIONE DEI PROTOTIPI DI DETOSSIFICATORE SCALA BANCO.....	11
2.4.1 <i>Detossificatore a letto fisso</i> .....	11
2.4.2 <i>Detossificatore a letto vibro-fluidizzato</i> .....	15
2.5 REALIZZAZIONE DEL PROTOTIPO DI DETOSSIFICATORE SCALA PILOTA.....	20
2.5.1 <i>Montaggio e dettagli delle unità operative</i> .....	22
2.5.2 <i>Modifiche del letto vibro-fluidizzato con introduzione della linea vapore</i> .....	25
2.5.3 <i>Prove di detossificazione sul sistema pilota con aria calda non umidificata</i> .....	29
2.5.4 <i>Prove di detossificazione sul sistema pilota con aria calda umidificata</i> .....	30
2.6 PROVE COMPARATIVE DI PRODUZIONE ALCOLICA.....	31
2.7 CARATTERIZZAZIONE DEI SUBSTRATI .....	31
2.8 ANALISI DEGLI INIBITORI.....	32
2.9 IDROLISI E FERMENTAZIONE .....	33
<b>3. RISULTATI</b> .....	<b>33</b>
3.1 CARATTERIZZAZIONE DEI SUBSTRATI .....	34
3.2 ANALISI DEGLI INIBITORI NEGLI ESPLOSI .....	35
3.3 RIMOZIONE DEGLI INIBITORI MEDIANTE ESSICCAZIONE E MEDIANTE LAVAGGIO ACQUOSO (METODI CONVENZIONALI).....	36
3.4 RIMOZIONE DEGLI INIBITORI CON FLUSSO DI VAPORE IN REATTORE A LETTO FISSO (1° METODO INNOVATIVO).....	36
3.5 RIMOZIONE DEGLI INIBITORI CON ARIA E VAPORE IN REATTORE VIBRO-FLUIDIZZATO (2° METODO INNOVATIVO).....	38
3.6 IDROLISI E FERMENTAZIONE DOPO I TRATTAMENTI DI DETOSSIFICAZIONE: CONFRONTO DEI METODI SCALA BANCO. ....	42
3.7 RISULTATI SUL SISTEMA DI DETOSSIFICAZIONE SCALA PILOTA.....	43
3.7.1 <i>Detossificazione con aria calda e prove comparative di bioconversione</i> .....	43
3.7.2 <i>Detossificazione con aria calda umidificata e prove comparative di bioconversione</i> ....	45
3.7.3 <i>Prove comparative di bioconversione (idrolisi e fermentazione alcolica)</i> .....	53
3.7.4 <i>Scelta delle condizioni migliori di trattamento e produzione in continuo di esplosivo detossificato</i> .....	55
<b>4. CONCLUSIONI</b> .....	<b>58</b>
<b>5. RIFERIMENTI</b> .....	<b>59</b>



## 1. INTRODUZIONE

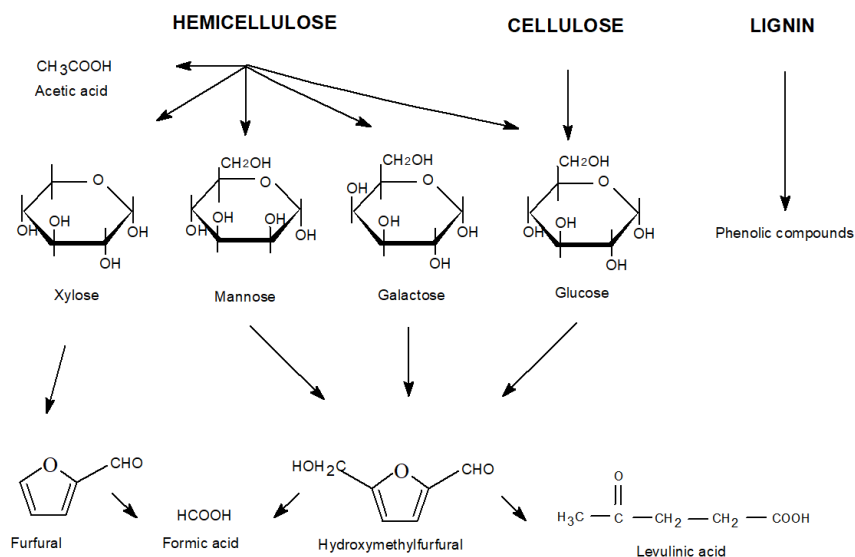
La destrutturazione delle biomasse lignocellulosiche, quali ad esempio paglia di grano (*Triticum*) e canne di fosso (*Arundo donax*), è uno dei passaggi fondamentali della produzione di carboidrati, da cui ottenere biofuels e chemicals. Essa viene eseguita mediante pretrattamenti che precedono la fase d'idrolisi enzimatica della cellulosa, così da ottenere zuccheri in forma monomerica, più facilmente fermentabili. Il pretrattamento è indispensabile per utilizzare le biomasse poiché modifica la morfologia e migliora considerevolmente l'accessibilità da parte di agenti biologici e chimici. Uno dei pretrattamenti più diffusi è la steam explosion, che impiega vapore a elevata pressione e temperatura (15-20 bar – 180-220°C). Esso opera una destrutturazione di tipo chimico e meccanico della matrice a livello molecolare. A un aumento della temperatura di trattamento corrisponde una più estesa idrolisi dei legami intra- e inter-molecolari, un effetto equivalente si ottiene aumentando i tempi di permanenza, essendo la severità del trattamento definita dal parametro di severità:

$$R_o = t \times \exp[(T-100)/14.75],$$

dove t è espresso in minuti e T in °C.

Un pretrattamento ottimale dovrebbe assicurare l'idrolizzabilità completa del solido residuo da parte di enzimi e la fermentazione degli zuccheri così ottenuti, non dovrebbe comportare degradazione dei carboidrati, essere economico e a basso impatto ambientale. In pratica, nessuno dei pretrattamenti finora sperimentati soddisfa tutti questi criteri. La steam explosion, per esempio, ha il vantaggio di richiedere impianti relativamente economici e produce cellulosa molto digeribile dagli enzimi, ma la degradazione dell'emicellulosa comporta la formazione di sostanze che inibiscono il processo di fermentazione (figura 1). In tabella 1 si riporta l'effetto di queste sostanze sui microorganismi che effettuano ad esempio la bioconversione in bioetanolo [1].





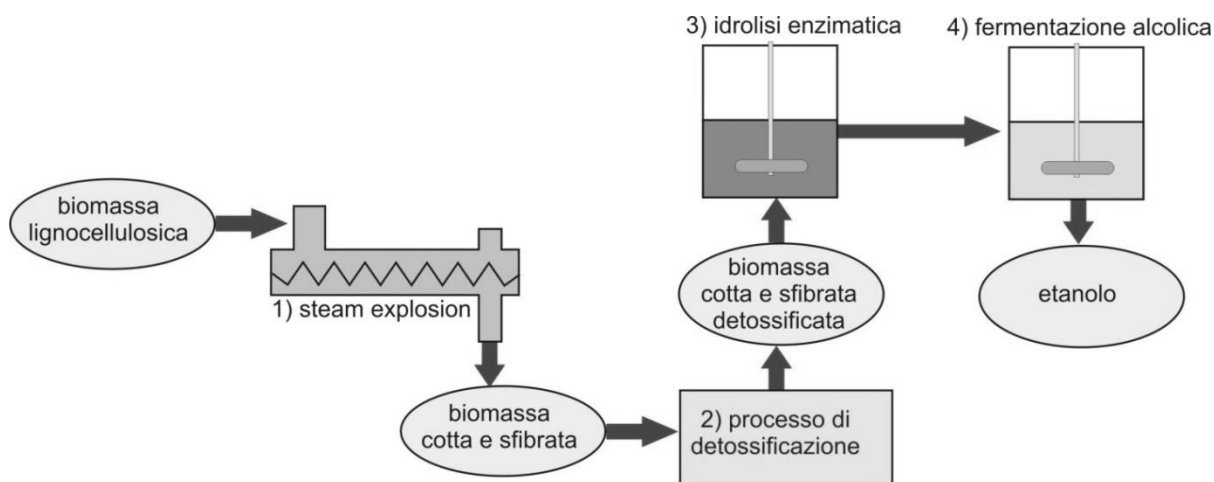
**Figura 1:** Rappresentazione schematica dell'idrolisi e decomposizione delle biomasse nel corso dei trattamenti idrotermici.

**Tabella 1:** Effetto degli inibitori sulla fermentazione alcolica.

Inibitore	Concentrazione (g <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )	Microorganismo	% Inibizione della crescita	% Inibizione della fermentazione
<b>Acido acetico</b>	4.3	<i>S. cerevisiae</i>		50%; pH=5.5
<b>Acido acetico</b>	8.0	<i>P. stipitis</i>		98%; pH=5.1
<b>Acido acetico</b>	8.0	<i>P. stipitis</i>		25%; pH=6.5
<b>Furfurale</b>	1.0	<i>P. stipitis</i>	47%	71%
<b>5-HMF</b>	3.0	<i>P. stipitis</i>	69%	90%
<b>Acido formico</b>	2.7	<i>S. cerevisiae</i>	80%	

La biomassa lignocellulosica sottoposta a steam explosion può essere utilizzata per l'ottenimento di bioetanolo mediante processi d'idrolisi della cellulosa e fermentazione alcolica. Come già evidenziato, la steam explosion facilita l'azione idrolitica sulla cellulosa rendendo il processo di produzione alcolica molto efficiente. Tuttavia si ottengono alcune sostanze derivanti da processi di degradazione termica che inibiscono il processo di fermentazione, poiché sono nocive nei confronti del lievito utilizzato (*Saccharomyces*

*cerevisiae*). La produzione di tali sostanze è generalmente di poche unità percentuali in peso rispetto al prodotto esplosivo, sono molecole generalmente volatili e tra i principali troviamo l'acido formico, l'acido acetico, il furfurale, l'idrossimetil furfurale e la benzaldeide. Il processo maggiormente utilizzato di trasformazione di biomassa lignocellulosica in bioetanolo è schematizzato in figura 2 e prevede le seguenti fasi: 1) Pretrattamento termomeccanico di destrutturazione della fibra (steam explosion); 2) Detossificazione del materiale pretrattato; 3) Idrolisi enzimatica; 4) Fermentazione alcolica.



**Figura 2:** Schema di processo della conversione della biomassa lignocellulosica in bioetanolo.

Esistono differenti metodi di rimozione di questi inibitori, ossia di detossificazione del materiale esplosivo, al fine di rendere la fermentazione alcolica priva di ostacoli. Il più comune è sicuramente un lavaggio con acqua [2], dato che gli inibitori sono idrosolubili, ma questo sistema comporta la rimozione parallela degli oligomeri solubili, soprattutto da emicellulosa, che potrebbero accrescere la resa etanolica. Un altro metodo prevede l'essiccazione del materiale esplosivo in stufa a 60 °C per molte ore; sebbene questo metodo sia risultato efficace nella rimozione degli inibitori, l'essiccazione genera un riarrangiamento delle catene polimeriche di cellulosa (indicato nella letteratura tecnica col termine anglosassone *hornification*), che rende la saccharificazione meno efficace [3]. Esistono inoltre altri metodi quali l'impiego d'idrossido di calcio, sodio solfito, carboni attivi, laccasi, oppure metodi di estrazione con solventi organici come etere o etilacetato [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12]. Tutti questi metodi presentano l'inconveniente di aggiungere *chemicals* al processo, con conseguente aggravamento delle problematiche di smaltimento.

Per queste ragioni sono stati ideati dei sistemi innovativi per detossificare la biomassa trattata. Di seguito sono riportate le descrizioni della messa a punto di due sistemi scala banco e di uno scala pilota, impiegati per la detossificazione senza ricorrere a *chemicals*.

## **2. METODOLOGIA SPERIMENTALE**

### **2.1 PRODUZIONE DEL MATERIALE ESPLOSO**

Il materiale esploso è stato prodotto con un impianto di steam explosion continuo (300 kg/h), impiegando canna comune (*Arundo donax*) e paglia di grano (*Triticum sp.*), fornite da coltivazioni locali nel Metapontino (MT). La biomassa è stata triturata mediante uno *straw chopper* per avere una pezzatura media di 2 cm, quindi umidificata e caricata nel reattore continuo (impianto STELE - STeam Explosion Legno - operante presso il C.R. ENEA della Trisaia, MT). La biomassa è stata trattata a 210 °C per 6 minuti, in modo da ottenere un substrato idoneo per un'efficiente idrolisi enzimatica [13]. Il materiale è stato prodotto in quantità di 50 kg per ogni tipologia di biomassa, quindi è stato omogeneizzato, raccolto in fusti chiusi, e conservato a 4 °C. Un campione è stato prelevato per le analisi chimiche.

### **2.2 DETOSSIFICAZIONE MEDIANTE LAVAGGIO ACQUOSO (METODO CONVENZIONALE).**

Una quantità di materiale esploso pari a circa 8 kg, proveniente da entrambe le tipologie di biomasse, è stata detossificata mediante lavaggio acquoso a 65 °C, sospendendo l'esploso in acqua a rapporto S/L 0,2. In questo modo sono rimossi dalla fase solida tutti gli inibitori solubili. La fase acquosa (27 kg) è stata separata dalla fase solida mediante un sistema filtro pressa (fori del filtro pari a 1 mm). La fase solida è stata risciacquata con acqua e rifiltrata. Una frazione della fase acquosa è stata seccata in stufa a 60 °C fino alla completa eliminazione dei volatili ed il secco ottenuto è stato analizzato per la determinazione del contenuto in ceneri. I materiali seccati, sono stati macinati e caratterizzati per la determinazione del contenuto di lignina e carboidrati.

### **2.3 DETOSSIFICAZIONE MEDIANTE ESSICCAZIONE IN STUFA (METODO CONVENZIONALE).**

Una quantità di materiale esploso pari a circa 8 kg, proveniente da entrambe le tipologie di biomasse, è stata detossificata mediante essiccazione in stufa a 60 °C per 48 h. Ogni 6-8

ore circa la biomassa è stata rimescolata per ottenere un'essiccazione uniforme. Il materiale finale aveva un'umidità inferiore al 2%. Con questo metodo sono stati rimossi dalla fase solida tutti gli inibitori volatili. I materiali seccati sono stati caratterizzati.

## **2.4 REALIZZAZIONE DEI PROTOTIPI DI DETOSSIFICATORE SCALA BANCO**

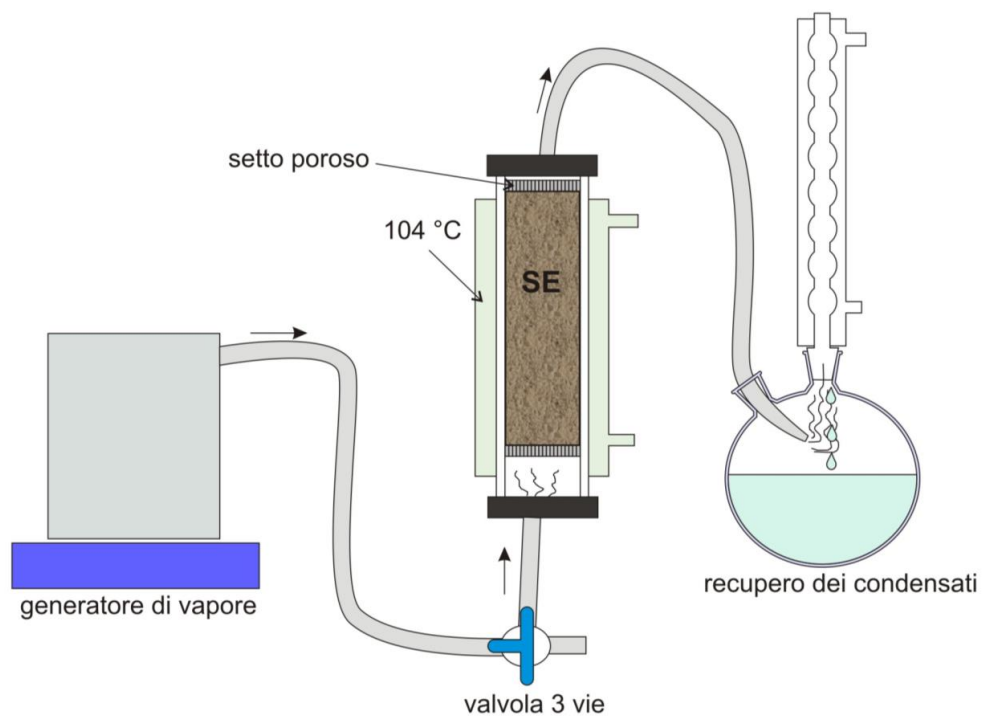
Sono stati realizzati due prototipi scala laboratorio per il trattamento del substrato esplosivo: il primo è rappresentato da un reattore tubolare a letto fisso, il secondo a letto fluidizzato. Per i due prototipi sono di seguito descritti le caratteristiche tecniche e il principio di funzionamento.

### **2.4.1 Detossificatore a letto fisso**

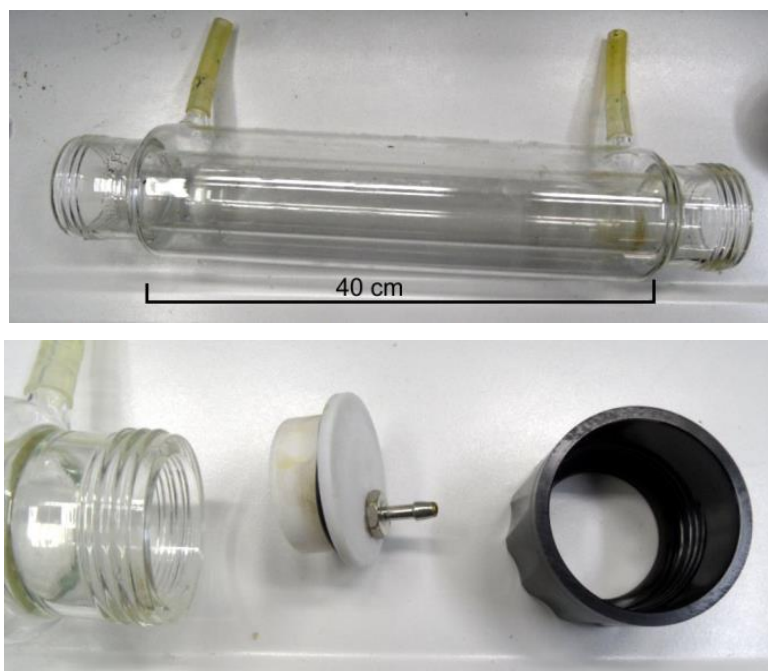
L'unità principale consiste in un tubo di vetro incamiciato (termostatabile) all'interno del quale è confinato il materiale esplosivo contenente gli inibitori. Il sistema prototipo assemblato per la detossificazione può operare su una quantità variabile da 10 a 100 g di materiale. Esso è costituito da tre elementi principali: 1) Piccolo generatore di vapore da 2 litri (costituito da una beuta contenente acqua distillata e una piastra scaldante); 2) Tubo in vetro (40x300 mm), provvisto di camicia per la termostatazione e di 2 setti porosi, contenente all'interno il materiale esplosivo; 3) Pallone a 2 colli munito di refrigerante per la raccolta ed il recupero del vapore condensato. Il sistema è rappresentato in figura 3.

Il tubo contenente l'esplosivo richiede di essere riscaldato a temperatura leggermente superiore ai 100 °C per evitare fenomeni di condensa e conseguente percolazione. Il flusso di vapore saturo è introdotto dal basso e, attraversando il materiale, trascina i volatili che sono condensati nel refrigerante, quindi raccolti nel pallone.

Il reattore verticale è stato realizzato da un vetraio specializzato eseguendo la progettazione ENEA, mentre il sistema dei filtri e i tappi a tenuta sono stati realizzati nelle officine del centro ENEA Trisaia (figure 4 e 5). I setti porosi, necessari a mantenere confinata la biomassa all'interno del reattore, sono stati realizzati come mostrato in figura 6. Il filtro è costituito da 3 pezzi assemblabili; esso può essere avvitato su di un'asta filettata coassiale al reattore. In questo modo è possibile regolare il volume di reazione avvicinando o allontanando i due setti lungo l'asta filettata.



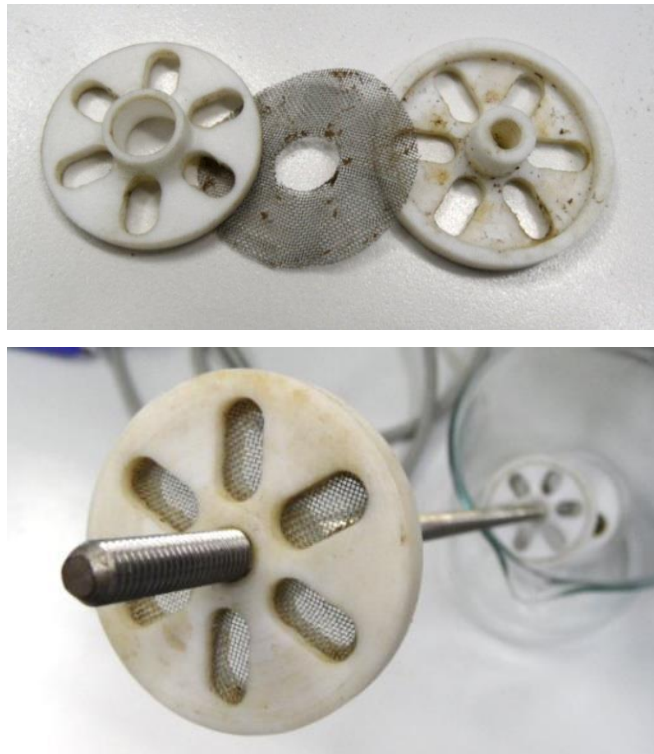
**Figura 3:** Schema del detossificatore a letto fisso: rimozione degli inibitori volatili mediante flusso di vapore.



**Figura 4:** Reattore di detossificazione scala banco in vetro. Sotto, il sistema di chiusura con tappo in teflon e ancoraggio a vite.



**Figura 5:** Asta filettata con setti porosi regolabili.



**Figura 6:** Particolare dei filtri.

Il metodo di caricamento della biomassa è mostrato in figura 7: si inserisce un solo setto con tutta l'asta all'interno del reattore, quindi si carica la quantità desiderata di biomassa da detossificare, infine si regola l'altezza del setto superiore in modo da mantenere bloccata la biomassa all'interno del reattore senza pressarla. In figura 8 è mostrata la foto del sistema assemblato secondo lo schema di figura 3.



**Figura 7:** Fasi di caricamento della biomassa all'interno del reattore.



**Figura 8:** Sistema assemblato per l'esecuzione del processo di detossificazione.

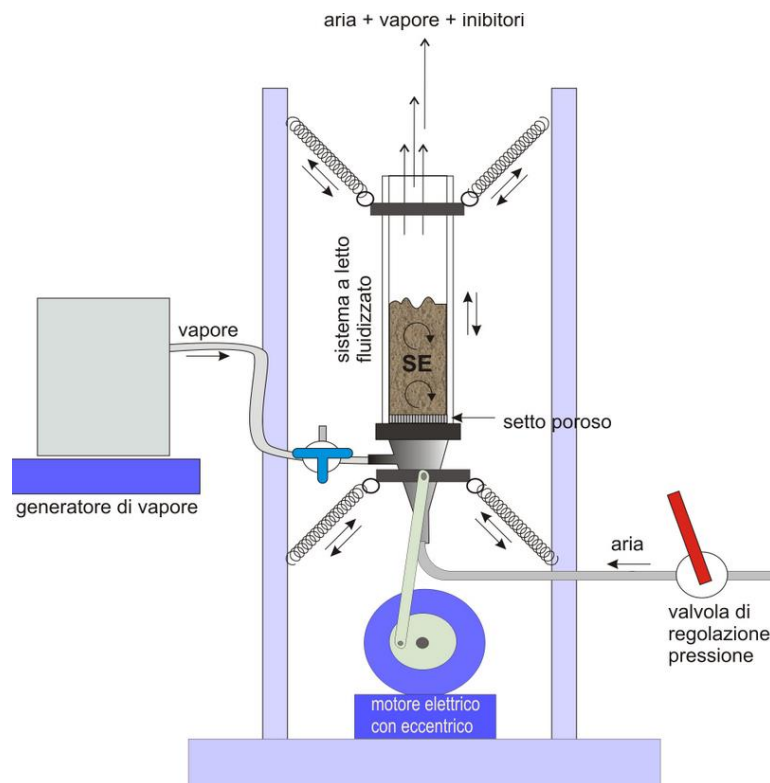
Dopo aver montato il sistema come in figura 8, ed atteso che la produzione di vapore fosse stabilizzata a 1.00 g/min, circa 100 g di biomassa da detossificare (peso secco, DM 32 %) sono stati caricati nel reattore e sottoposti al flusso costante di vapore. Durante il corso della prova, durata complessivamente 390 minuti, alcuni campioni di condensato (di circa 5 ml) sono raccolti a parte (deviando il gocciolamento in una provetta per prelievo campioni) e analizzati per determinare l'andamento della concentrazione degli inibitori nella corrente di vapore. A fine prova, tutto il condensato raccolto è stato analizzato per la determinazione delle quantità assolute d'inibitori estratti.

Sebbene con il reattore a letto fisso i risultati siano stati soddisfacenti (vedi in seguito), i tempi di trattamento sono stati particolarmente lunghi; in altre parole per detossificare 100 g di substrato esplosivo sono state necessarie 4 ore di trattamento. Inoltre il vapore aveva difficoltà ad attraversare il materiale impaccato per cui è stato indispensabile non pressare il substrato, con la conseguenza di cammini preferenziali e una detossificazione non omogenea. Per ovviare a questi inconvenienti è stato ideato e realizzato un sistema simile a letto fluidizzato, come di seguito riportato.

#### **2.4.2 Detossificatore a letto vibro-fluidizzato**

L'apparato a letto fluidizzato è stato realizzato come riportato nello schema di figura 9. Esso consiste principalmente in un tubo di vetro ( $d=5\text{cm}$ ,  $h=30\text{cm}$ ) all'interno del quale è inserito il materiale esplosivo da detossificare (ca 100 g). Contemporaneamente al flusso dal basso della miscela aria vapore che attraversa il letto di biomassa, il tubo è sottoposto a un'oscillazione verticale realizzata mediante aggancio con biella a un motore elettrico (con regolatore del numero di giri). Una combinazione ottimale tra la portata dell'aria/vapore e la frequenza/ampiezza di oscillazione consente alla biomassa (le cui particelle possiedono un diametro molto variabile, valore medio di 2-3 mm) di rimanere nello stato di fluidizzazione, migliorando il flusso interparticellare della miscela aria/vapore e conseguentemente la rimozione degli inibitori volatili.





**Figura 9:** Schema del detossificatore a letto vibro-fluidizzato

L'immissione di aria calda insieme al vapore permette di eliminare la camicia di termostatazione (altrimenti necessaria per evitare le condense), e consente una buona fluidizzazione del materiale regolando la pressione in entrata. In questo caso, il vapore agisce prevalentemente come agente umidificante evitando l'*hornification* della fibra che avviene durante l'essiccazione. Così facendo lo strippaggio degli inibitori avviene in modo più omogeneo e in tempi più rapidi.

Il sistema è stato realizzato nei laboratori ENEA e mostrato in figura 10. La vibrazione è garantita da un'asta verticale collegata alla base del reattore, il quale è ancorato con molle di acciaio su di un'impalcatura verticale. La base dell'asta è collegata a metà raggio di una puleggia di un motore a numero di giri variabile, così da sottoporre il reattore a moti oscillatori verticali a frequenza desiderata. L'ampiezza dell'oscillazione può variare da 1 a 5 cm. Prima della prova con il substrato esplosivo è stata misurata la temperatura del flusso di aria/vapore mediante un termometro. Il tubo del flusso di vapore s'innesta orizzontalmente al cono inferiore (base del reattore), quest'ultimo realizzato in modo da alloggiare un setto poroso in grado di sostenere la biomassa caricata. L'aria, riscaldata mediante circolazione in serpentina di rame immersa in bagno termostato, entra direttamente da sotto. È importante monitorare la giusta combinazione dei flussi aria/vapore in modo da evitare di

umidificare eccessivamente la biomassa, rendendola pesante e compatta, fino ad otturare il filtro e arrestando la fluidizzazione del letto, figura 11).



**Figura 10:** Detossificatore a letto vibro-fluidizzato.



**Figura 11:** Uno dei problemi riscontrati è l'intasamento del filtro quando il rapporto vapore/aria è elevato: la biomassa si bagna troppo otturando i pori del filtro.

Le prove iniziali sono state mirate all'ottimizzazione dei parametri fisici del processo di detossificazione mediante il reattore vibro-fluidizzato. Sono stati ottimizzati i seguenti parametri: flusso aria/vapore, frequenza e ampiezza di oscillazione, pressione dell'aria, rapporto aria/vapore e temperatura del flusso. Per meglio regolare il flusso di vapore è stato impiegato un boiler costituito da una serpentina di rame immersa in olio riscaldato a 120 °C, nella quale entra acqua a flusso noto ed esce vapore da iniettare nel sistema. Inoltre, per

trattenere le particelle più minute di biomassa (altrimenti spinte dal flusso al di fuori del reattore), è stato necessario introdurre sulla testa del reattore una camera di espansione, (figura 12).

Nel trattamento degli esplosi di paglia e canna, i parametri ottimizzati sono quelli riportati in tabella 2. La corretta fluidizzazione è stata monitorata empiricamente introducendo, rispetto alla biomassa, corpi più leggeri (palline di polistirene) sul fondo e corpi più pesanti (palline di vetro) in superficie: durante la fluidizzazione della biomassa i corpi introdotti si muovevano rapidamente secondo la densità relativa, cioè le palline di polistirolo procedevano verso la superficie mentre le palline di vetro affondavano, a conferma del comportamento fluido della biomassa.

Il substrato esploso è stato caricato nel cilindro di vetro verticale in quantità pari a circa 100 g. Il flusso di aria impiegato, che ha assicurato una buona fluidizzazione, è stato di circa 9 m<sup>3</sup>/h. Il rapporto (acqua vaporizzata)/aria, è stato variato e ottimizzato a circa 20 g di vapore per m<sup>3</sup> di aria.

**Tabella 2:** Parametri ottimizzati per l'impiego del reattore a letto vibro-fluidizzato.

<b>Parametro</b>	<b>regolazione</b>
Ampiezza di oscillazione	2 cm
Flusso di aria	9 Nm <sup>3</sup> /h
Pressione a valle della valvola di regolazione	0.4 barg
Portata del vapore	80 ml/h
Temperatura del flusso aria/vapore	60 °C
Frequenza	6-7 Hz



**Figura 12:** Reattore di detossificazione vibro-fluidizzato in esercizio, con flusso aria/vapore ottimizzato e camera di espansione per il blocco delle polveri.

I tempi necessari per una buona detossificazione vanno dai 40 ai 60 minuti. Le prove sono state condotte per circa 1 ora e durante tale periodo sono state prelevate aliquote di campione sulle quali è stata eseguita la determinazione degli inibitori residui. Alla fine del trattamento il materiale si presenta detossificato, ma in forma granulare, con grumi di biomassa grandi fino a 3 cm (figura 13). Il materiale fine, grazie al vapore che l'ha reso umido, resta appiccicato sulle pareti della camera di espansione.



**Figura 13:** Aspetto del substrato detossificato a fine trattamento.

## **2.5 REALIZZAZIONE DEL PROTOTIPO DI DETOSSIFICATORE SCALA PILOTA.**

Il sistema base del prototipo è stato acquisito presso gli impianti ENEA mediante il noleggio di una macchina pilota commerciale, ossia un essiccatore vibrante a letto fluido che è stato montato e modificato in modo da utilizzare aria calda umidificata e lavorare in serie all'impianto pilota. Il sistema di detossificazione è stato realizzato da parti che sono state montate secondo un progetto ENEA. In particolare, sono state progettate le linee degli ausiliari a partire dalle dotazioni impiantistiche esistenti e sono stati implementati i sistemi di controllo attivo e monitoraggio del processo.

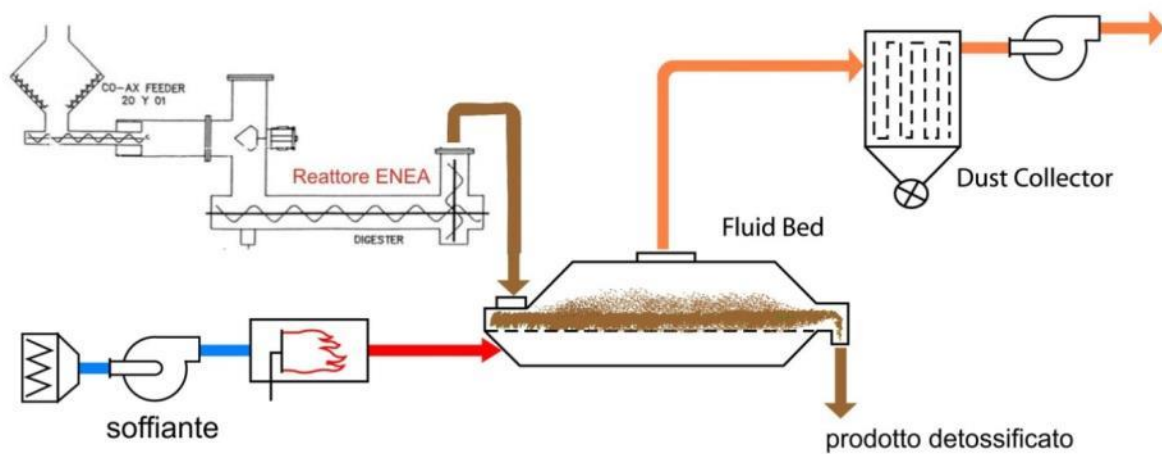
L'essiccatoio vibrante a letto fluido impiegato è stato acquisito mediante il noleggio di un'apparecchiatura in prova fornita dalla ditta TEMA process B.V. (<http://temaprocess.com/en/>). Nei processi industriali questo tipo di macchina è impiegato per essiccare direttamente materiale separato, poiché essa permette uno scambio ottimale del calore tra materiale da trasportare e sostanza gassosa. Il materiale trasportato è essiccato in modo particolarmente delicato, poiché il riscaldamento del prodotto è molto contenuto e il trasporto continuo è realizzato mediante la tecnologia a vibrazioni, che nel frattempo facilita il processo di fluidizzazione. La caratteristica principale di un essiccatoio vibrante a letto fluido è il contatto diretto del materiale separato con la sostanza termovettrice. A tal fine l'apparecchio è dotato di un fondo perforato di afflusso. Sotto a quest'ultimo si trova il deposito della sostanza termovettrice con i necessari raccordi. Generalmente, il trasportatore è coperto da una calotta fissa o vibrante che supporta l'attacco per un aspiratore. La calotta è di dimensioni sufficienti a garantire che il termovettore possa rilassarsi dopo aver attraversato il materiale trasportato e che la perdita di materiale fine sia ridotta al minimo. Gli azionamenti disponibili possono essere vibratori elettromagnetici, motovibratori o eccitatori vibranti. La scelta dipende soprattutto dal tipo di processo e dalle dimensioni dell'essiccatoio. Nel caso della macchina acquisita la vibrazione è realizzata mediante un motore elettrico. In figura 14 è mostrata l'unità principale dell'essiccatoio utilizzato per le modifiche del pretrattamento, ossia per realizzare l'accoppiamento di steam explosion e detossificazione su scala pilota.

La detossificazione del substrato esplosivo, eseguita a valle del reattore pilota di steam explosion, necessita tuttavia di un sistema complesso costituito da 3 unità fondamentali: 1) Soffiante di aria calda, 2) Essiccatoio vibrante, 3) Ciclone di abbattimento polveri. Le 3 unità

sono assemblate in serie come riportato nello schema di figura 15. Nella figura 16 è riportata una foto con una vista di insieme del sistema assemblato con le 3 unità collegate, praticamente adiacente al reattore continuo di steam explosion preesistente. Per eseguire la detossificazione con corrente di aria e vapore è stato necessario fare una modifica del sistema, realizzando una linea aggiuntiva per l'ingresso del vapore nella linea di aria calda.



**Figura 14:** Unità centrale dell'essiccatoio vibrante pilota (fonte: temaprocess.com).



**Figura 15:** Schema del sistema di detossificazione accoppiato all'impianto di steam explosion.





**Figura 16:** Realizzazione del sistema di detossificazione presso l'impianto ENEA.

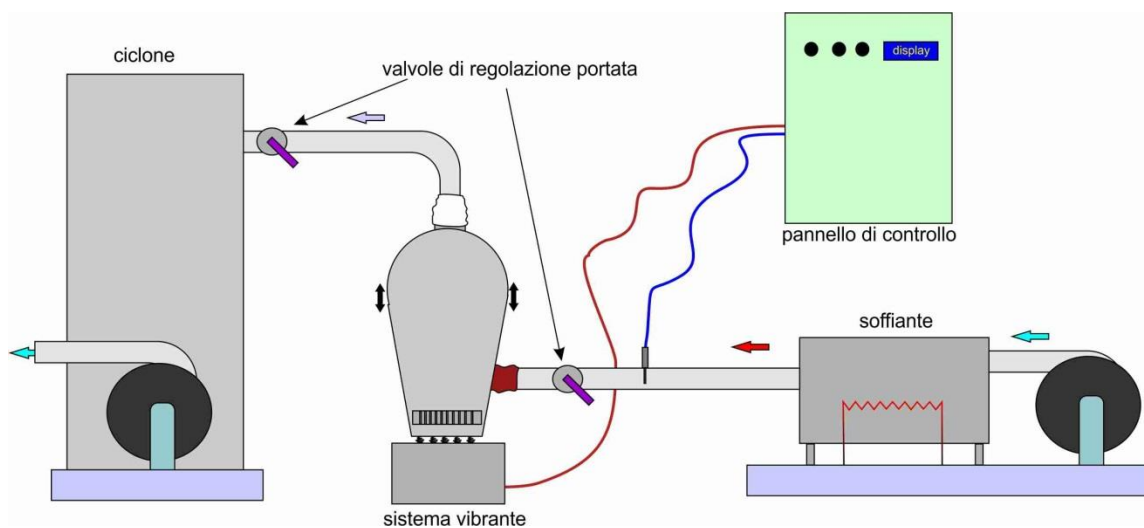
### 2.5.1 Montaggio e dettagli delle unità operative.

Il sistema di detossificazione è stato montato seguendo una procedura specifica necessaria per il corretto funzionamento dell'intero processo. Nel caso dell'accoppiamento della soffiante all'essiccatoio vibrante, e del collegamento di quest'ultimo al ciclone di abbattimento polveri, occorre che le giunture siano flessibili poiché la soffiante e il ciclone sono apparecchiature fisse, mentre l'unità vibrante è un sistema ovviamente in movimento. Per questa ragione i collegamenti sono stati realizzati mediante raccordi deformabili, ossia maniche di gomma o stoffa (figura 17). Grazie a questi accorgimenti l'unità vibrante può oscillare senza trasferire il movimento alle apparecchiature fisse a essa collegate.



**Figura 17:** Raccordi flessibili per il collegamento del flusso di aria al letto vibrante (a sinistra), e per il collegamento al ciclone di cattura delle polveri (a destra).

Dalla figura 17 è possibile notare che il raccordo tra la parte superiore dell'essiccatoio vibrante ed il tubo del ciclone è realizzato in tessuto. Questa peculiarità ha l'importante funzione di osservare visivamente depressioni (il raccordo si sgonfia) o sovrappressioni (il raccordo si gonfia) che devono essere evitate per il corretto funzionamento del sistema. Nel caso di depressioni, ossia il ciclone aspira troppo, il materiale soggetto a essiccazione potrebbe essere eccessivamente aspirato, mentre nel caso di sovrappressioni, ossia il ciclone aspira poco, moti turbolenti dell'aria calda soffiata all'interno del letto vibrante possono impedire la corretta fluidizzazione del materiale trattato. La corretta portata d'aria, ottimale per la vibro-fluidizzazione, può essere regolata mediante valvole di regolazione situate all'ingresso e all'uscita del sistema vibrante (figura 18). Mediante un pannello di controllo è possibile controllare la temperatura del flusso d'aria e la frequenza delle oscillazioni del sistema vibrante. In figura 19 è mostrato il letto removibile costituito da una griglia forata: essa sostiene il materiale da essiccare mentre vibra ed il flusso d'aria passa attraverso i fori. Lateralmente al sistema vibrante sono disposti 2 ingressi (figura 20) utili per misurare la temperatura del materiale sopra il letto e per misurare la pressione. Se il substrato è introdotto freddo la temperatura registrata nel fluidizzato può scendere fino a 70 °C, quando ad esempio la temperatura del flusso d'aria è di 120 °C.



**Figura 18:** Schema del sistema di detossificazione pilota facente uso dell'essiccatoio vibrante.



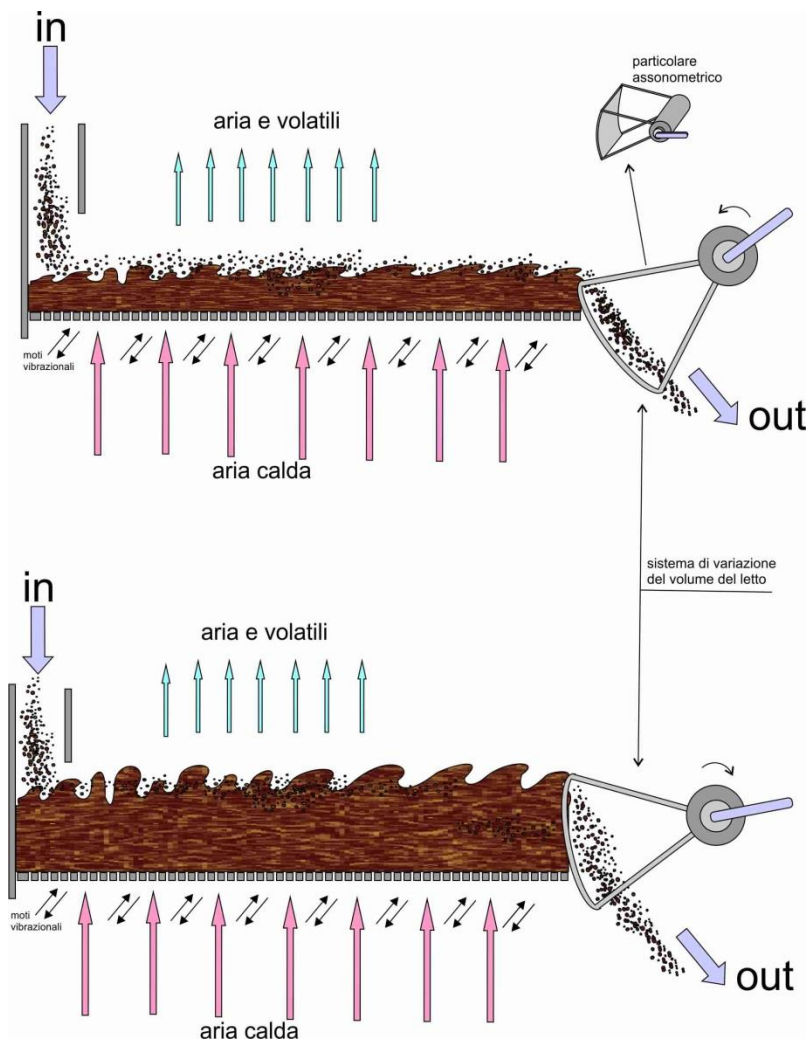


**Figura 19:** Particolare della griglia forata costituente il letto vibrante.

Lo strato di materiale trattato, che durante il corso della prova è soggetto alla vibrofluidizzazione, può essere regolato in termini di volume mediante una parete ad altezza variabile come mostrato in figura 21. Questo fattore è importante poiché è legato ai tempi di permanenza del substrato al flusso di aria. La portata del materiale è legata al flusso di entrata, ossia, a letto stabilizzato e riempito, se si introduce 1 kg/h ne esce 1 kg/h; tuttavia maggiore è il volume del letto tanto maggiore è la massa trattata con cui il materiale fresco viene a contatto, aumentando così l'efficienza.



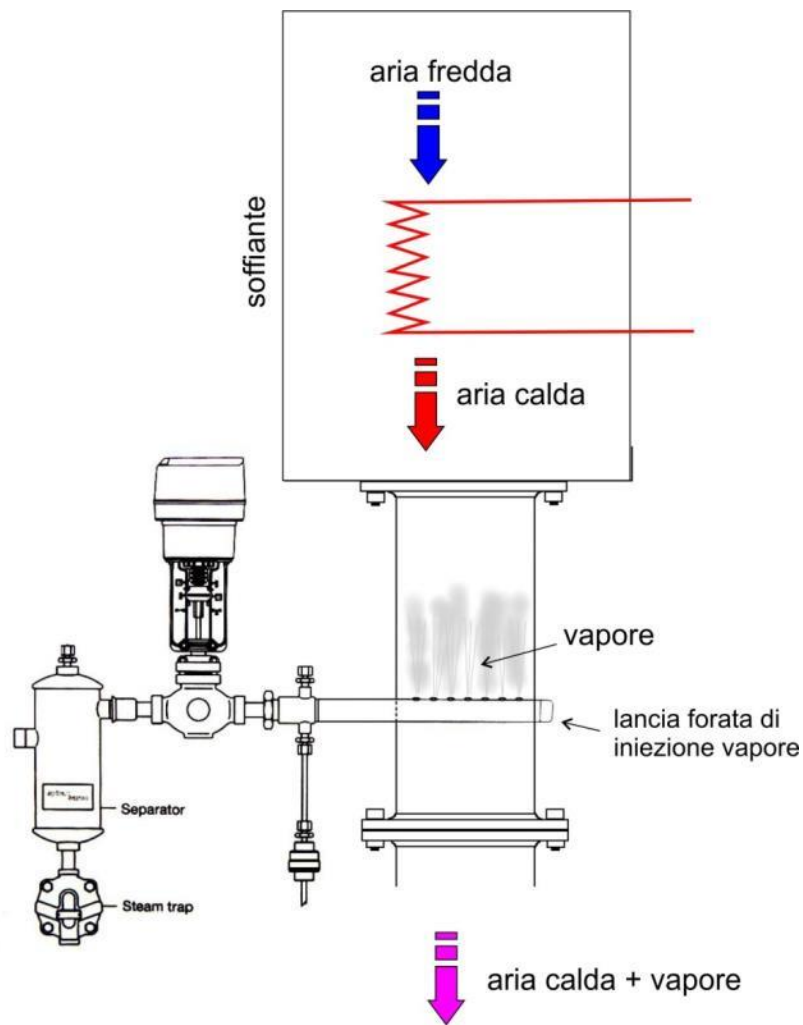
**Figura 20:** Ingressi laterali per il controllo di pressione e temperatura.



**Figura 21:** Metodo di regolazione del volume di substrato nel letto vibrante.

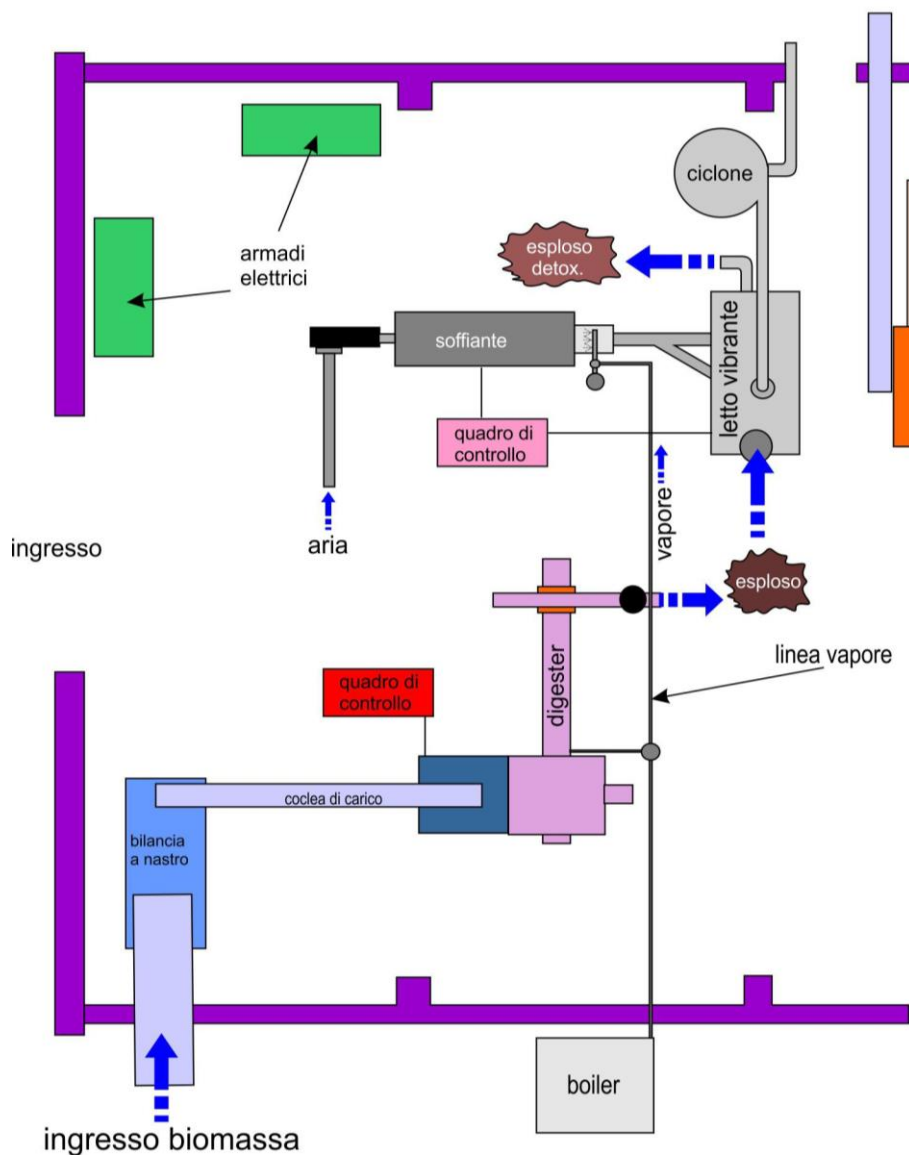
### 2.5.2 Modifiche del letto vibro-fluidizzato con introduzione della linea vapore

Come descritto prima, la necessità di mantenere umida la biomassa mentre sono allontanati gli inibitori, ha comportato la necessità di realizzare una modifica del sistema introducendo vapore al flusso di aria calda generato dalla soffiante. In questo modo è stato realizzato su scala pilota il processo prima sviluppato su scala banco. Per umidificare con il vapore la corrente di aria calda, è stata costruita una sezione aggiuntiva, inserita tra la soffiante e il letto fluidizzato (figura 22). Questa sezione contiene una lancia d'iniezione del vapore, il quale, miscelato all'aria calda, attraversa la biomassa nell'essiccatoio vibrante, mantenendo umida la biomassa mentre gli inibitori sono trascinati dalla corrente.



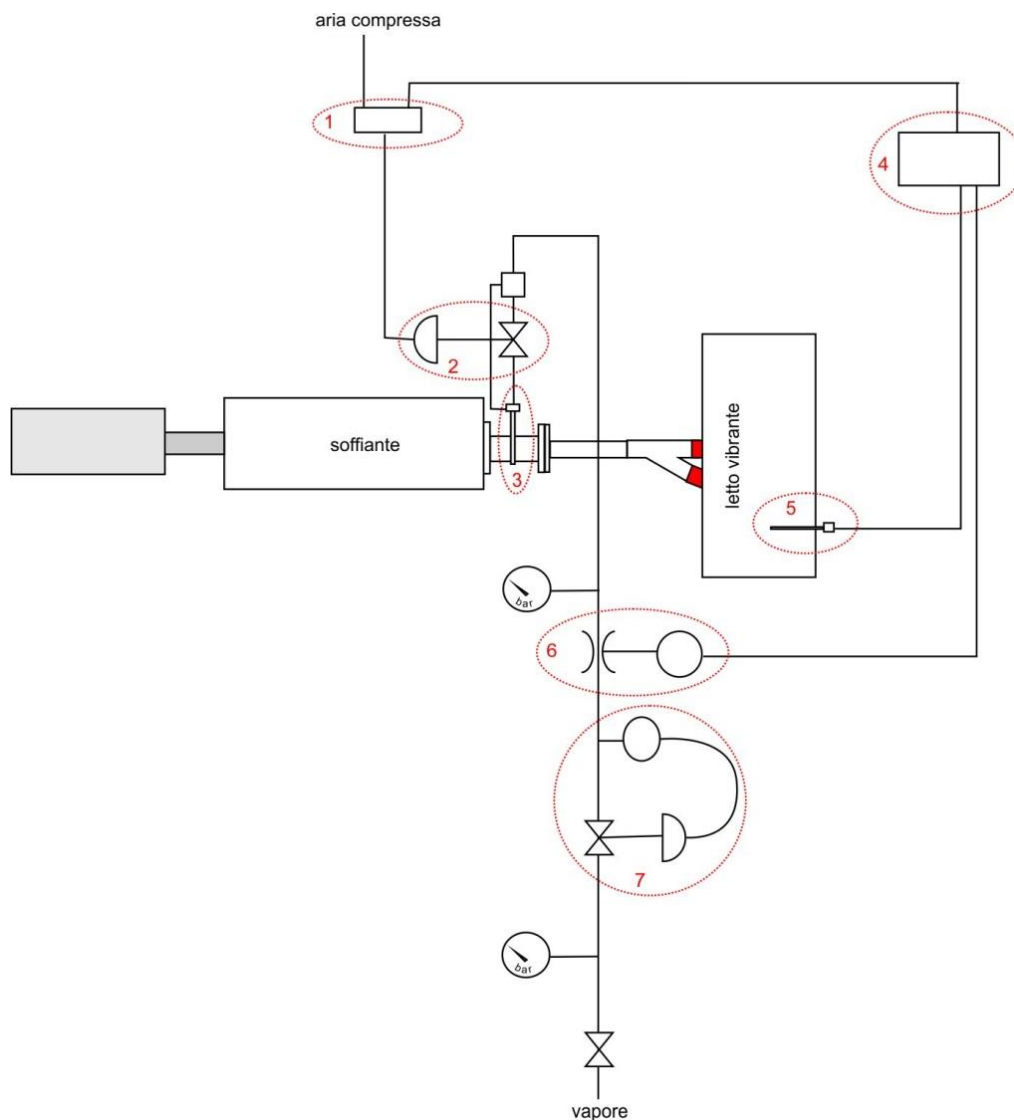
**Figura 22:** Schema dell'introduzione del vapore nella linea dell'aria calda.

Dal disegno di figura 22 è possibile osservare che il getto del vapore è in contro corrente al flusso dell'aria calda: questo accorgimento serve a meglio miscelare aria e vapore per effetto delle turbolenze generate dall'incontro/scontro dei flussi. La linea completa del vapore è stata realizzata ex novo nei pressi dell'impianto esistente, collegandosi alla linea del vapore del digester. In figura 23 è schematizzato il collegamento del vapore al sistema di detossificazione, adiacente all'impianto esistente di steam explosion, così da realizzare la produzione di esplosivo detossificato a valle del pretrattamento.



**Figura 23:** Pianta della hall con le sezioni pretrattamento steam explosion e detossificazione letto vibro-fluidizzato aria/vapore.

L'introduzione del vapore è stata progettata e realizzata mediante un sistema per il controllo fine della dose di umidità nell'aria che attraversa la biomassa nel letto vibrante. I dettagli sono schematizzati in figura 24.



**Figura 24:** Schema dettagliato della linea vapore: 1) convertitore, 2) valvola di regolazione portata, 3) lancia di iniezione vapore, 4) elaboratore programmato, 5) sonda di umidità e temperatura, 6) misuratore di portata, 7) riduttore di pressione automatizzato.

Il sistema schematizzato in figura 24 consente di regolare ed impostare un flusso di aria con il livello di umidità desiderata all'interno del letto vibrante, così da ottenere un prodotto non troppo secco, ma nemmeno troppo bagnato. Le condizioni ideali di umidità della biomassa, verificate in laboratorio per evitare i fenomeni di *hornification*, si aggirano intorno a valori tra il 15 – 50%. Valori superiori comportano una cattiva fluidizzazione poiché la biomassa, troppo umida e pesante, diventa attaccaticcia e compatta. Il sistema prevede un riduttore di pressione, poiché per umidificare è richiesta una pressione inferiore rispetto a quella utilizzata dalla steam explosion. A seguire, sempre lungo la linea, è stato predisposto un misuratore di portata, che fornisce il segnale a un elaboratore programmabile. L'elaboratore

consente di impostare l'umidità desiderata, quest'ultima è rilevata da una sonda inserita all'interno del letto vibrante. In base al valore impostato, il programmatore invia il segnale a un convertitore che apre e chiude una valvola di regolazione portata, in modo da iniettare la giusta dose di vapore all'interno della linea d'aria calda prodotta dalla soffiante. Come prima riportato, la linea del vapore costituisce una modifica a un'apparecchiatura industriale utilizzata per essiccare materiali (generalmente scarti alimentari umidi) mediante la tecnologia che utilizza aria calda e un letto vibrante. La linea è stata quindi ideata e realizzata da personale e mezzi ENEA direttamente sul posto, in modo da poter sperimentare una tecnologia esistente ma modificata per finalità concernenti il miglioramento del processo di produzione di etanolo da lignocellulosici. La sperimentazione del sistema di detossificazione su esplosivo reale, prodotto dall'impianto ENEA, è stata eseguita con lo scopo di ottimizzare le condizioni operative del sistema di detossificazione (flusso aria/vapore e letto vibrante) accoppiato al digester di steam explosion da 150 kg/h. L'attività sperimentale ha verificato inoltre l'effettiva capacità di detossificazione mediante prove comparative di produzione alcolica eseguite su campioni trattati e non trattati. Nella foto a seguire (figura 25) sono riportate alcune fasi di realizzazione della linea del vapore.



**Figura 25:** Fasi della realizzazione della linea vapore.

### **2.5.3 Prove di detossificazione sul sistema pilota con aria calda non umidificata**

Il materiale esplosivo (da paglia di grano) prodotto dal *digester* dell'impianto di steam explosion STELE, è stato caricato nel letto vibro-fluidizzato in modo da mantenere un flusso



di materia costante. La temperatura dell'aria calda, generata dalla soffiante, è stata impostata in modo che la temperatura registrata nel substrato fluidizzato fosse tra i 60 e i 70 °C. La biomassa secca è stata recuperata sia all'uscita del letto fluido che sul fondo del ciclone di aspirazione dei volatili. I campioni di biomassa così trattati sono stati quindi testati per le prove di bioconversione, al fine di verificare l'efficacia del trattamento di detossificazione mediante il metodo ottimizzato con l'essiccatoio vibrante.

#### **2.5.4 Prove di detossificazione sul sistema pilota con aria calda umidificata**

Le prove di detossificazione mediante l'impiego dell'essiccatoio vibrante e di una corrente di aria umida sono state eseguite mediante l'apparecchiatura installata e modificata con l'aggiunta della linea vapore. La temperatura dell'aria calda umidificata è stata regolata in modo da mantenere il substrato a 60-70 °C, in modo da riprodurre le condizioni ottimali già determinate su piccola scala. Temperature superiori non sono state prese in considerazione per limitare sia il consumo energetico del trattamento termico derivante dall'uso di correnti gassose calde sia la decomposizione degli zuccheri termolabili (emicellulosa). La durata del trattamento e il grado di umidificazione sono stati invece ottimizzati mediante un disegno sperimentale analizzando i risultati negli intervalli 10 e 50 minuti (durata del trattamento), 40 e 80 % (umidità relativa dell'aria calda).

Il disegno sperimentale è stato realizzato usando l'applicativo "Essential Experimental Design ver. 2.214 ©" (freeware, by D.D. Steppan, J. Werner & R.P. Yeater), il quale fornisce un'analisi statistica e funzionale. È stato impostato un disegno con modello quadratico a 6 termini "*face centered, central composite*" con 2 *center points* per studiare l'effetto combinato di tempo e umidità di trattamento. Mediante questo modello la funzione che interpola i risultati sperimentali è:

$$R = b_0 + b_1 \cdot Ur + b_2 \cdot t + b_3 \cdot Ur^2 + b_4 \cdot t^2 + b_5 \cdot Ur \cdot t$$

Dove R è la risposta (es. inibitori residui),  $b_n$  i coefficienti, Ur l'umidità relativa (%), t il tempo di trattamento (minuti).

Il numero di prove richiesto per questo modello è 10 (tabella 3). Come principale risposta sperimentale, funzione dei parametri studiati (tempo e umidità) è stata definita la quantità residua d'inibitori nell'esplosivo trattato. Verifiche di conversione in etanolo sono seguite a valle dell'ottimizzazione.

**Tabella 3:** Condizioni sperimentali per l'ottimizzazione del processo di detossificazione mediante essiccatoio vibrante e corrente di aria umidificata.

<i>Exp #</i>	<i>Ur,%</i>	<i>t,min</i>
1	40	10
2	40	30
3	40	50
4	60	10
5	60	30
6	60	30
7	60	50
8	80	10
9	80	30
10	80	50

## 2.6 PROVE COMPARATIVE DI PRODUZIONE ALCOLICA

I metodi di detossificazione descritti sono stati comparati verificando la produzione alcolica finale. I risultati finali sono stati riportati in termini di grammi di etanolo prodotto per grammo di biomassa di partenza. Parallelamente è stata eseguita una prova senza detossificazione, questo per verificare che la quantità d'inibitori presenti nel materiale esplosivo era tale da inibire la fermentazione, rendendo così indispensabile il processo di detossificazione a valle della steam explosion.

## 2.7 CARATTERIZZAZIONE DEI SUBSTRATI

La determinazione delle ceneri, espressa come percentuale rispetto al campione secco di partenza, è stata ottenuta in seguito a lenta combustione della biomassa a 600° C, in muffola (rampa di 100°C/h fino a 600 °C, quindi 8 ore a 600 °C). La percentuale di ceneri è indicativa del contenuto di materiale inorganico presente in un campione.

La determinazione degli estrattivi è stata eseguita con una miscela etanolo/toluene 1:2, in grado di estrarre oli, resine, cere, grassi e alcune gomme solubili anche in acqua. Il campione sul quale si esegue l'estrazione è stato preventivamente essiccato, macinato a 50 mesh e nuovamente introdotto in stufa a 65°C, fino a peso costante. Una quantità nota di questo campione è stata sottoposta a estrazione in soxhlet per 8 ore. Al termine delle operazioni, il materiale estratto, disciolto nel solvente, è stato recuperato per allontanamento



del solvente con rotavapor. Dopo un successivo essiccamento effettuato in stufa, il residuo è stato pesato e per determinarne la percentuale rispetto al materiale di partenza.

L'idrolisi primaria dei carboidrati presenti nel campione è stata eseguita con acido solforico al 72%. Circa un grammo di campione è stato pesato in un becker e sospeso in acido solforico, quindi tenuto in agitazione per due ore in un bagno termostato a 20°C. L'idrolisi acida è stata completata diluendo il campione con acqua fino a portare la concentrazione di acido solforico al 3% w/w e facendo bollire il tutto per altre quattro ore. La sospensione risultante contiene una parte insolubile che è recuperata mediante filtrazione e pesata: essa costituisce la lignina insolubile. La soluzione invece è stata portata ad 1 L, e su essa sono state effettuate le determinazioni di lignina solubile, leggendo l'assorbanza a 205 nm mediante spettrofotometria di assorbimento UV. Gli zuccheri presenti nella soluzione sono stati determinati mediante cromatografia ionica HIPC. L'analisi è stata condotta mediante la strumentazione cromatografica DIONEX, modello DX 500. Come eluente, è stata impiegata una soluzione di NaOH a gradiente di concentrazione (2-200 mM). Il rivelatore impiegato è di tipo elettrochimico ad amperometria pulsata.

Il campo di validità delle determinazioni è abbastanza ampio, però si opera normalmente in un intervallo di concentrazione di 0-150 ppm, in cui è stata accertata la linearità di risposta del rivelatore. Tale accorgimento è stato adottato per ridurre al minimo il carico organico introdotto in colonna. La colonna cromatografica impiegata è costituita da una fase stazionaria non porosa in polistirene-divinilbenzene (Carbopack PA1), attivata con gruppi solfonici per lo scambio anionico.

## **2.8 ANALISI DEGLI INIBITORI**

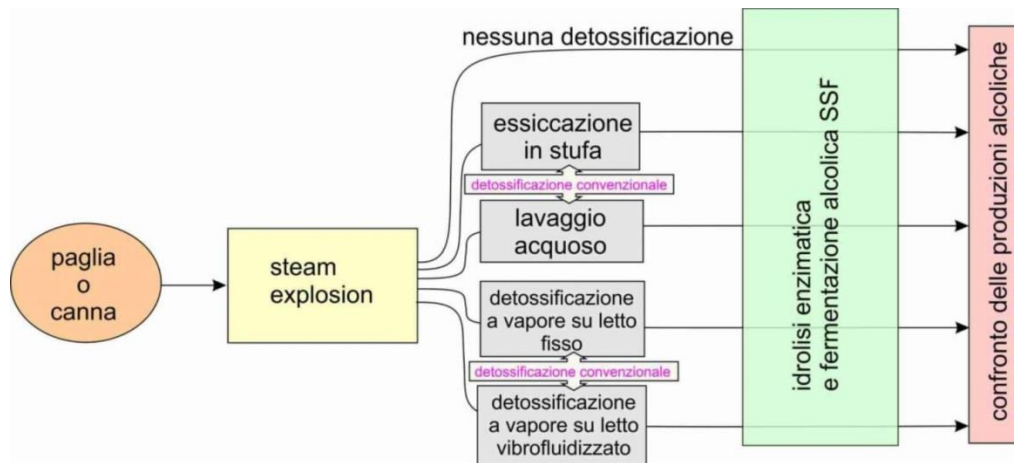
Gli inibitori sono stati analizzati mediante cromatografia HPLC (HP serie 1100, con detector diode-array e colonna Phenomenex 4u synergy RP-80). Il metodo prevede un flusso di 0,7 ml/min di eluente composto da acqua e acetonitrile con un gradiente a concentrazione crescente di acetonitrile (0-15 min, 3-10% ; 15-35 min, 10-30%; 35-60 min, 30-50%). La colonna lavora a una temperatura fissa di 30° C ed è stato utilizzato un mix di standard come riferimento con calibrazione tra 6 e 60 ppm.

## 2.9 IDROLISI E FERMENTAZIONE

La bioconversione del materiale esploso è stata condotta mediante idrolisi enzimatica per 24 h seguita da SSF per ulteriori 72 h. E' stato usato un cocktail commerciale di enzimi composto da Celluclast 1.5L (65 FPU/g and 17  $\beta$ -glucosidasi IU/g) e dalla  $\beta$ -glucosidasie Novozyme 188 (376  $\beta$ -glucosidasi IU/g), acquisito dalla Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark). Gli idrolizzati sono stati fermentati con il *Saccharomyces C.* (SIGMA II Type). L'idrolisi enzimatica è stata condotta con un rapporto solido liquido del 7.2% (w/v) utilizzando una soluzione contenente 3.5 g/l of Celluclast e 0.8 g/l Novozyme (contenuto proteico pari a 125 mg per g di enzima) e 0.05 M di tampone NaAc, per un volume totale di 40 ml, in bottiglie chiuse da 100ml. L'idrolisi è stata condotta a 45°C e pH 4.8, con agitazione mediante shaker a 150 rpm. Dopo 24 h la temperatura è stata portata a 35 °C e sono stati aggiunti il lievito e i nutrienti ottenendo un brodo con 3 g/l di *Saccharomyces*, 2.5 g/l di estratto di lievito, 0.25 g/l di  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.025g/l di  $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ . Le prove sono state condotte in doppio; al termine i brodi sono stati analizzati mediante cromatografia ionica (HPIC DIONEX, colonna Nucleogel OA40, eluente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, rilevatore RI) per la determinazione dell'etanolo prodotto. In tutte le prove è stata preventivamente aggiunta una punta di spatola di antibiotico (tetraciclina), al fine di evitare la produzione di acido lattico che avviene per contaminazione batterica.

## 3. RISULTATI

L'efficacia dei metodi di detossificazione è stata determinata eseguendo a valle le prove di bioconversione che consistono nell'idrolisi e fermentazione della cellulosa contenuta nel materiale detossificato. Per le prove su scala banco è stato dunque seguito lo schema rappresentato in figura 26. I risultati finali sono stati riportati in termini di etanolo prodotto per grammo di biomassa di partenza. Parallelamente è stata eseguita una prova senza detossificazione (controllo); questo per verificare che la quantità d'inibitori presenti nel materiale esploso era tale da inibire la fermentazione, rendendo così indispensabile il processo di detossificazione a valle della steam explosion. Di seguito sono dunque riportati i risultati delle caratterizzazioni e dell'efficacia della detossificazione.



**Figura 26:** prove comparative dei metodi di pretrattamento con detossificazione (confronto tra procedure convenzionali e impiego di reattori innovativi).

### 3.1 CARATTERIZZAZIONE DEI SUBSTRATI

La caratterizzazione dei substrati è ovviamente necessaria per acquisire i dati sul contenuto dei carboidrati di partenza e sulla perdita di massa dovuta al pretrattamento di steam explosion. Questi dati consentono di eseguire il bilancio di massa e la determinazione della resa etanolica.

I dati di caratterizzazione sono riportati in tabella 4 per la canna ed in tabella 5 per la paglia. Da notare come la detossificazione operata mediante lavaggio acquoso determina, in entrambi i casi, una diminuzione del contenuto di carboidrati nella fase solida, quest'ultima da sottoporre in seguito al processo di bioconversione. Dal bilancio di massa si evince che la produzione di esplosivo comporta una perdita di massa che va dal 10 al 16%. In questi valori percentuali sono comprese le sostanze volatili ottenute dalla degradazione termica del processo e che costituiscono per la maggior parte gli inibitori della fermentazione alcolica. Dopo il lavaggio acquoso, oltre il 20% della biomassa è solubilizzato; esso è rappresentato per il 7-10% da carboidrati in forma prevalentemente oligomerica. Occorre dunque tenere conto che la detossificazione mediante lavaggio acquoso, oltre a rimuovere gli inibitori, separa anche un contenuto sostanziale di carboidrati. La caratterizzazione dell'esplosivo secondo il metodo Klason porta ad avere un maggiore contenuto di lignina rispetto alla biomassa non trattata. Questo è dovuto al fatto che sull'esplosivo non si eseguono gli estrattivi, poiché il metodo di estrazione darebbe risultati falsati dalla parte solubile ottenuta in seguito al trattamento. Di conseguenza il residuo acido insolubile ottenuto mediante la procedura Klason è da intendersi come una "falsa lignina" contenente sia lignina, sia parte degli estrattivi divenuti insolubili.

**Tabella 4:** Composizione della canna, del prodotto esploso e delle correnti dopo lavaggio acquoso

<b>wt% su base secca</b>	<b>Canna</b>	<b>Esploso</b>	<b>Esploso insolubile in acqua</b>	<b>Esploso solubile in acqua</b>
glucano	37,6	35,6	33,2	2,4
galattano	0,7	0,4	0	0,4
xilano	19,7	12,1	5,7	6,4
arabinano	1,5	0,6	0,3	0,3
inorganici	4,9	4,9	2,2	2,5
lignina	26,6	29,9	25,4	3,09
estrattivi	6,0			
nd	3,1	6,3	0,5	5,8
totale secco	100	89,8	67,2	22,6
acqua	61,3	144	164	995

**Tabella 5:** Composizione della paglia, del prodotto esploso e delle correnti dopo lavaggio acquoso

<b>wt% su base secca</b>	<b>Paglia</b>	<b>Esploso</b>	<b>Esploso insolubile in acqua</b>	<b>Esploso solubile in acqua</b>
glucano	38,0	34,2	32,6	1,6
galattano	0,7	0	0	0
xilano	19,4	7,1	2,2	4,9
arabinano	2,3	0,2	0	0,2
inorganici	6,9	6,9	2,9	4,0
lignina	22,0	30,4	21,6	8,8
estrattivi	8			
nd	2,7	5,5	1,4	4,1
totale secco	100	84,3	60,7	23,6
acqua	13,6	101	250	665

### 3.2 ANALISI DEGLI INIBITORI NEGLI ESPLOSI

La determinazione degli inibitori è stata eseguita sui materiali esplosi quantificando le sostanze identificate in letteratura come potenziali inibitori della fermentazione alcolica. Mediante lavaggio acquoso del substrato e iniezione delle acque di lavaggio in HPLC, sono state determinate le seguenti sostanze: acido acetico, acido formico, 2-furfurale, 5-idrossimetilfurfurale, catecolo, 4-idrossibenzaldeide, siringaldeide. In tabella 6 sono riportati i valori determinati.

**Tabella 6:** Analisi degli inibitori nel materiale esploso

<b>wt % rispetto all'esploso</b>	<b>Esploso di canna</b>	<b>Esploso di paglia</b>
Acido acetico	2,35	2,44
Acido formico	0,3	0,01
2-furfurale	0,16	0,26
5-idrossimetilfurfurale	0,24	0,14
catecolo	tracce	0,01
4-idrossibenzaldeide	0,01	tracce
siringaldeide	tracce	tracce

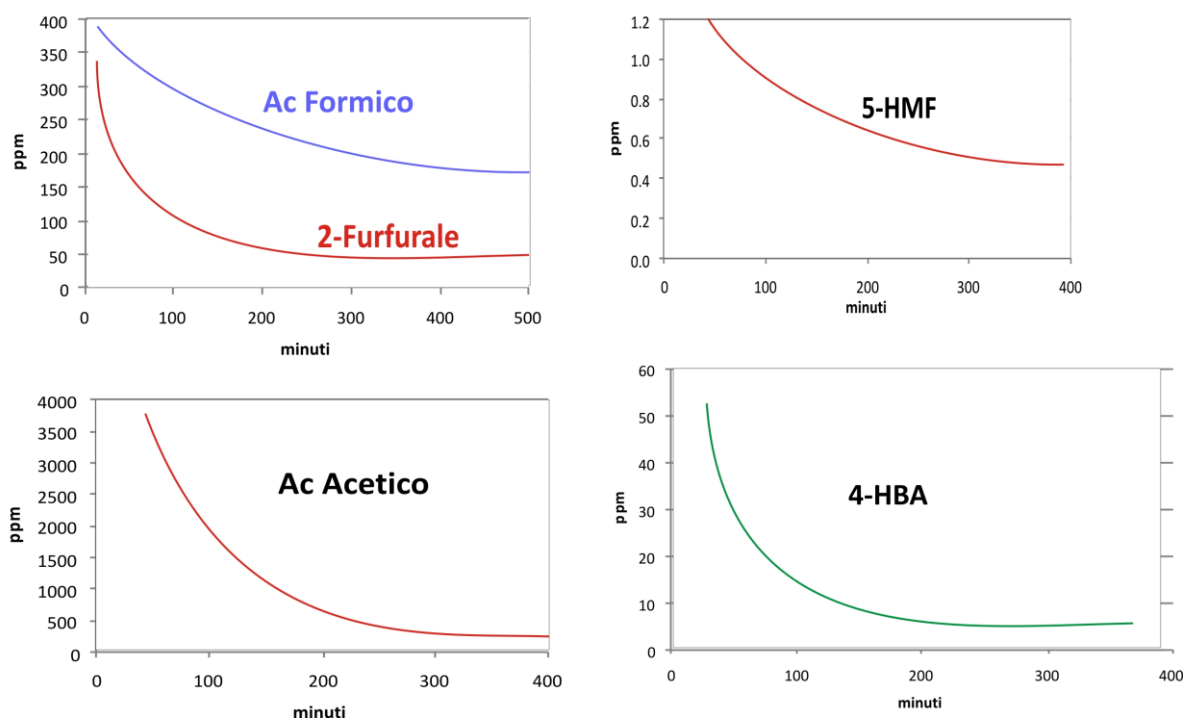
### **3.3 RIMOZIONE DEGLI INIBITORI MEDIANTE ESSICCAZIONE E MEDIANTE LAVAGGIO ACQUOSO (METODI CONVENZIONALI)**

Le analisi condotte sia sull'esploso essiccato sia sull'esploso lavato con acqua hanno evidenziato l'assenza delle sostanze riportate in tabella 6. Ne consegue che gli inibitori sono sia solubili sia volatili, anche se, poiché molti hanno un punto di ebollizione superiore a quello dell'acqua (acido acetico 117 °C, 2-furfurale 162 °C, 5-idrossibenzaldeide 115 °C), per ottenere una buona detossificazione occorre essiccare la biomassa fino a ottenere un DM superiore al 99%. Questo provoca il noto fenomeno dell'*hornification* della fibra, con la conseguenza di aumentare la refrattarietà all'idrolisi enzimatica. Nel caso specifico del lavaggio acquoso, condotto immergendo il materiale esploso in acqua calda a 65 °C (S/L = 0.2), e sottoponendo ad agitazione la sospensione, è stato determinato che per avere una rimozione completa occorra attendere almeno 10 minuti prima della filtrazione.

### **3.4 RIMOZIONE DEGLI INIBITORI CON FLUSSO DI VAPORE IN REATTORE A LETTO FISSO (1° METODO INNOVATIVO)**

Il metodo adottato è praticamente quello descritto e rappresentato nello schema di figura 3. La prova è stata condotta con esploso di paglia per oltre 6 ore, durante la quale la verifica dell'eliminazione degli inibitori è stata eseguita mediante il prelievo nel tempo di campioni di condensato all'uscita del reattore verticale. La figura 27 riporta la diminuzione della

concentrazione di inibitori nei campioni di condensato prelevati durante il corso della prova. Quando le gocce di condensato hanno raggiunto il limite inferiore di concentrazione d'inibitori (plateau), il sistema ha raggiunto il limite di efficienza. Dall'analisi degli andamenti di figura 28 questo accade dopo circa 6 ore.



**Figura 28:** Concentrazione degli inibitori nei condensati durante il corso della prova di detossificazione con vapore su letto fisso (vedi schema di figura 3).

La soluzione condensata a fine prova, durata 390 minuti, è stata recuperata in quantità pari a 389.8 g; ne consegue un flusso di condensato pari a circa 1 g/min. La tabella 7 riporta le caratteristiche della soluzione finale in termini di contenuto degli inibitori esaminati.

**Tabella 7:** Analisi del condensato totale\*

	Ac. Formico	Ac. Acetico	2-Fur	4-HBA	5-HMF
Concentrazione (ppm)	284	1621	119	11	0.7
Quantità estratta (g)	0.11	0.63	0.05	0.004	0.0003
Rispetto all'esplosivo secco (%)	0.3	1.8	0.1	0.01	0.001

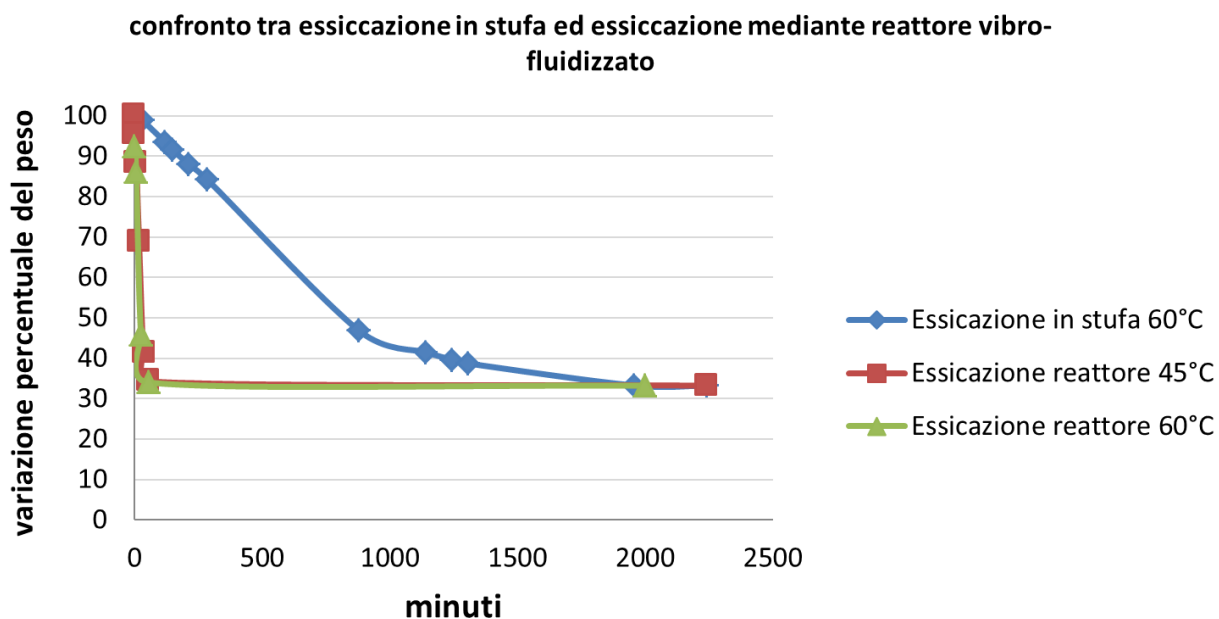
\*389.8 g di condensato ottenuto detossificando 32 g di substrato secco

A fine prova è stata verificata la presenza degli inibitori sul materiale solido sottoposto a detossificazione: nessuna delle sostanze di cui sopra è stata rilevata, confermando la completa rimozione delle stesse. A fine processo quindi il materiale è stato sottoposto a idrolisi e fermentazione simultanea per verificare l'avvenuta detossificazione tramite la rilevazione della produzione alcolica. La rimozione delle sostanze volatili non è, infatti, una condizione sufficiente per detossificare il materiale esplosivo; altre sostanze, quali ad esempio frammenti di lignina o materiale degradato non volatile, possono essere causa di inibizione della fermentazione alcolica. Occorre dunque una verifica diretta dell'efficienza del processo di detossificazione tramite le prove di bioconversione a valle. I risultati delle prove di bioconversione sono riportati in seguito.

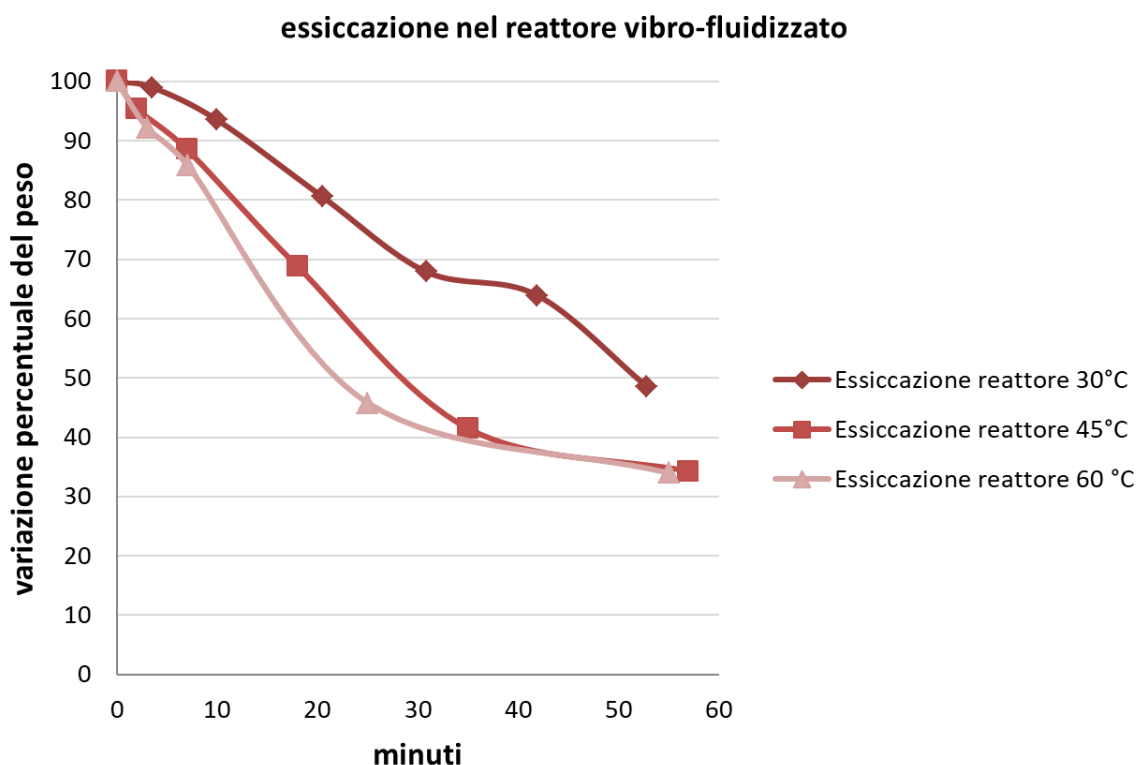
### **3.5 RIMOZIONE DEGLI INIBITORI CON ARIA E VAPORE IN REATTORE VIBRO-FLUIDIZZATO (2° METODO INNOVATIVO)**

Il reattore vibro-fluidizzato è stato assemblato su scala banco come mostrato in figura 12. Come prima prova è stata eseguita un'essiccazione del campione, in altre parole è stata flussata solo aria calda, per la verifica dei tempi di essiccazione rispetto al metodo classico in stufa. Com'è possibile osservare dai grafici di figura 29, i tempi di essiccazione della biomassa esplosiva sono estremamente più rapidi se si impiega il reattore a letto vibro-fluidizzato. Le prove sono state condotte su circa 100 g di esplosivo umido al 67 %, cosicché, a completa essiccazione, il peso finale è 33 g, come riportato nei grafici. In figura 30 è riportato il dettaglio della prima fase di essiccazione dove si nota che, operando con un flusso di aria calda a 45 °C o a 60 °C, i tempi per una completa essiccazione sono ridotti a poco meno di un'ora.

Durante l'essiccazione mediante l'impiego del reattore a letto vibro-fluidizzato, è stato notato che l'esplosivo si suddivideva in 2 forme a differente intervallo granulometrico: una parte dell'esplosivo, molto fine e polverulenta, viene infatti trascinata con il flusso di aria calda ed è raccogliabile in un ciclone di abbattimento polveri (nel caso specifico essa costituisce circa 1/3 del peso dell'esplosivo secco, ma la quantità varia a seconda della tipologia dell'esplosivo e della severità con cui è stato prodotto); l'altra parte, a grossa granulometria, rimane nel reattore ed è composta da particelle di esplosivo con granuli da 1 a 5 mm (figura 31).



**Figura 29:** Confronto tra i tempi di essiccazione del materiale esplosivo in stufa (utilizzando un becher da 500 cc e riempito con 100 g di esplosivo) e mediante il reattore a letto vibro-fluidizzato, cilindro con sezione da 4 cm, riempito sempre con 100 g di esplosivo.



**Figura 30:** Cinetica di essiccazione del materiale esplosivo mediante il reattore a letto vibro-fluidizzato: confronto dell'impiego di flussi d'aria a differente temperatura.

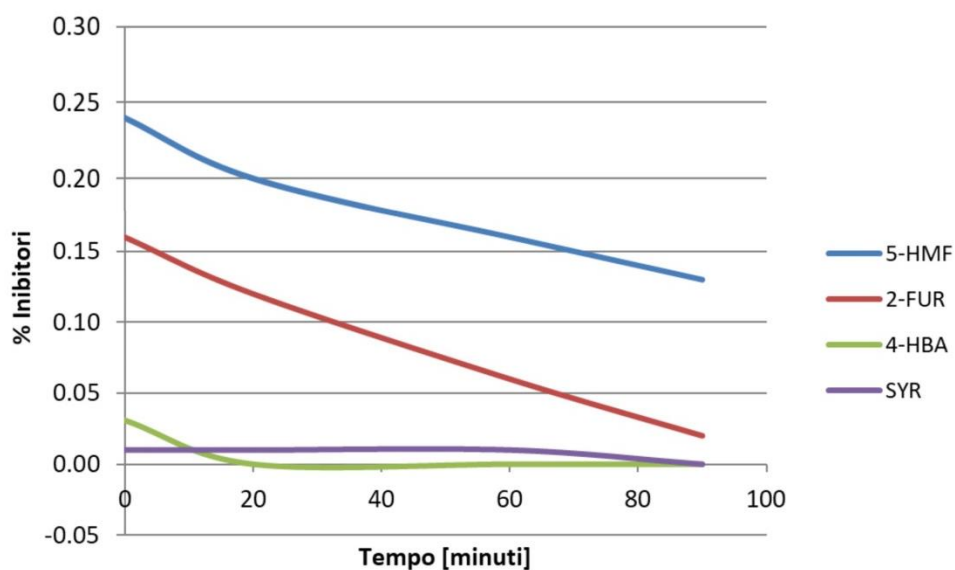




**Figura 31:** Residuo dell'esplosivo secco a fine essiccazione con reattore a letto vibro-fluidizzato.

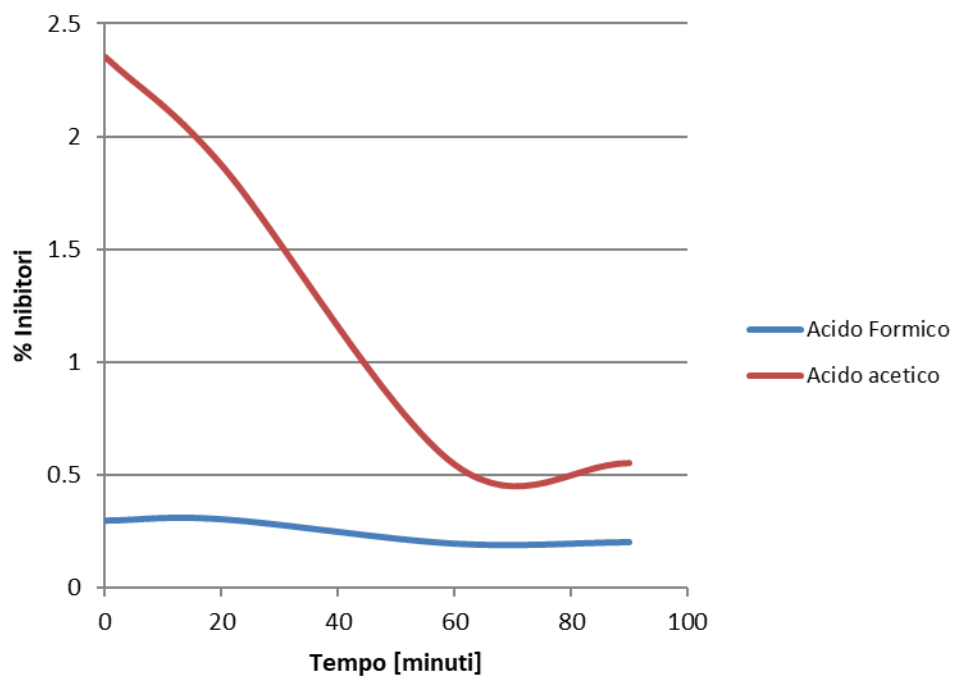
Sebbene i tempi per una completa essiccazione siano rapidi e, sebbene anche questo procedimento porti a una detossificazione completa, il materiale prodotto subisce il fenomeno dell'*hornification*. Per evitare ciò, il materiale esplosivo è stato sottoposto a un flusso di aria e vapore, quest'ultimo necessario a mantenere sempre umida la biomassa durante il corso dell'allontanamento degli inibitori. In questa specifica prova il consumo di acqua vaporizzata a 60 °C (per mantenere umida la biomassa) è stato ridotto a 4,5 g per g di biomassa secca, contro circa i 12 g vapore per g di biomassa secca nel caso del sistema di detossificazione a letto fisso. Durante l'esercizio della prova di detossificazione, durata in tutto un'ora e mezza, pochi grammi di campione esplosivo sono stati prelevati a intervalli regolari di tempo e su di essi è stata eseguita l'analisi degli inibitori residui. La diminuzione degli inibitori durante il trattamento di detossificazione con il reattore a letto vibro-fluidizzato è riportata nelle figure 32 e 33. Dopo i 90 minuti di trattamento, l'esplosivo è stato prelevato e sottoposto ai successivi test di bioconversione. Grazie al flusso di vapore, l'esplosivo ha conservato un livello di umidità superiore al 50%, evitando i fenomeni dell'*hornification*. I risultati sui test di produzione alcolica sono riportati nel paragrafo successivo.

### inibitori residui nell'esplosivo trattato (arundo)



**Figura 32:** Riduzione degli inibitori durante il trattamento di detossificazione mediante l'impiego del reattore a letto vibro-fluidizzato e con flusso aria/vapore. Rispettivamente: 5-idrossimetilfurfurale, 2-furaldeide, 4-idrossibenzaldeide e siringaldeide.

### acidi residui nell'esplosivo trattato (arundo)



**Figura 33:** Riduzione degli inibitori acidi durante il trattamento di detossificazione mediante l'impiego del reattore a letto vibro-fluidizzato e con flusso aria/vapore.

### 3.6 IDROLISI E FERMENTAZIONE DOPO I TRATTAMENTI DI DETOSSIFICAZIONE: CONFRONTO DEI METODI SCALA BANCO.

Tutti i prodotti detossificati, mediante i metodi convenzionali (essiccazione e lavaggio) e mediante i metodi innovativi (flusso di vapore con reattore a letto fisso e flusso aria/vapore con reattore a letto vibro-fluidizzato), sono stati sottoposti ad idrolisi e fermentazione. La prova è necessaria, poiché la rimozione di tali sostanze non implica necessariamente una completa detossificazione. Infatti, è nota la presenza nell'esplosivo di molecole poco volatili (essenzialmente frammenti di lignina) che non sono rimosse alle condizioni sperimentali provate, e che sono potenzialmente inibitrici della bioconversione.

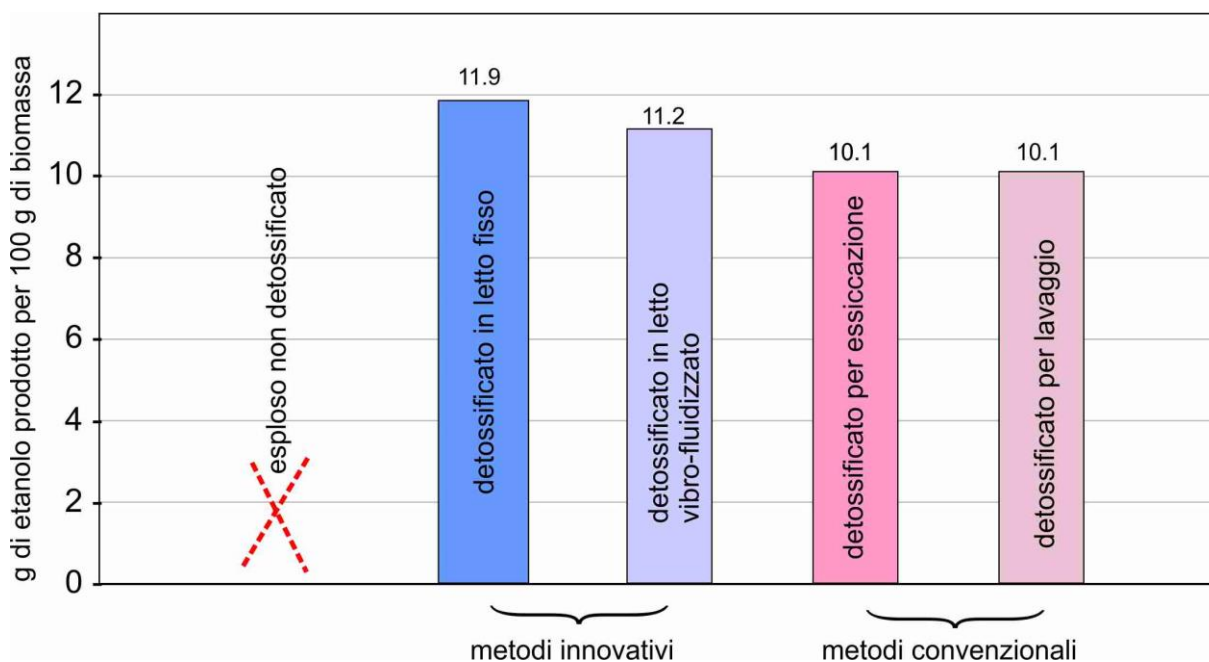
In parallelo sono state condotte 5 prove di confronto, sottoponendo a test di idrolisi e fermentazione i seguenti substrati (come da figura 26):

- 1) Esplosivo non detossificato;
- 2) Esplosivo detossificato in letto fisso (flusso di vapore);
- 3) Esplosivo detossificato in letto vibro-fluidizzato (flusso aria/vapore).
- 4) Esplosivo preventivamente seccato in stufa a 60 °C per ca 48 ore;
- 5) Esplosivo sottoposto a lavaggio acquoso con acqua a 60 °C.

I risultati della produzione di etanolo dai 5 substrati sono riportati in figura 34. Dall'esame dei risultati è possibile svolgere le seguenti considerazioni:

- Il materiale sottoposto a steam explosion deve essere necessariamente detossificato, infatti, impiegandolo tal quale non si ottiene etanolo.
- La quantità di etanolo ottenibile rispetto alla biomassa di partenza è significativamente maggiore nel caso dell'impiego di materiale detossificato con i metodi innovativi sviluppati in questo lavoro.

Nel caso della detossificazione per essiccazione, la diminuzione di produttività alcolica è dovuta alla diminuzione della resa enzimatica per effetto della *hornification*. Nel caso della detossificazione mediante lavaggio, la minore produttività è dovuta alla rimozione di carboidrati solubili che altrimenti sarebbero stati convertiti in alcool nel processo di bioconversione. Entrambi questi inconvenienti sono stati superati adoperando i metodi di detossificazione con flusso di vapore in letto fisso e con flusso aria/vapore in letto vibro-fluidizzato.



**Figura 34:** Produzione di etanolo a partire da materiale non detossificato e confronto tra i differenti metodi di detossificazione.

L'impiego del sistema di detossificazione che utilizza il letto fluidizzato permette di diminuire i tempi di trattamento del materiale esplosivo, ottenendo un prodotto detossificato in meno di un'ora di trattamento. La quantità di etanolo producibile mediante questo sistema è di poco inferiore a quella ottenuta con il letto fisso.

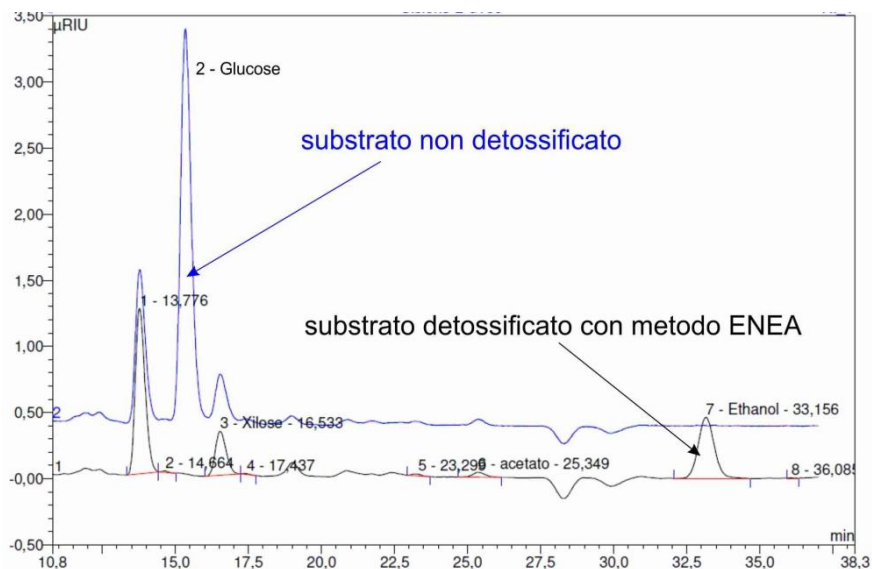
Nel caso del reattore vibro-fluidizzato, che impiega un flusso di aria umidificata a 60 °C, è stato stimato che, con impianti di taglia elevata (5 ton/h), il consumo energetico totale (dovuto al contenuto energetico dell'aria calda e all'energia meccanica per la vibrazione) corrisponderebbe al 5-10% del contenuto energetico della biomassa.

### 3.7 RISULTATI SUL SISTEMA DI DETOSSIFICAZIONE SCALA PILOTA

#### 3.7.1 Detossificazione con aria calda e prove comparative di bioconversione

Le prove di detossificazione sono state realizzate in questo caso utilizzando il dispositivo senza modifiche, senza cioè umidificare con vapore la corrente di aria calda. La paglia esplosiva è stata essiccata fino a produrre 2 tipologie di materiale secco: uno avente un DM del 90% e l'altro un DM del 97%. Per produrre il campione più secco (DM 97 %) è stato necessario un doppio passaggio del substrato, raddoppiando in pratica la durata del

trattamento (da 30 a 60 minuti). In entrambi i casi, il materiale si presentava secco e granulare, poiché la componente più fine (dall'aspetto polverulento) veniva trascinata dalla corrente d'aria e abbattuta dal ciclone. La temperatura del flusso d'aria calda è stata impostata in modo da ottenere 60-70 °C nel campione fluidizzato. Il flusso d'aria è stato regolato agendo sulle valvole del letto fluido, seguendo visivamente la corretta fluidizzazione del materiale. Il materiale aspirato dal ciclone è stato circa 1/3, come quantitativo in peso, rispetto al materiale trattato complessivamente e si presentava come polvere fine molto secca. Nelle prove comparative di bioconversione, soltanto il campione con DM del 97%, cioè il più secco (nel quale è stato riscontrato l'abbattimento degli inibitori di circa 15 volte), è stato convertito in bioetanolo (figura 35); il campione con DM del 90%, dove il contenuto di inibitori è stato solo dimezzato, non ha prodotto etanolo; ciò indica chiaramente che occorre un'essiccazione spinta per ottenere una detossificazione sufficiente. Tuttavia l'essiccazione spinta comporta la *hornification* delle fibre che riduce l'efficienza di idrolisi. Dai dati si evince, infatti, che, nel caso del campione essiccato, il glucosio è stato completamente consumato e trasformato in etanolo, ma la quantità di quest'ultimo è stata inferiore rispetto a quello derivabile per teorica conversione del glucosio ottenuto dal materiale non detossificato. L'efficienza di bioconversione è stata del 75%, inferiore di quella ottenuta in altri casi (fino al 90%). Per questo motivo si è deciso di allontanare gli inibitori mediante essiccatoio vibrante con corrente di aria umida.



**Figura 35:** Cromatogrammi HPIC relativi ai test comparativi di bioconversione (etanolo da lignocellulosici): confronto tra substrato esplosivo tal quale (blu) e lo stesso substrato (nero) sottoposto a detossificazione mediante essiccatoio vibrante fino a quasi completa essiccazione (DM 97%).

### 3.7.2 Detossificazione con aria calda umidificata e prove comparative di bioconversione

Le prove di detossificazione sono state realizzate con il dispositivo assemblato e modificato con l'introduzione della linea del vapore. Trattandosi di un metodo innovativo è stata predisposta una serie di esperimenti per ottimizzare i parametri di trattamento rispetto al substrato esploso prodotto dall'impianto ENEA. I parametri che sono stati variati per ottenere la migliore detossificazione sono stati la durata del trattamento e l'umidità relativa della corrente di aria calda.

Lo studio di queste variabili è stato eseguito mediante un disegno sperimentale (DOE) che ha previsto 10 esperimenti alle differenti condizioni già riportate in tabella 3. Mentre il tempo di trattamento è stato un parametro facilmente controllabile, il controllo dell'umidità della corrente di aria calda è stato più elaborato, poiché la sonda di umidità era situata a valle del prodotto trattato, mentre l'iniettore di vapore (umidificatore) si trovava a monte della linea del flusso di aria.

Questo sistema ha generato ritardi nell'apertura e chiusura delle valvole del controllo vapore, con la conseguenza di ottenere valori oscillanti rispetto a quelli impostati. La temperatura di trattamento rilevata nel letto fluidizzato è stata regolata tra i 60 e gli 80 °C. Anche questo valore non è stato stabile poiché molto sensibile alla velocità del flusso e all'umidità della corrente dell'aria calda.

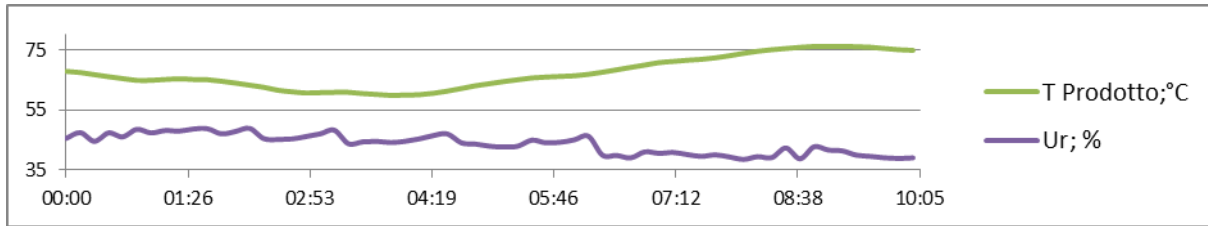
La velocità del flusso è stata regolata manualmente in modo da ottenere in ogni prova la corretta fluidizzazione del prodotto e, sotto la griglia del letto fluido, è stata generalmente registrata una pressione relativa di 4-5 mBar.

La temperatura e l'umidità relativa del flusso di aria calda sono state registrate mediante un acquisitore elettronico di dati e nei grafici a seguire sono riportati per ogni prova i loro valori durante il corso del trattamento.

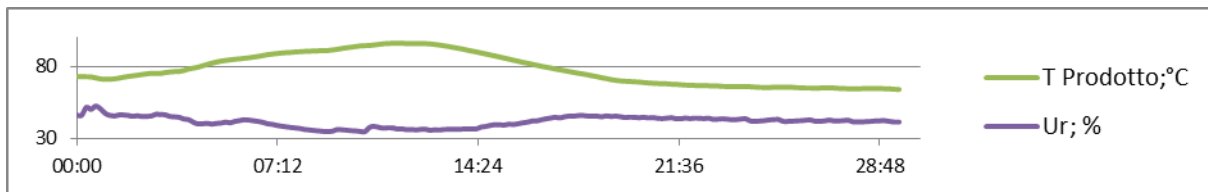
Dai grafici è possibile osservare l'andamento dei valori di umidità relativa ( $U_r$ ) e temperatura durante il corso della prova; tali valori non sono quasi mai costanti, tuttavia il valore medio dell'umidità (riportato in didascalia) si avvicina abbastanza ai valori impostati in tabella 3, così da considerare al momento trascurabili gli effetti delle variazioni (discorso analogo per le temperature, già ottimizzate su scala banco e mantenute tra i 60 e gli 80 °C). Le prove n. 5 e 6 sono state eseguite alle stesse condizioni sperimentali poiché costituiscono i *center points* del disegno sperimentale.

Di seguito sono riportati i grafici costruiti dai dati sperimentali delle prove.

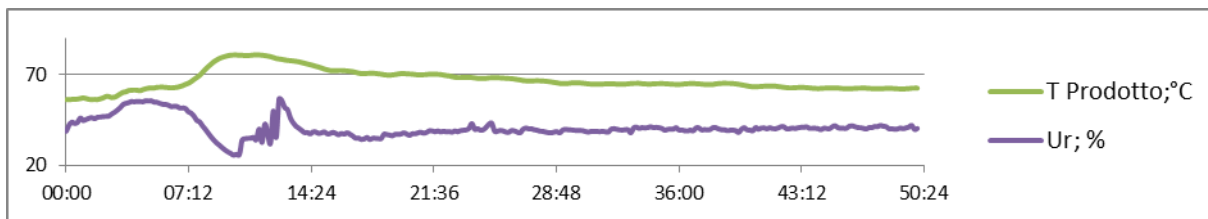
**Prova n. 1:** (Ur 40%, t 10 min). medie e dev. stand.: Ur 44+/-3, T 67+/-5



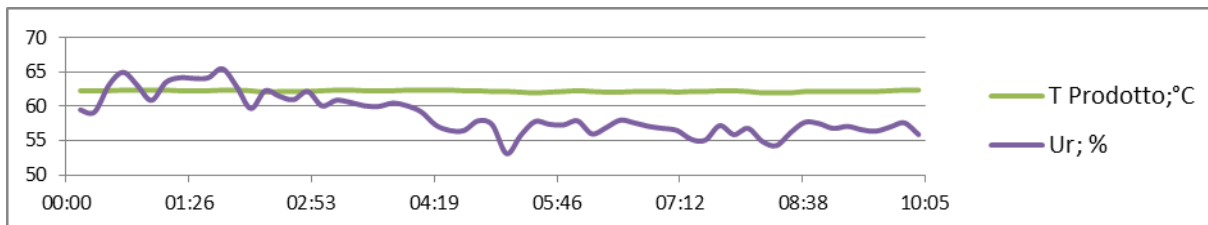
**Prova n. 2:** (Ur 40%, t 30 min). medie e dev. stand.: Ur 42+/-4, T 78+/-11



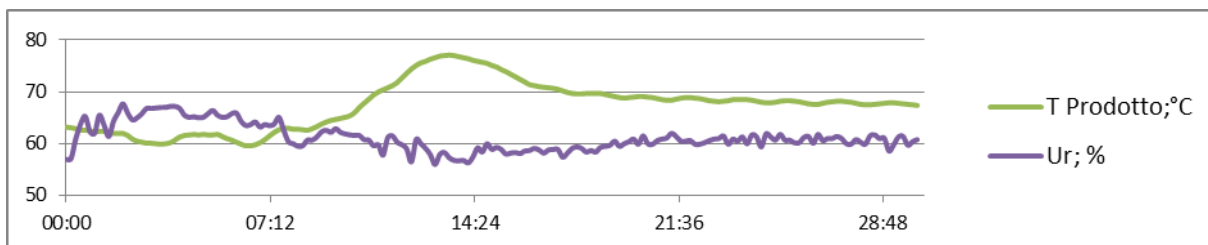
**Prova n. 3:** (Ur 40%, t 50 min). medie e dev. stand.: Ur 41+/-5, T 67+/-6



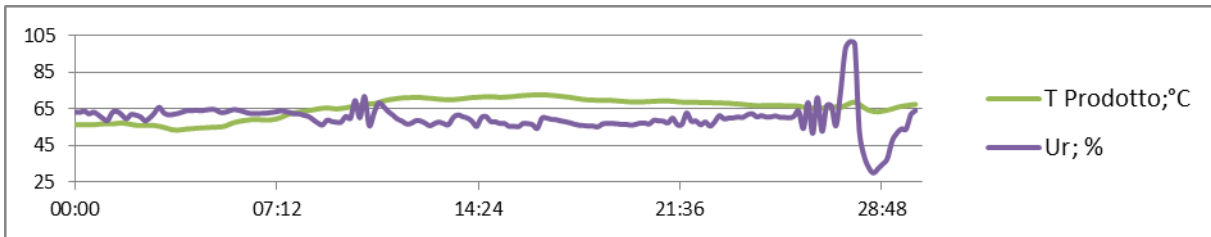
**Prova n. 4:** (Ur 60%, t 10 min). medie e dev. stand.: Ur 59+/-3, T 62,3+/-0,1



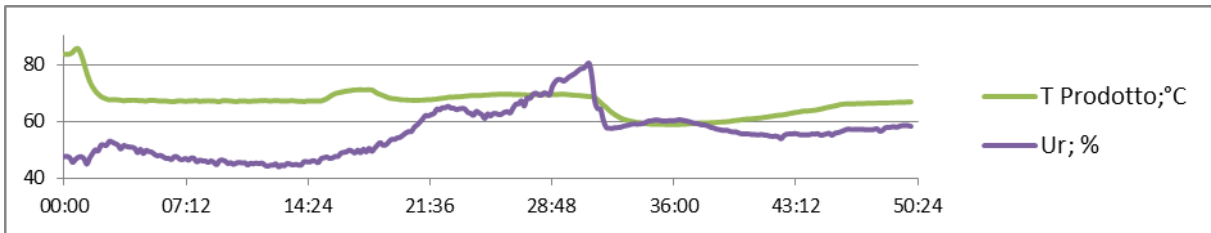
**Prova n. 5:** (Ur 60%, t 30 min). medie e dev. stand.: Ur 61+/-3, T 67+/-5



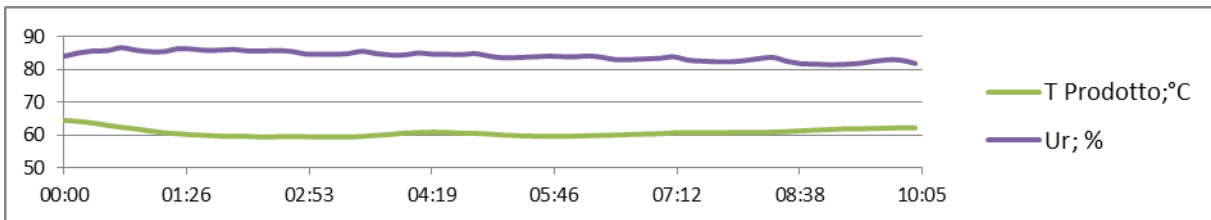
**Prova n. 6:** (Ur 60%, t 30 min). medie e dev. stand.: Ur 60+/-8, T 65+/-6



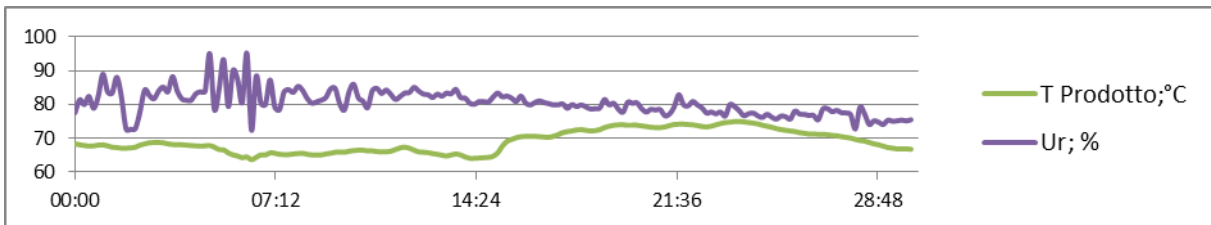
**Prova n. 7:** (Ur 60%, t 50 min). medie e dev. stand.: Ur 56+/-8, T 67+/-5



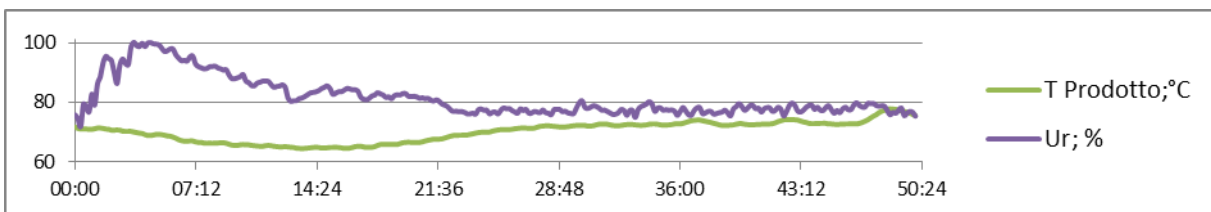
**Prova n. 8:** (Ur 80%, t 10 min). medie e dev. stand.: Ur 84+/-1, T 61+/-1



**Prova n. 9:** (Ur 80%, t 30 min). medie e dev. stand.: Ur 81+/-4, T 69+/-3



**Prova n. 10:** (Ur 80%, t 50 min). medie e dev. stand.: Ur 82+/-6, T 70+/-3



Dopo i vari trattamenti alle condizioni del disegno sperimentale (tabella 3), i campioni di esplosivo trattato sono stati raccolti e caratterizzati. I dati di caratterizzazione sono stati

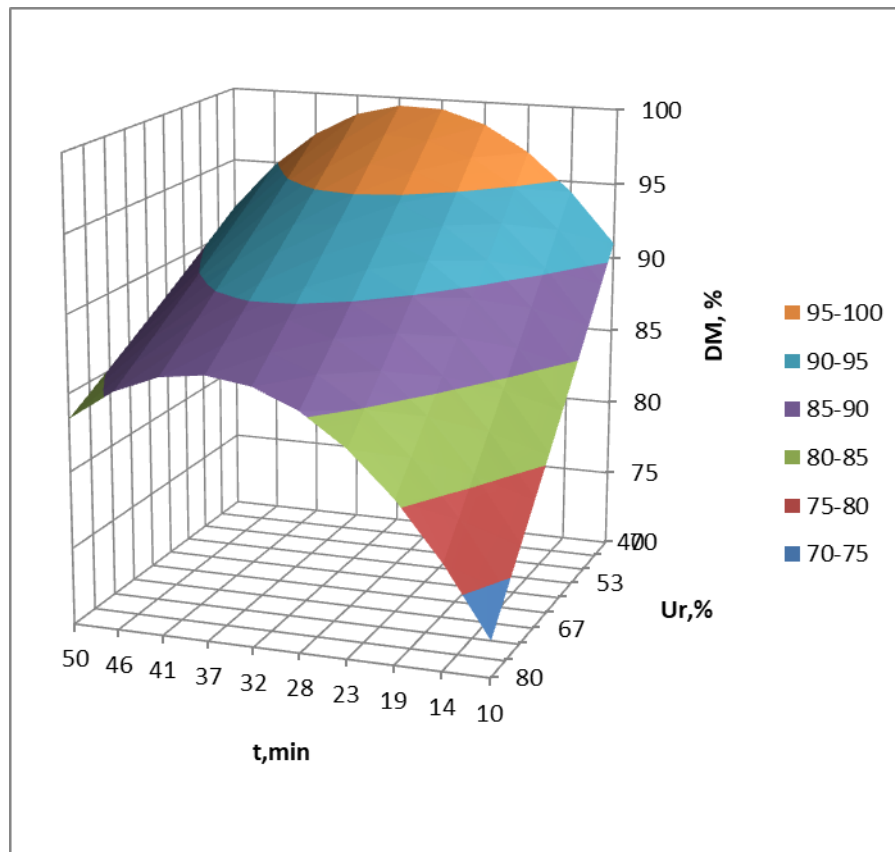


utilizzati per l'analisi funzionale in modo da individuare le migliori condizioni sperimentali. Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi funzionale per le differenti risposte esaminate.

### **Analisi del Dry Matter**

La prima risposta analizzata è stata il contenuto di umidità, ossia il *Dry Matter* dell'esploso a fine trattamento. L'analisi del disegno sperimentale ha permesso di ottenere una funzione in due variabili (figura 36).

Il grado di correlazione è abbastanza buono ( $R^2 = 0,895$ ). Per l'ottenimento di un substrato più umido (DM 72,3%), occorrono Ur 80% e t 10 min. Con una corrente di aria calda poco umidificata e tempi intermedi di trattamento, il prodotto ottenuto è relativamente secco e ciò è poco gradito per l'accentuarsi del fenomeno *hornification*.



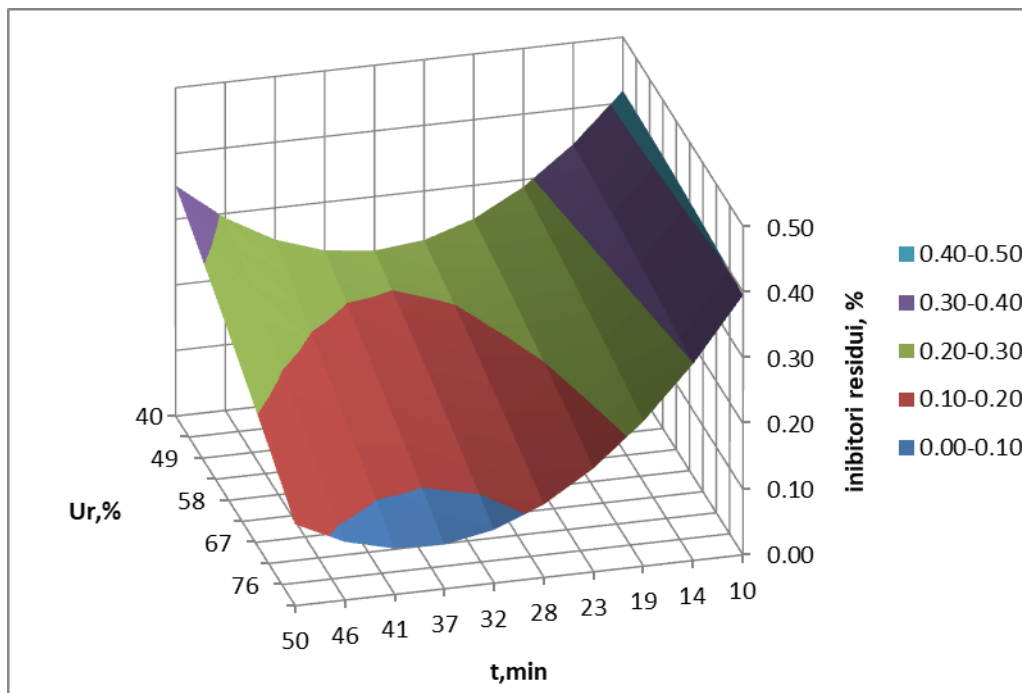
**Figura 36:** Andamento previsto del Dry Matter in funzione di tempo di trattamento (t) e umidità dell'aria (Ur).

### **Analisi degli inibitori residui totali**

Il secondo parametro investigato è il contenuto d'inibitori residui nel substrato trattato. Un'aliquota di ogni campione trattato alle condizioni di tabella 3 è stata sottoposta a lavaggio 48

acquoso per la determinazione del contenuto percentuale di inibitori residui. L'andamento di questi nei substrati detossificati, inteso come somma totale di quelli rilevati, è osservabile nel grafico di figura 37. Il grado di correlazione è ottimo ( $R^2 = 0.978$ ) ed il valore minimo di inibitori, pari a 0,066 %, è ottenibile a Ur 80% e 38 minuti di trattamento. A queste condizioni la concentrazione di alcuni inibitori volatili nel substrato è ridotta a fino a 1/50 del contenuto iniziale.

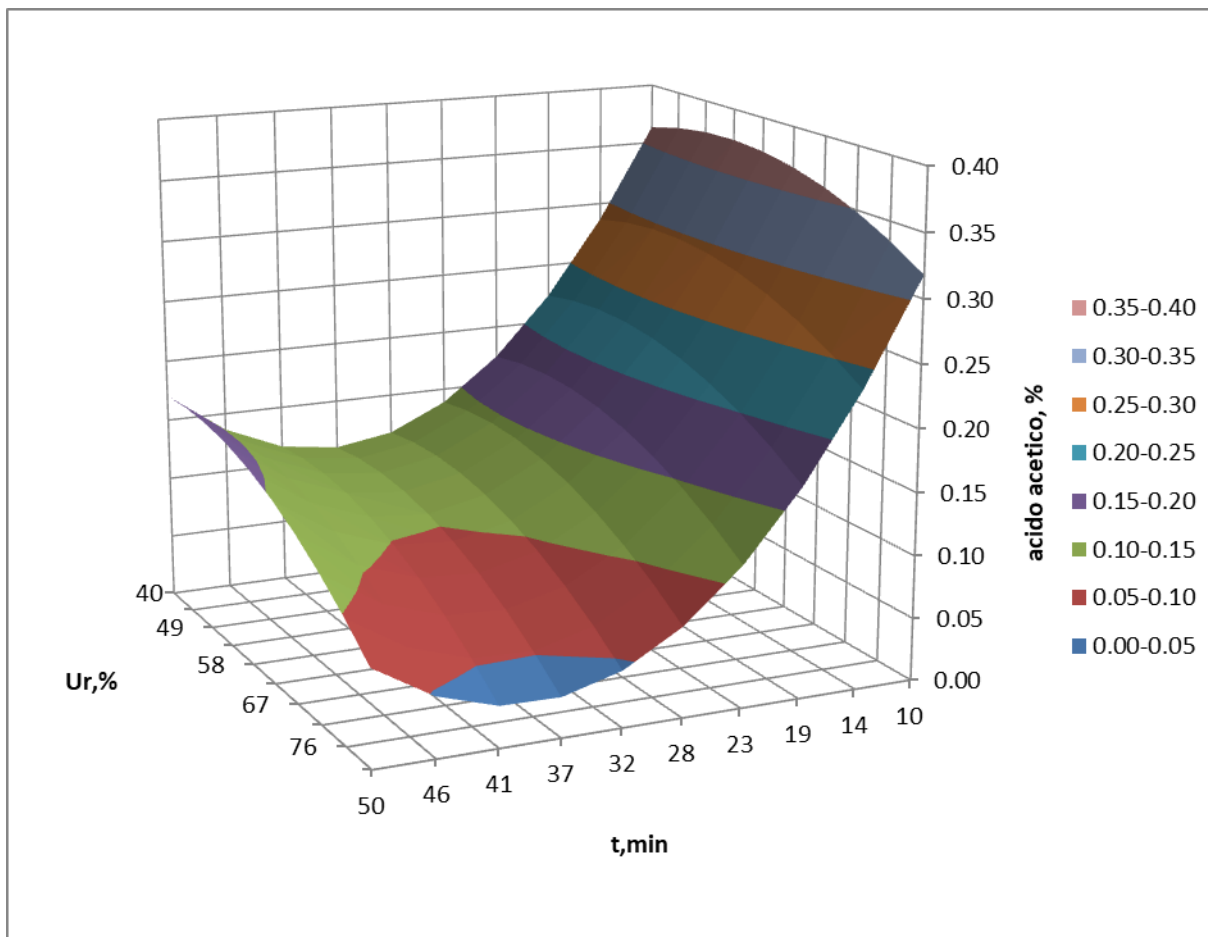
Per i trattamenti di 10 minuti il contenuto residuo di inibitori si mantiene intorno al valore di 0,4, corrispondente ad una riduzione a circa 1/9 del contenuto di inibitori iniziale. Tale riduzione non è stata sufficiente a detossificare il substrato poiché le prove di conversione eseguite sui campioni trattati per 10 minuti non hanno prodotto etanolo, probabilmente a causa dell'azione sinergica di sostanze altobollenti (fenoli da frammenti di lignina) non allontanabili con il metodo proposto. Generalmente il contenuto d'inibitori diminuisce con l'aumento dell'umidità della corrente di aria calda e ciò può essere spiegato dall'effetto di trascinamento per affinità degli inibitori alle molecole di acqua. Poco chiaro è invece l'incremento degli inibitori residui a tempi di trattamento prolungati. Possibili spiegazioni dell'andamento possono essere: 1) Tempi prolungati di trattamento potrebbero portare alla formazione di nuovi inibitori . 2) Tempi prolungati fanno sì che più particelle fini siano aspirate nel ciclone; queste, avendo un maggior rapporto superficie/volume, sono quelle maggiormente detossificate, lasciando nel letto le particelle più cariche d'inibitori. A proposito di quest'ultima spiegazione occorre ricordare che a tempi di trattamento prolungati il materiale aspirato (polveri fini) può arrivare anche al 30 % in peso, mentre si assesta sul 15 % a tempi intermedi (30 minuti).



**Figura 37:** Inibitori totali residui nell'esplosivo trattato, acido acetico + 2-furfurale + 5-HMF (% rispetto al secco).

### **Acido acetico residuo**

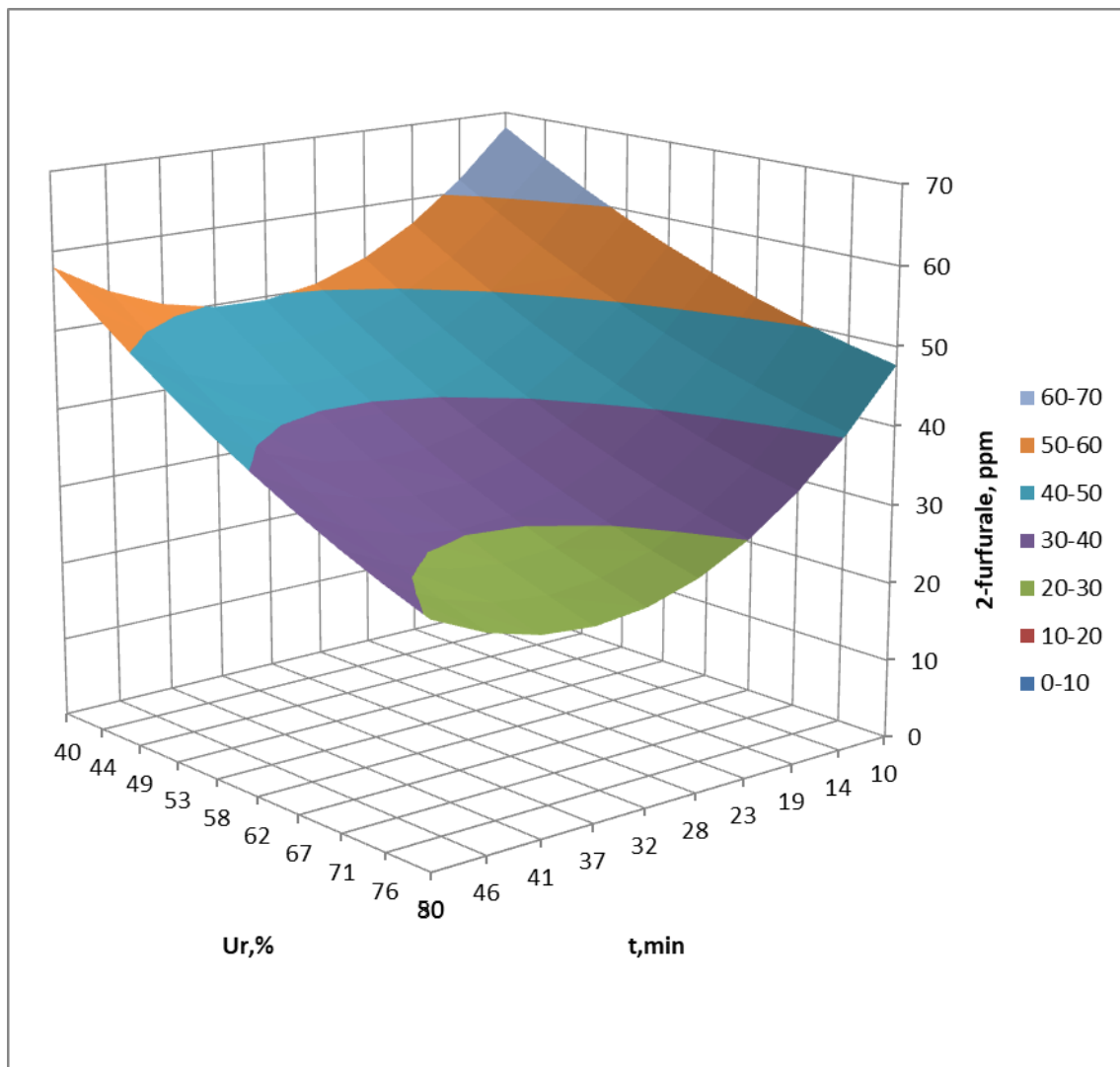
A scopo di approfondimento, è stato studiato l'andamento dei singoli inibitori residui in funzione dei parametri esaminati. Gli inibitori rilevati nel substrato trattato sono in prevalenza acido acetico, furfurale e idrossimetilfurfurale. L'acido formico e gli altri inibitori (alcool furfurilico, siringaldeide e benzaldeide) sono stati assenti o presenti in tracce, quindi trascurati. Riguardo all'acido acetico, il contenuto residuo nel substrato trattato riflette quanto riportato per lo studio degli inibitori totali e il suo andamento in funzione dei parametri di trattamento è riportato in figura 38. Il valore minimo previsto è 0,03 % a 80% Ur e 39 minuti, molto vicino a quello individuato per gli inibitori totali. Anche in questo caso il grado di correlazione  $R^2$  è ottimo: 0,986. L'allontanamento dell'acido acetico sembra dipendere poco dal valore dell'umidità della corrente di aria calda, poiché la pendenza della superficie lungo l'asse Ur è lieve. Sembra invece dipendere molto dal tempo di trattamento soprattutto nell'intervallo 10-30 minuti. È stato quindi deciso di eseguire un trattamento di almeno 30 minuti per assicurarsi una rimozione efficiente dell'acido acetico.



**Figura 38:** Acido acetico residuo nella biomassa dopo il trattamento di detossificazione

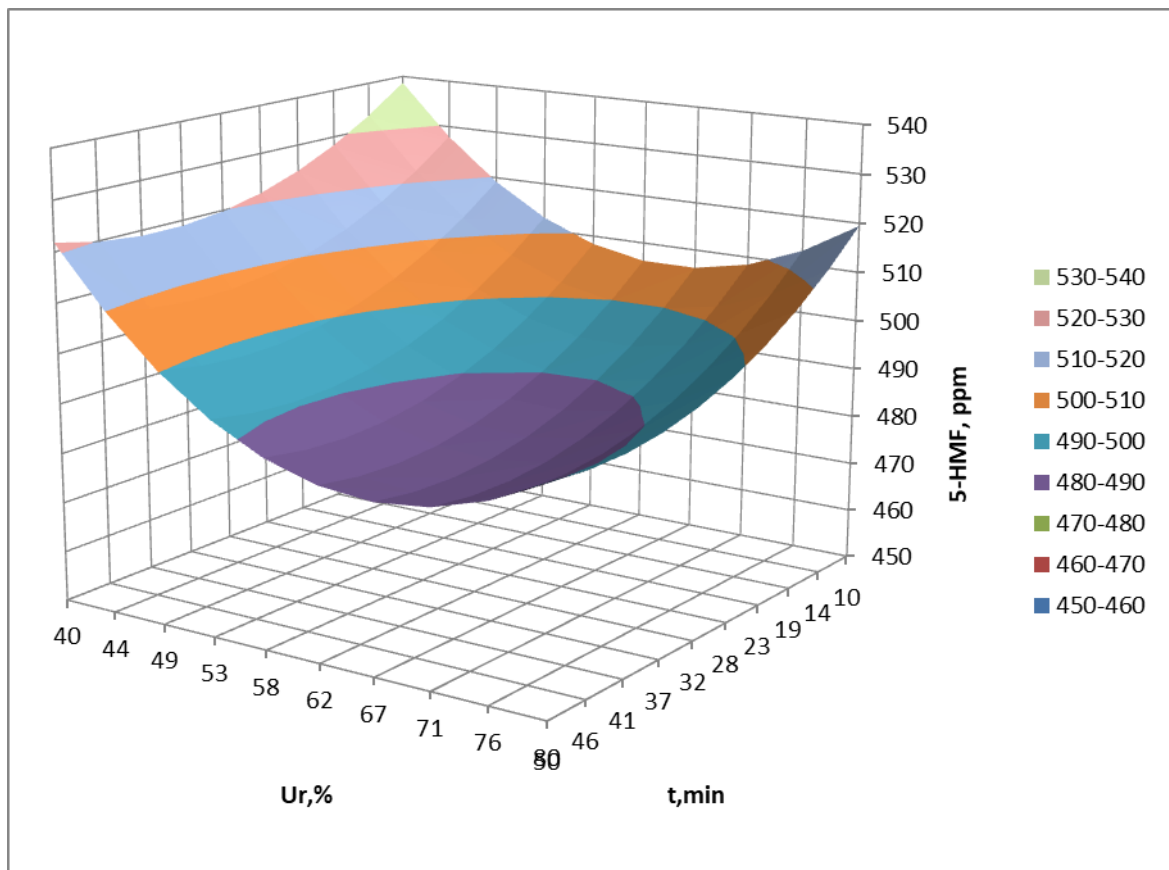
### ***Furfurale e idrossimetilfurfurale***

Analoghe sperimentazioni sono state condotte per gli inibitori aldeidici. Lo studio è stato eseguito riportando il risultato come contenuto in parti per milione (ppm) rispetto al substrato trattato. La quantità di furfurale rilevata è generalmente piccola per ogni condizione di trattamento, rilevando anche in questo caso un valore minimo (24 ppm) a 80 Ur e 37 minuti. In figura 39 è mostrato l'andamento previsto dall'analisi del disegno sperimentale. Il grado di correlazione della superficie con i risultati sperimentali è abbastanza buono,  $R^2 = 0,887$ . Alle condizioni di trattamento migliori il contenuto iniziale di 2-furfurale è abbattuto di oltre 100 volte.



**Figura 39:** Contenuto in ppm del 2-furfurale residuo nel substrato trattato

Per quanto riguarda il **5-idrossimetilfurfurale**, l'analisi del disegno sperimentale non ha prodotto una funzione con un buon grado di correlazione tra risposta sperimentale e previsione ( $R^2 = 0,4$ ). In ogni caso i valori di questo inibitore, trovati dopo il trattamento, si assestano tra i 400 e i 600 ppm, riducendosi da 3 a 4 volte il contenuto iniziale. A scopo dimostrativo si riporta in ogni caso la superficie prodotta (figura 40).



**Figura 40:** Contenuto in ppm del 5-HMF residuo nel substrato trattato.

### 3.7.3 Prove comparative di bioconversione (idrolisi e fermentazione alcolica).

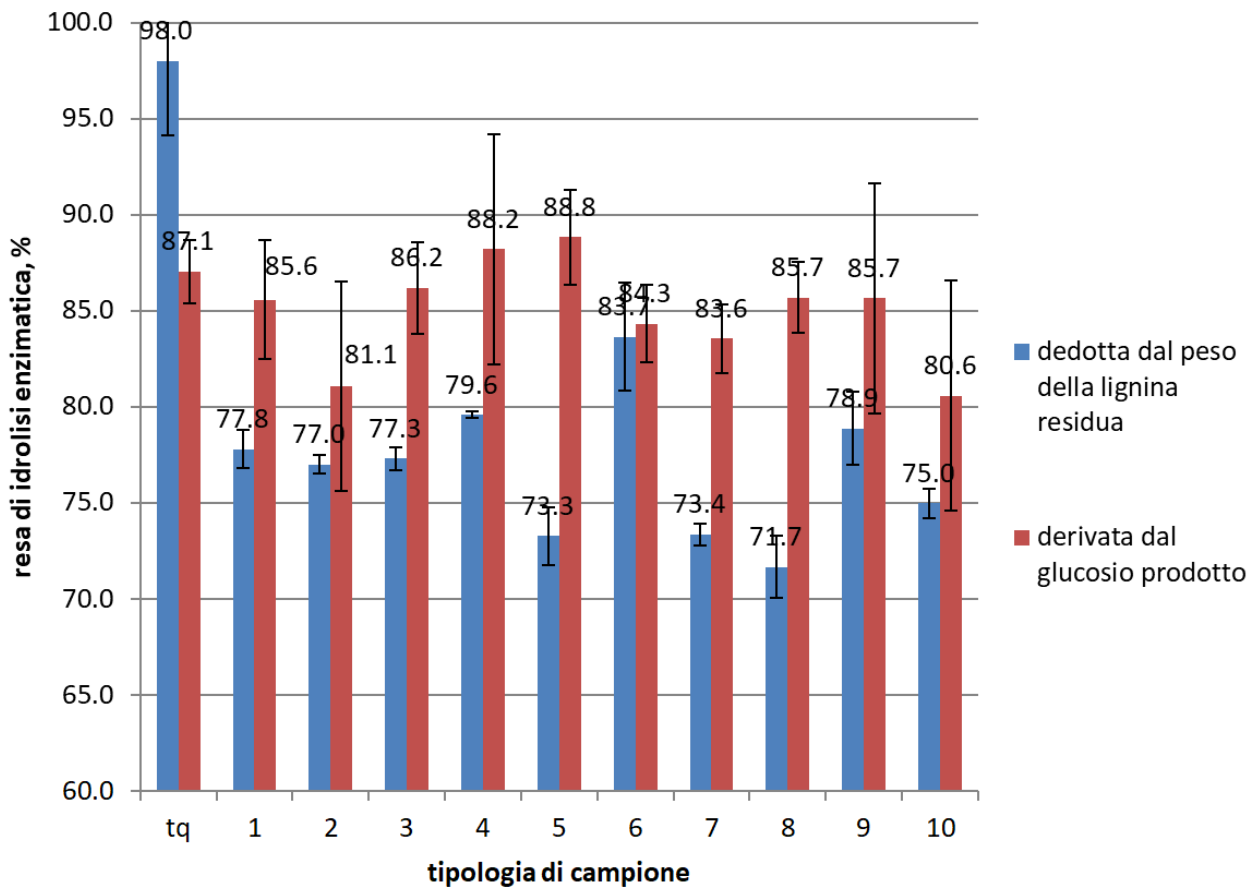
Il contenuto degli inibitori presenti nel substrato dopo il trattamento di detossificazione con il sistema pilota è stato nettamente inferiore rispetto al materiale non trattato. Tuttavia l'efficacia o meno del metodo richiede una verifica definitiva sulla produzione di etanolo da questi substrati, comparando i risultati con quelli ottenuti sul materiale non detossificato. La modalità delle prove di bioconversione è stata eseguita con un'idrolisi enzimatica per 48 ore a 50 °C, seguita da SSF a 35 °C per ulteriori 72 h. Le rese d'idrolisi enzimatiche alle 48 h, determinate mediante la rilevazione del glucosio nel brodo, sono risultate tra l'80 e il 90%, senza presentare una chiara correlazione con i parametri investigati (figura 41) e senza differenze rispetto al materiale non detossificato. A fine SSF è stato determinato, per ogni prova, il peso del residuo insolubile e da esso, come complemento, è stato ricavato il materiale dissolto, da cui è deducibile una resa d'idrolisi complessiva a fine bioconversione. I dati sono indicativi poiché lieviti e altri aggregati insolubili contribuiscono al peso della lignina residua. In ogni caso da questi altri dati è emersa una maggiore solubilizzazione del

materiale non trattato (figura 7). Ciò porta alla conclusione che, nonostante il materiale sia stato trattato con aria umida, è possibile che almeno una parte del substrato abbia subito la "*hornification*". I dati sono confermati dai risultati alla fine delle fermentazioni.

Nel substrato non detossificato non si produce etanolo e la conversione finale (dopo 120 h) della cellulosa è risultata praticamente quantitativa, ritrovando tutto il glucosio potenzialmente disponibile nella fase liquida. Nei substrati trattati l'etanolo è stato prodotto solo nei campioni da 4 a 10 (i numeri indicano le condizioni di detossificazione riportate in tabella 3; vedi anche figura 41), dove il contenuto di inibitori residuo era inferiore. In questi casi l'etanolo prodotto corrisponde a circa l'80% del teorico e il glucosio residuo era presente in tracce. In alcuni casi è stata rilevata anche la presenza di acido lattico e altri metaboliti (glicerolo e acido acetico). Oltre alla parziale *hornification* (dovuta all'aumento del dry matter da circa 50% a 80%), una possibile ragione della ridotta idrolisi enzimatica può essere attribuita alla rimozione del materiale fine, il quale, in seguito al trattamento è aspirato insieme alla corrente di aria calda. Tale materiale fine, presente nel tal quale, è, infatti, maggiormente idrolizzabile per il suo maggior rapporto superficie/volume, ossia per la sua maggiore esposizione agli enzimi.

In un sistema industrializzato si deve dunque tenere conto del recupero del materiale fine aspirato, da ricongiungere al materiale detossificato.

Prove di laboratorio hanno, inoltre, dimostrato che l'efficienza d'idrolisi enzimatica sul materiale fine, recuperato nel ciclone, raggiunge valori superiori a quella riscontrata su fibre più grandi dello stesso lotto di biomassa pretrattata con SE.



**Figura 41:** Rese di idrolisi enzimatiche sui campioni detossificati alle differenti condizioni del disegno sperimentale (vedi tabella 3); confronto con il materiale esploso non trattato.

### 3.7.4 Scelta delle condizioni migliori di trattamento e produzione in continuo di esploso detossificato

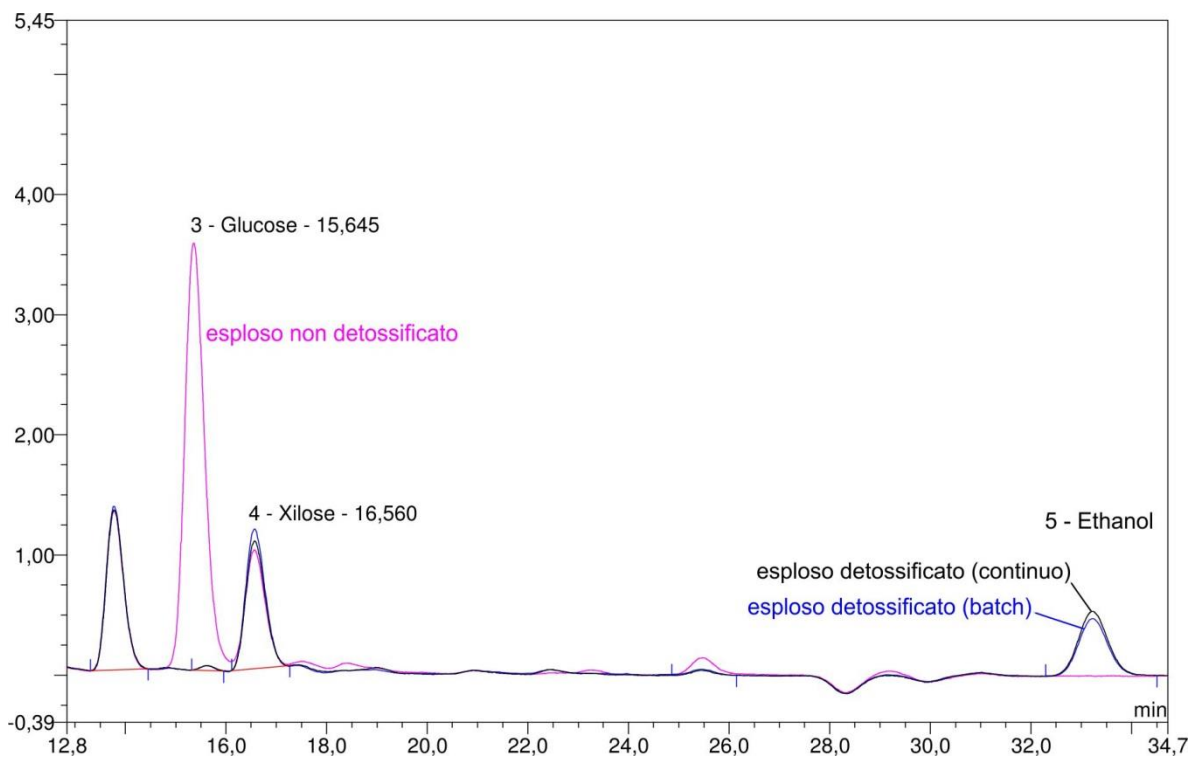
La mancata produzione di etanolo nei campioni a 10 minuti di trattamento (1,2,3) e l'assenza di differenze significative di produttività etanolica ci hanno condotto a selezionare come condizione migliore il trattamento con aria a 80 % di umidità relativa per 38 minuti. A queste condizioni è previsto il contenuto residuo minimo d'inibitori totali (inferiore allo 0,1%) e un dry matter dell'87%. Sono stati quindi trattati circa 20 kg di esploso in continuo. Il flusso di materia è stato calcolato in base ai tempi di riempimento e svuotamento del letto assicurando un tempo di permanenza media all'interno dell'essiccatoio pari a 38 minuti, aggiungendo la biomassa con una frequenza di circa 60 g/minuto. A fine prova è stato recuperato l'81% del materiale introdotto (su base secca). Il restante 19% è stato recuperato all'interno del ciclone di abbattimento polveri. La figura 42 mostra le due tipologie di materiale recuperato.





**Figura 42:** Esploso trattato mediante essiccatoio vibrante e corrente di aria umida. A sinistra il materiale polverulento recuperato nel ciclone di aspirazione.

Il materiale recuperato a valle del trattamento di detossificazione aveva un dry matter dell'89% ed un contenuto di inibitori totali inferiore allo 0,1%, in linea con quanto aspettato. Su di esso sono stati eseguiti i test di bioconversione ottenendo una resa d'idrolisi enzimatica dell'85% ed una resa di fermentazione alcolica del 94% rispetto al glucosio prodotto. I risultati comparativi di bioconversione sono mostrati nella figura 43, dove sono riportate le analisi dei brodi riferiti alle SSF di: 1) Esploso tal quale (non detossificato); 2) Esploso trattato in modalità batch alle condizioni di Ur 80% per 30 minuti (campione 9 di tabella 3); 3) Esploso trattato alle condizioni ottimizzate e in continuo. In quest'ultimo caso è evidenziata una produzione alcolica lievemente maggiore rispetto al campione 9, mentre nel substrato non detossificato è presente soltanto glucosio. Le figure 44 e 45 mostrano alcune foto dell'attività sperimentale eseguita sul sistema pilota.



**Figura 43:** Cromatogrammi (HPIC) relativi all'analisi dei brodi di fermentazione (SSF) dell'esploso tal quale e degli esplosi detossificati.



**Figura 44:** Esploso fluidizzato all'interno dell'essiccatoio vibrante. Visibile la sonda di rilevazione dell'umidità.



**Figura 45:** Foto dell'impianto di detossificazione.

#### **4. CONCLUSIONI**

In questo lavoro è stata affrontata la problematica della presenza degli inibitori nella biomassa pretrattata mediante steam explosion. Questi inibitori sono in gran parte acidi organici e/o aldeidi volatili, e compromettono la fermentazione degli zuccheri ottenibili dalla biomassa.

La loro rimozione è stata eseguita con successo mediante l'ideazione, la messa a punto e la sperimentazione di tre sistemi di detossificazione. Due di questi sistemi sono stati realizzati su scala banco, il terzo adattando un macchinario industriale. Il primo sistema è costituito da un reattore tubolare contenente la biomassa, con un flusso di aria calda e vapore che la attraversa trascinando via gli inibitori. Nel secondo sistema la biomassa è fluidizzata mediante un moto oscillatorio del reattore che consente al flusso di aria e vapore di allontanare gli inibitori in maniera più efficiente. Il terzo sistema di detossificazione è costituito da un essiccatoio vibro-fluidizzato, dove il modello industriale è stato modificato introducendo un flusso di aria calda e vapore. Su quest'ultimo è stata eseguita una sperimentazione per ottimizzare i parametri di processo più importanti, cioè il tempo di trattamento e il grado di umidificazione dell'aria. In tutti i sistemi, è stato impiegato del vapore per evitare l'insorgenza dei fenomeni di *hornification* che abbassano le rese d'idrolisi enzimatica della cellulosa.

Tutti i sistemi si sono dimostrati efficaci per la rimozione selettiva degli inibitori senza allontanare o degradare i carboidrati solubili, come invece accade nella rimozione degli

inibitori mediante il lavaggio con fluidi liquidi. Infine, i substrati detossificati sono stati sottoposti a bioconversione mediante idrolisi enzimatica e fermentazione, dimostrando che possono essere efficacemente convertiti in bioetanolo. La quantità di etanolo prodotta con i metodi esaminati in questo lavoro è stata mediamente più alta del 14% rispetto a quella ottenuta da substrati detossificati con metodi convenzionali (essiccazione o lavaggio).

## 5. RIFERIMENTI

- [1] Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B. (1996), *Enzyme Microb Technol* 18:312-331..
- [2] Ethanol Production at Flask and Pilot Scale from Concentrated Slurries of Steam-Exploded Aspen, di De Bari et al., (2002), DOI: 10.1021/ie010571f..
- [3] Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses, di Xiaolin et al, *Enzyme and microbial technology*. Vol. 48, no. 1 (Jan. 2011): p. 92-99.
- [4] Cantarella et al.(2004). Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSFi; [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00285-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00285-1).
- [5] Bura et a. (2002). SO<sub>2</sub>-catalyzed steam explosion of corn fiber for ethanol production. DOI: 10.1385/ABAB:98-100:1-9:59.
- [6] Cara et all (2007). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2007.05.008>.
- [7] Converti et al (2000). Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production, di, *Chem. Eng. Technol.*, 23, pp. 1013–1020.
- [8] Marchal et al (1986). Conversion into acetone and butanol of lignocellulosic substrates pretreated by steam explosion. DOI: 10.1007/BF01040868.
- [9] Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor, di Li and Chen (2008) <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.003>.
- [10] Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol, di Jurado et al, (2009) <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.049>.

- [11] Comparison of different detoxification methods for corn cob hemicellulose hydrolysate to improve ethanol production by *Candida shehatae* ATCC 20335, di Ge et al, (2011) African Journal of Microbiology Research Vol. 5(10), pp. 1163-1168.
- [12] Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification, di Palmqvist et al, (2000) [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1).
- [13] [28] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000; 25:184–92.

ENEA  
Servizio Promozione e Comunicazione  
[www.enea.it](http://www.enea.it)

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati  
maggio 2021